

## Участники издания

### Главные редакторы

**Долгов Владимир Владимирович** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (ФГБОУ ДПО РМАНПО)

**Годков Михаил Андреевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Вавилова Татьяна Владимировна** — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ

### Рецензент

**Гильманов Александр Жанович** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, председатель комитета по образованию, кадровому и профессиональному развитию Федерации лабораторной медицины

### Авторы

**Абайтова Наталья Евгеньевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Авдеева Анастасия Сергеевна** — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой»

**Баранов Андрей Анатольевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Барков Илья Юрьевич** — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией пренатального ДНК-скрининга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России

**Бекетова Татьяна Валентиновна** — доктор медицинских наук, профессор кафедры инфокогнитивных технологий ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», ведущий научный сотрудник лаборатории системного склероза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», заведующая ревматологическим отделением (с нефрологическими койками и кабинетом терапии ГИБП) ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ

**Белохвостикова Татьяна Сергеевна** — доктор медицинских наук, профессор кафедры лучевой и клинической лабораторной диагностики Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО, медицинский директор ООО «ЮНИЛАБ-Иркутск»

**Билалов Фаниль Салимович** — доктор медицинских наук, доцент кафедры общественного здоровья и организации здравоохранения, лабораторной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, главный врач ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр»

**Болдырева Маргарита Николаевна** — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, медицинский директор компании ООО «ДНК-Технология»

**Боровкова Наталья Валерьевна** — доктор медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, заведующая отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Бугров Алексей Викторович** — кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Вавилова Татьяна Владимировна** — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ

**Высоцкая Валерия Николаевна** — врач-патологоанатом, врач клинической лабораторной диагностики высшей категории ГБУЗ «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка»» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Гариб Виктория Фирузовна** — доктор медицинских наук, профессор, научный сотрудник департамента патофизиологии и исследований аллергии Венского медицинского университета (Вена, Австрия)

**Гариб Фируз Юсупович** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет» Минздрава России (Сеченовский

Университет), профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», заслуженный деятель науки Республики Узбекистан

## Участники издания

**Годков Михаил Андреевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Гольдберг Аркадий Станиславович** — кандидат медицинских наук, проректор по экономике и развитию ФГБОУ ДПО РМАНПО, заведующий кафедрой общественного здоровья, экономики, управления и цифровизации здравоохранения, медицинского права и медицинской экспертизы ФГБОУ ДПО РМАНПО, директор Российского диагностического саммита, член комитета Торгово-промышленной палаты РФ по предпринимательству в здравоохранении и медицинской промышленности

**Джангирова Татьяна Владимировна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Долгих Татьяна Ивановна** — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской микробиологии и лабораторной медицины Пензенского института усовершенствования врачей — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Долгов Владимир Владимирович** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Жибурт Евгений Борисович** — доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой трансфузиологии ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

**Зенина Лариса Петровна** — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, руководитель группы контроля качества лабораторных исследований отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Иванов Андрей Михайлович** — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, и.о. директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, главный специалист по клинической лабораторной диагностике Минобороны России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике и медицинской микробиологии Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга, президент Федерации лабораторной медицины

**Касоян Карине Тимуровна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Кашолкина Елена Александровна** — старший лаборант кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Киреев Андрей Андреевич** — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, врач клинической лабораторной диагностики, старший научный сотрудник 3-го патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, сопредседатель комитета по клинической цитологии Федерации лабораторной медицины

**Кисиличина Дарья Григорьевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Кузнецова Надежда Александровна** — старший преподаватель кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, заведующая клинико-диагностической лабораторией ООО «Лаборатория.ру»

**Кузнецова Татьяна Евгеньевна** — старший лаборант кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Ламбакахар Мария Георгиевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Лапкина Наталья Александровна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Левшин Николай Юрьевич** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Луговская Светлана Алексеевна** — доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Метельская Виктория Алексеевна** — доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, главный научный сотрудник

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России

## Участники издания

**Миронова Ирина Ивановна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Мудров Валерий Павлович** — доктор медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Насонов Евгений Львович** — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», президент Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России», заслуженный деятель науки РФ

**Ненашева Наталья Михайловна** — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой аллергологии и иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Островский Олег Владимирович** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, главный внештатный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава России в Южном федеральном округе

**Пацап Ольга Игоревна** — кандидат медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения № 1 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, младший научный сотрудник НОРЦ «Молекулярная морфология» ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», генеральный секретарь Российского общества патологоанатомов

**Передельская Марина Юрьевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры аллергологии и иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Пешков Максим Николаевич** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры онкологии и пластической хирургии Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр» ФМБА России

**Попкова Татьяна Валентиновна** — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией системной красной волчанки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой»

**Почтарь Маргарита Евгеньевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, старший научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Ракова Наталия Геннадиевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Речкина Ольга Петровна** — ассистент кафедры поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Ризопулу Анна Панаётисовна** — доктор биологических наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Ройтман Александр Польевич** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Романова Людмила Андреевна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Рудик Дмитрий Владимирович** — кандидат биологических наук, специалист АО «БиоХимМак Диагностика»

**Себекина Оксана Владимировна** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры аллергологии и иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО

**Селиванова Анна Владимировна** — кандидат медицинских наук, врач-эндокринолог высшей категории медицинского центра «Здоровье» г. Королева

**Семенова Анна Борисовна** — доктор медицинских наук, заведующая Центром патологоанатомической диагностики и молекулярной генетики ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.С. Юдина» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Сироткина Ольга Васильевна** — доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»

**Славнова Елена Николаевна** — доктор медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, ведущий научный сотрудник МНИОИ им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России

**Сычев Дмитрий Алексеевич** — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, ректор ФГБОУ ДПО РМАНПО, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии им. акад. Б.Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО, заслуженный деятель науки РФ

**Тараканова Ольга Вячеславовна** — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики факультета ДПО ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава

России (Пироговский Университет), заведующая цитологической лабораторией Центра патологоанатомической диагностики и молекулярной генетики ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.С. Юдина» Департамента здравоохранения г. Москвы

## Участники издания

**Тимофеев Юрий Сергеевич** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, руководитель лаборатории изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний им. Н.В. Перовой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России

**Шабалова Ирина Петровна** — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО, член Международной Академии Цитологии (MIAC)

## Список сокращений и условных обозначений

♣ — торговое наименование лекарственного средства и/или фармацевтическая субстанция

⚡ — лекарственное средство не зарегистрировано в Российской Федерации

â2ГП-I — естественный антикоагулянт и иммунорегулирующий белок â2-гликопротеин 1

АА — апластическая анемия

АГМА — антигладкомышечные антитела

АДФ — аденозиндифосфат

АИГ — аутоиммунный гепатит

АИГА — аутоиммунная гемолитическая анемия

АКК — ацинарно-клеточная карцинома

аКЛ — антитела к кардиолипину

АЛТ — аланинаминотрансфераза

АМЦВ — антитела к модифицированному цитруллинированному виментину

АНА — антинуклеарные антитела

Анти-НВс — антитела к белку нуклеокапсида вируса гепатита В

Анти-НВе — антитела к антигену вируса гепатита В

Анти-НВs — антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В

анти-дсДНК — антитела, реагирующие с двуспиральной (нативной) дезоксирибонуклеиновой кислотой

анти-Карб — антитела к карбамилированным белкам

АНФ — антинуклеарный фактор

АНЦА — антинейтрофильные цитоплазматические антитела

АНЦА-СВ — системные васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами

Апо (А-1, В) — аполипопротеины

аПС — активированный протеин С

АС — анкилозирующий спондилит

АСИТ — аллерген-специфическая иммунотерапия

АСТ — аспартатаминотрансфераза

АТ — антитромбин

АТА — антитела к топоизомеразе

АТФ — аденозинтрифосфат

АФК — активные формы кислорода

аФЛ — антифосфолипидные антитела

АФП — альфа-фетопротейн

АФС — антифосфолипидный синдром

АХЗ — анемия хронических заболеваний

АЦА — антицентромерные антитела

АЦБ — антитела к цитруллинированным белкам

АЦЦП — антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

АЧГ — античеловеческий глобулин

АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время

БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж

БГЛ — большие гранулярные лимфоциты

БСВ — болезнь Стилла у взрослых

БШ — болезнь Шегрена

ВА — волчаночный антикоагулянт

ВАК — Высшая аттестационная комиссия

ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

ВКК — внутрилабораторный контроль качества

ВКЛ — волосатоклеточный лейкоз



ВМТ — внутриматочные трансфузии  
ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения  
ВОИ — врожденные ошибки иммунитета  
ВОК — внешняя оценка качества  
ВПЧ — вирус папилломы человека  
ВЭБ — вирус Эпштейна–Барр  
ГБПН — гемолитическая болезнь плода и новорожденного  
ГГТ — гамма-глутамилтрансфераза  
ГИТ — гепарин-индуцированная тромбоцитопения  
ГКА — гигантоклеточный артериит  
ГУС — гемолитико-уремический синдром  
ГЦР — гепатоцеллюлярный рак  
ГЭБ — гематоэнцефалический барьер  
ДБСТ — диффузная болезнь соединительной ткани  
ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание  
ДК — дендритные клетки  
ДМ — дерматомиозит  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДПИД — дезоксипиридинолин  
ДС — диагностическая специфичность  
ДЧ — диагностическая чувствительность  
ЖДА — железодефицитная анемия  
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт  
ЗПК — заменное переливание крови  
ИВЗ — иммуновоспалительные заболевания  
ИВМ — идиопатические воспалительные миопатии  
ИВРЗ — иммуновоспалительные ревматические заболевания  
ИГХ — иммуногистохимия  
ИК — индикатор качества  
ИМ — инфаркт миокарда  
ИП — истинная полицитемия  
ИТП — иммунная тромбоцитопения  
ИФА — иммуноферментный анализ  
ИЦХИ — иммуноцитохимическое исследование  
КДЛ — клинико-диагностическая лаборатория  
КК — креатинкиназа  
КЛД — клиническая лабораторная диагностика  
КМ — контрольные материалы  
КП — кальпротектин  
КФ — кислая фосфатаза  
КЩФ — костный изофермент щелочной фосфатазы  
Л2 — липокалин-2  
ЛДГ — лактатдегидрогеназа  
ЛИС — лабораторная информационная система  
ЛП(а) — липопротеин (а)  
ЛПВП — липопротеиды высокой плотности  
ЛПНП — липопротеиды низкой плотности  
ЛС — лекарственное средство  
ЛУ — лимфатические узлы  
МВ — макроглобулинемия Вальденстрема  
МВКЛ — моноклональный В-клеточный лимфоцитоз  
МГ — миоглобин  
МДС — миелодиспластический синдром  
МЕ — международная единица активности  
МЖ — молочная железа  
МЗ РФ — Министерство здравоохранения Российской Федерации  
МИС — медицинская информационная система  
ММ — множественная миелома  
МНО — международное нормализованное отношение (англ. International Normalized Ratio)  
МО — медицинская организация  
МОБ — минимальная остаточная болезнь  
МПО — миелопероксидаза  
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота  
МЭМ — медико-экономическая модель  
НАИТ — неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения  
нкРНК — некодирующие рибонуклеиновые кислоты  
НМГ — низкомолекулярные гепарины

НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого  
НРИФ — непрямая реакция иммунофлюоресценции  
НТЖ — насыщение трансферрина железом  
НФГ — нефракционированный гепарин  
НЭ — неспецифическая эстераза  
НЭО — нейроэндокринные опухоли  
ОАК — общий (клинический) анализ крови  
ОБП — острая болезнь почек  
ОИМ — острый инфаркт миокарда  
ОК — остеокальцин  
ОКС — острый коронарный синдром  
ОЛ — острый лейкоз  
ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз  
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз  
ПА — плеоморфная аденома  
ПАД — пептидил-аргининдезаминаза  
ПБА — патогенные биологические агенты  
ПВ — протромбиновое время

## Список сокращений и условных обозначений

ПГТТ — пероральный глюкозотолерантный тест  
ПДЗ — предельные допустимые значения  
ПДФ — продукты деградации фибриногена/фибрина  
ПЖ — поджелудочная железа  
ПИД — пиридинолин  
ПИДС — первичные иммунодефицитные состояния  
ПК — плазматические клетки  
ПМ — полимиозит  
ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия  
ПЦ — проточная цитофлуориметрия  
ПЦР — полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени  
РА — ревматоидный артрит  
РаПС — резистентность к активированному протеину С  
РЗ — ревматические заболевания  
РИА — радиоиммунный анализ  
РМАНПО — ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»  
Минздрава России  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
РНП — рибонуклеопротеин  
РПМ — ревматическая полимиалгия  
рСКФ — расчетная скорость клубочковой фильтрации  
РФ — ревматоидный фактор  
СанПиН — санитарные правила и нормы  
сБСЖК — сердечный белок, связывающий жирные кислоты  
СВ — системные васкулиты  
СД — сахарный диабет  
СЖ — синовиальная жидкость  
СЗСД — системные заболевания соединительной ткани  
СК — секреторная карцинома  
СКВ — системная красная волчанка  
СКФ — скорость клубочковой фильтрации  
СМА — спинальная мышечная атрофия  
СМЖ — спинномозговая жидкость  
СОП — стандартные операционные процедуры  
СОЭ — скорость оседания эритроцитов  
СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита  
СРБ — С-реактивный белок  
ССД — системная склеродермия  
ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания  
ТАБ — тонкоигольная аспирационная биопсия  
ТВ — тромбиновое время  
ТГ — триглицериды  
ТГСК — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток  
ТГТ — тест генерации тромбина

ТКИН — тяжелая комбинированная иммунная недостаточность  
Т-ЛБГЛ — Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов  
Т-ПЛЛ — Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз  
ТЭГ — тромбоэластография  
ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии  
ТЭМ — тромбоэластометрия  
УББ — уровень биобезопасности  
УЗИ — ультразвуковое исследование  
укРНК — ультраконсервативные рибонуклеиновые кислоты  
ФЗ — федеральный закон  
ФКБ — фиброзно-кистозная болезнь  
ФЛ — фолликулярная лимфома  
ФЛМ — Федерация лабораторной медицины  
ФНО- $\alpha$  — фактор некроза опухоли  $\alpha$   
ФСВОК — Федеральная система внешней оценки качества  
ХБП — хроническая болезнь почек  
ХГВ — хронический гепатит В  
ХЛЛ — хронический лимфолейкоз  
ХМЛ — хронический миелолейкоз  
ХС — холестерин  
ХС-ЛПВП — холестерин липопротеидов высокой плотности  
ХС-ЛПНП — холестерин липопротеидов низкой плотности  
ЦМВ — цитомегаловирус  
ЦНС — центральная нервная система  
ЦсС — цистатин С  
ЧМТ — черепно-мозговая травма  
ШМ — шейка матки  
ЩЖ — щитовидная железа  
ЩФ — щелочная фосфатаза  
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота  
ЭМК — эпителиально-миоэпителиальная карцинома  
ЭПО — эритропоэтин  
ACR — Американская коллегия ревматологов  
АЕН — атипичная гиперплазия эндометрия  
APUD — захват и декарбоксилирование предшественников аминов  
AUC — площадь под кривой  
AUS — атипия неопределенного значения  
AZF — фактор азооспермии  
В — систематическая погрешность или смещение  
BCR — В-клеточный рецепторный комплекс  
BNP — мозговой натрийуретический пептид В-типа  
Breg — В-регуляторные клетки  
CBF — фактор связывания  
CFTR — трансмембранный регулятор ионной проводимости  
CHCMr — средняя концентрация гемоглобина в ретикулоцитах  
CHr (RET-He) — среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах  
CIN — цервикальная интраэпителиальная неоплазия  
circРНК — кольцевые рибонуклеиновые кислоты  
CISH — хромогенная гибридизация *in situ*  
COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 г.  
CRAB — гиперкальциемия с нарушением функции почек, анемией и поражением костей скелета  
CV — коэффициент вариации  
DAMP — молекулярные паттерны, связанные с повреждением  
DAS — шкала активности заболевания (англ. Disease Activity Score)  
DMAIC (определение, измерение, анализ, совершенствование, контроль) — подход к последовательному решению проблем в управлении  
dRVVT — активированное частичное тромбопластиновое время с разведенным ядом гадюки Рассела  
EGBD — разрушение стромы и желез эндометрия  
EGFR — рецептор эпидермального фактора роста  
EIN — эндометриальная интраэпителиальная неоплазия  
ER — рецептор эстрогена  
EULAR — Европейский альянс ассоциаций ревматологов, ранее называвшийся Европейской лигой против ревматизма  
FcR — Fc-рецепторы иммуноглобулинов  
FISH — флюоресцентная гибридизация *in situ*  
FITC — флюоресцеиноизотиоционат  
GIST — гастроинтестинальная стромальная опухоль  
GM-CSF — гранулоцитарный и моноцитарный колониестимулирующий фактор

GPI — гликозилфосфатидилинозитоловый якорь  
HAV — вирус гепатита А  
Hb — гемоглобин  
HbA<sub>1c</sub> — гликированный гемоглобин  
HBe Ag — антиген вируса гепатита В  
HBs Ag — поверхностный антиген вируса гепатита В  
HBV — вирус гепатита В  
HCT — гематокрит  
HCV — вирус гепатита С  
HDV — вирус гепатита D  
HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2  
HEV — вирус гепатита E  
HGUC — уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности  
HLA — лейкоцитарные антигены главного комплекса гистосовместимости человека

## Список сокращений и условных обозначений

HPA — тромбоцитарные аллоантигены человека (англ. human platelet alloantigens)  
hs-cTn — измерение концентрации тропонина высокочувствительным способом  
HSIL — плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести  
HYPH-He — процент гипохромных эритроцитов  
ICSH — Международный комитет по стандартизации в гематологии  
IFCC — Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины  
IFN — интерферон  
Ig — иммуноглобулин (A, D, E, G, M)  
IGRA — анализ высвобождения гамма-интерферона (англ. interferon-gamma release assays)  
IL — интерлейкин  
ILC — лимфоидные клетки врожденного иммунитета  
IPF — фракция незрелых тромбоцитов  
IRF — фракция незрелых ретикулоцитов  
ISBT — Международное общество переливания крови  
ISG — интерферон-стимулированные гены  
ISTH — Международное общество по тромбозу и гемостазу  
iTreg — индуцированные Т-регуляторные клетки  
IUIS — Международный союз иммунологических сообществ  
KIR — иммуноглобулиноподобные рецепторы-киллеры  
KOH — гидроксид калия  
KREC — эксцизионные кольца рекомбинации делеций К (англ. Kappa-deleting Recombination Excision Circle)  
LAMP — петлевая изотермическая амплификация (англ. loop-mediated isothermal amplification)  
LKM — печеночно-почечные микросомальные антитела  
LSIL — плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени тяжести  
LTi — клетки-индукторы лимфоидной ткани  
MALT — экстранодальная лимфома маргинальной зоны, ассоциированная с лимфоидной тканью  
MARD — легкий диабет, связанный с возрастными изменениями  
MBL — маннозосвязывающий лектин  
MB-KK — креатинкиназа-MB  
MCH — среднее содержание гемоглобина в эритроците (англ. mean corpuscular hemoglobin)  
MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците (англ. mean corpuscular hemoglobin concentration)  
MCV — средний объем эритроцита (англ. mean corpuscular volume)  
MGUS — моноклональная гаммапатия неопределенного значения  
MHC — главный комплекс гистосовместимости (англ. Major histocompatibility complex)  
MLPA — мультиплексная амплификация лигазно-зависимых зондов (англ. Multiplex ligation-dependent probe amplification)  
MODY — диабет взрослого типа у молодых (англ. maturity onset diabetes of the young)  
MPL — мутация в гене рецептора тромбопоэтина  
MPV — средний объем тромбоцита (англ. mean platelet volume)  
MSI — микросателлитная нестабильность  
MTHFR — метилентетрагидрофолатредуктаза  
MTR — метионинсинтаза  
MTRR — метионинсинтаза-редуктаза  
NaF — фторид натрия  
NaOH — гидроксид натрия  
NET — внеклеточные ловушки нейтрофилов (англ. Neutrophil extracellular traps)  
NGAL — липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой  
NGS — секвенирование нового поколения (англ. Next-generation sequencing)  
NHGUC — отсутствие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности

NK — натуральные клетки-киллеры  
 NKT — натуральные киллеры Т-клетки  
 NLR — NOD-подобные рецепторы (распознающие образ)  
 NOS — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности  
 NRBC — нормобласты  
 NSE — нейронспецифическая энолаза  
 NT-proBNP — N-концевой фрагмент мозгового натрийуретического пептида В-типа  
 PINP — N-терминальный пропептид проколлагена 1-го типа  
 PAI-1 — ингибитор тканевого активатора плазминогена 1-го типа  
 PAMP — молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном (англ. Pathogen-associated molecular patterns)  
 PaN-high — новообразование панкреатобилиарной системы высокого риска  
 PaN-low — новообразование панкреатобилиарной системы низкого риска  
 PARP — поли(АДФ-рибоза)-полимеразы  
 PAS-реакция — реакция выявления гликозамингликанов с помощью реактива Шиффа и йодной кислоты  
 PCT — тромбокрит  
 PDCA — планируй–делай–проверяй–корректируй  
 PDW — ширина распределения тромбоцитов по объему  
 PF4 — тромбоцитарный фактор 4  
 Ph — филадельфийская хромосома  
 PIVKA — белок, синтезированный в отсутствие витамина К  
 PLT — тромбоциты  
 POEMS (полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, М-протеин, кожные изменения) — редкая нозологическая форма, наблюдаемая у больных с парапротеинемическими формами гемобластозов  
 PR — рецептор прогестерона  
 PRR — рецепторы распознавания образов патогенности  
 RBC — эритроциты  
 RDW — ширина распределения эритроцитов по объему  
 RET — ретикулоциты  
 Rh — резус (-фактор)  
 RhIg — резус-иммуноглобулин  
 RLR — RIG-подобные рецепторы  
 ROC — кривая-график, позволяющий оценить качество бинарной классификации  
 ROM — риск развития злокачественного новообразования  
 ROSE — метод моментальной цитологической оценки препарата на месте (англ. Rapid on-site evaluation)  
 SAID — тяжелый аутоиммунный диабет I типа  
 SARS-CoV-2 — второй коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома  
 SCORE — систематическая оценка коронарного риска  
 SD — среднее квадратическое (стандартное) отклонение  
 SDAI PMR — упрощенный индекс активности ревматической полимиалгии  
 SICCA — Международное клиническое объединение против синдрома Шегрена  
 SIDD — тяжелый инсулинодефицитный диабет  
 sIgE — аллерген-специфический иммуноглобулин E  
 SIRD — тяжелый инсулинорезистентный диабет  
 SLICC — Международное клиническое объединение против системной красной волчанки  
 SMN — белок выживаемости мотонейронов  
 SNP — однонуклеотидный полиморфизм  
 SRP — частицы сигнального распознавания  
 SSO — олигонуклеотид, специфичный к последовательности

## Список сокращений и условных обозначений

SSP — праймеры, специфичные для последовательности  
 sST2 — растворимая форма фактора подавления опухолеобразования  
 sTfR — растворимые рецепторы трансферрина  
 STR — короткие tandemные повторы  
 TAFI — активируемый тромбином ингибитор фибринолиза  
 TAT — общее аналитическое время  
 TBSRTC — система классификации цитологического материала  
 TCR — Т-клеточный рецептор  
 TE<sub>a</sub> — общая аналитическая ошибка  
 TEMPI — орфанное заболевание, при котором пациенты имеют пять общих характеристик, от которых происходит аббревиатура: телеангиэктазия, повышенный уровень эритропоэтина и эритроцитоз  
 TE<sub>макс</sub> — общая допустимая аналитическая ошибка  
 Tfh — фолликулярные Т-хелперы  
 TGF $\beta$  — трансформирующий фактор роста бета  
 Th — Т-хелперы

TIS — Международная стандартизованная терминология

TLR — Toll-подобные рецепторы

t-PA — тканевой активатор плазминогена

TPS — Парижская система

TREC — Т-рецепторные эксцизионные кольца (англ. T-cell receptor excision circles)

Treg — Т-регуляторные клетки

Trm — резидентные Т-клетки памяти

TYS — Международная Йокогамская классификация

vWF — фактор Виллебранда

WBC — лейкоциты

$\bar{X}$  — среднее арифметическое значение

## Введение

Медицина — древнейшая наука, имеющая целью лечение и предупреждение болезней человека. Три основные ветви медицины — профилактика, диагностика и лечение — тесно переплетены и взаимосвязаны. Лечение и профилактика невозможны без установления диагноза заболевания, причины его возникновения, ибо невозможно лечить и предупреждать то, что неизвестно.

Лабораторная диагностика является наиболее точным и массовым диагностическим направлением современной медицины. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ):

- удельный вес лабораторных исследований составляет 70–90% общего числа разных видов исследований, проводимых в медицинских организациях (МО);
- в 60–70% клинических случаев правильный диагноз пациенту врачи устанавливают по результатам лабораторных исследований;
- более 70% врачебных решений принимается на основании полученных результатов из клинико-диагностических лабораторий (КДЛ);
- в 65% случаев результаты лабораторных исследований, выполненных по неотложным состояниям, приводят к коренному изменению терапии, что позволяет спасти жизни пациентов.

Лабораторная медицина стала в современном мире одной из ключевых и наиболее перспективных медицинских наук, она позволяет не только своевременно устанавливать наличие той или иной патологии у пациента, но и прогнозировать вероятность ее развития и течения, осуществлять мониторинг эффективности лечения человека. Что предшествовало появлению этой важнейшей науки? Когда зародились первые диагностические и лечебные действия? Что представляет собой сегодня лабораторная медицина?

Основоположником медицины как научной дисциплины принято считать «отца медицины» Гиппократ (ок. 460–370 гг. до н.э.). Гиппократ считал, что возникновение заболевания обусловлено не божественным провидением, а образом жизни человека, его привычками, особенностями питания. Гиппократ первым указал: для правильного понимания причин возникновения болезней, адекватной оценки их протекания и назначения эффективного лечения необходимо обстоятельно изучать характер выделений больных (мокроту, экскременты, мочу). Отсюда следует, что именно им заложены первоосновы лабораторной медицины.

Далее вплоть до эпохи Возрождения в руках врачей-исследователей имелись лишь органолептические методы оценки биологического материала человека: цвет, запах, вкус, внешний вид, консистенция. Для успешного дальнейшего развития лабораторной медицины не было ни естественно-научной, ни философской, ни инструментальной базы, не существовало даже названия этого вида медицинской деятельности.

Предпосылки научного изучения жидкостей человеческого организма химическими методами зародились в XV–XVI вв. в лабораториях алхимиков. В середине XVII в. голландский естествоиспытатель-любитель Левенгук существенно улучшил качество микроскопии, что позволило ему стать первооткрывателем бактерий, простейших, сперматозоидов, разглядеть клетки крови, corpuscularные компоненты мочи. Понадобился еще примерно двухвековой путь, чтобы на основе общего развития естественных наук возникла система объективных методов исследования. В 1838 г. были опубликованы таблицы по микроскопии осадка мочи, а в 1844 г. — курс микроскопии для медицинских исследований (А. Донне). В 1843 г. вышла в свет основанная на клиническом материале монография И. Шерера «Химические и микроскопические исследования при патологии», явившаяся практически первым руководством по клинической лабораторной диагностике (КЛД).

С середины XIX в. существенно расширился диапазон технологий, составляющих содержание практической деятельности в лабораториях. В 1870 г. Ж. Дюбоск предложил колориметр, ставший на долгие годы одним из основных инструментов клинической химии. Микроскопия биологических жидкостей и простые химические методы — с них начиналась лабораторная деятельность.

В России научные лабораторные исследования выполнялись преимущественно в Военно-медицинской академии. Общеизвестна роль С.П. Боткина, И.П. Павлова, И.И. Мечникова, химика-органика и композитора А.П. Бородина в разработке и совершенствовании лабораторных технологий. Вместе с тем лабораторная диагностика XIX в. двигалась преимущественно по пути формирования аптечных и санитарных лабораторий. Наиболее ярким примером подвижников этого направления была династия Пелей: В.В. Пель (1820–1903), А.В. Пель (1850–1908), А.А. Пель (1878–1950), которые создали при лучшей в российской столице аптеке лабораторию, оснащенную в соответствии с самыми последними достижениями. Созданная лаборатория выполняла не только коммерческие химико-фармацевтические исследования, но и, как значилось в публичном объявлении, «для научных целей и для бедных физиолого-химические исследования производятся безвозмездно». Однако это были усилия одиночек-подвижников.

В стране в дореволюционный период фактически отсутствовала лабораторная служба как система. В первом издании многотомной медицинской энциклопедии, изданной на границе XVIII–XIX столетий, вообще не было упоминаний о такой медицинской специальности, как КЛД.

Становление лабораторных исследований в гражданском здравоохранении как лабораторной службы связано в первую очередь с деятельностью Е.А. Кост (1888–1975 гг.). Она прошла путь врача-интерна в психиатрической клинике, в лаборатории «Группы врачей», руководимой профессором А.И. Абрикосовым, ординатора, ассистента в госпитальной терапевтической клинике 2-го Московского университета (руководитель — профессор В.Ф. Предтеченский, затем М.П. Кончаловский) и работала в лаборатории этой клиники, где проводились новые тогда исследования и внедрялись специальные биохимические методы. В.Ф. Предтеченский изучал новый в то время раздел медицины — эндокринологию, а также уделял много внимания инфекционным заболеваниям и заболеваниям крови. Он подготовил фундаментальное «Руководство по клиническим лабораторным исследованиям», выдержавшее шесть изданий.

## Введение

Работая в клинике, Е.А. Кост заведовала лабораторией при больнице им. Н.А. Семашко, организовала и приняла на себя заведование лабораторией туберкулезного отделения при Медведниковской больнице. В 1924 г. написала монографию «Классификация геморрагических диатезов», за которую ей была присвоена ученая степень кандидата медицинских наук. В 1925 г. она перешла работать в больницу им. С.П. Боткина на заведование больничными лабораториями, впоследствии объединив их в единую КДЛ. В том же году на базе Боткинской больницы она организовала курсы усовершенствования для врачей-лаборантов при Мосгорздравотделе, от которых начинается отсчет деятельности кафедры КЛД.

В течение более чем 40 лет Е.А. Кост была единоличным лидером лабораторной службы России. Она была заведующим крупной КДЛ, заведующим профильной кафедрой в Центральном институте усовершенствования врачей, организовала Всесоюзное научное общество врачей-лаборантов и была его руководителем, принимала участие в издании журнала «Лабораторная практика» в качестве заместителя редактора, а в 1955 г. совместно с профессором Л.Г. Смирновой создала журнал «Лабораторное дело» (тираж свыше 25 тыс. экземпляров), с 1966 г. главным редактором этого журнала стал профессор В.В. Меньшиков. Будучи долгое время консультантом по лабораторному делу Минздрава СССР, Е.А. Кост провела большую работу по развитию лабораторной сети в стране, по организации и оснащению КДЛ, выработке нормативов, классификации лабораторий. Много усилий приложила, чтобы убедить клиницистов, что лаборатория — это не вспомогательное образование, а специализированное клиническое подразделение, в котором должны применяться научно обоснованные методы работы.

В 70-е годы прошлого столетия функции организатора лабораторной службы России были разделены между единомышленниками: профессор В.Т. Морозова стала главным специалистом лабораторной службы Минздрава СССР; профессор В.В. Меньшиков организовал Всесоюзный организационно-методический центр по лабораторному делу и стал главным редактором журнала «Клиническая лабораторная диагностика»; председателем Всесоюзного научного общества врачей-лаборантов стала цитолог профессор А.С. Петрова; председателем Российского научного общества — заведующий кафедрой КЛД профессор Р.Т. Тогузов; председателем Московского научного общества — руководитель первой автоматизированной лаборатории при городской поликлинике профессор И.С. Балаховский. Эти лидеры лабораторной службы консолидировали работу профильных кафедр, главных специалистов, руководителей научных обществ союзных республик и регионов Российской Федерации, сотрудников КДЛ разных ведомств. Была законодательно введена унификация лабораторных исследований, которая позволила наладить производство реактивов и аппаратуры для лабораторных исследований, введены унифицированные программы подготовки врачей-лаборантов, разработана программа и методика внутри- и межлабораторного контроля качества лабораторных исследований, началась работа по централизации лабораторных исследований. Первой была повсеместно централизована серодиагностика сифилиса, в конечном итоге была создана сеть централизованных лабораторий на базе открывшихся в конце 1980-х годов диагностических центров. Были налажены тесные контакты с лабораторными службами социалистических стран Восточной Европы.

В 1990-е годы главным специалистом Минздрава России стал В.В. Долгов, который возглавил и кафедру КЛД РМАНПО (Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования). Он много сделал для бесперебойного оснащения КДЛ реагентами и новым аналитическим оборудованием, обеспечил массовые поставки лабораторных приборов через национальный проект «Здоровье». В 1991 г. президентом научного общества был избран член-корреспондент Академии медицинских наук СССР, профессор Б.Ф. Коровкин. В этот период была создана Российская ассоциация медицинской лабораторной диагностики, образование которой инициировал заведующий КДЛ Республиканской больницы В.М. Розенталь, а затем возглавил заведующий КДЛ Научно-исследовательского института сердечно-сосудистой хирургии профессор Д.Б. Сапрыгин. Была создана Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК), возглавил которую профессор В.Н. Малахов.

В настоящее время огромную консолидирующую роль в лабораторной медицине выполняет Федерация лабораторной медицины (ФЛМ), под патронажем которой проводятся национальные конгрессы, формируется законодательная база службы, издаются научно-практические профильные журналы, руководства, в том числе и настоящее национальное руководство по КЛД.

Кафедра КЛД с курсом лабораторной иммунологии РМАНПО отмечает 100-летний юбилей в 2025 г. Она начинает свое летосчисление с курсов по лабораторной диагностике, организованных Е.А. Кост при Мосгорздравотделе в 1925 г., в 1936 г. эти курсы были преобразованы в кафедру КЛД Центрального института усовершенствования врачей. Е.А. Кост со своими соратниками (Н.И. Бокуняева, М.Н. Шалфеева, В.Н. Топарская, А.М. Гинсбург, М.И. Стенко, Л.И. Золотницкая, М.И. Кальнова, В.Т. Морозова, И.С. Цыпкин, Г.Г. Газенко, Н.Г. Шевченко,

А.С. Циркина) сделали кафедру центром подготовки кадров для лабораторной службы страны, работали на развитие КЛД. Как пример: в тяжелые годы Великой Отечественной войны деятельность кафедры была направлена на помощь клиническим лабораториям эвакогоспиталей путем личных и письменных консультаций, инструктажа. Е.А. Кост написала и опубликовала краткое пособие по лабораторной технике, широко использовавшееся в этот период врачами-лаборантами госпиталей. В 1950-х годах на кафедре началась подготовка специалистов в ординатуре, в 1960 г. открыта аспирантура по КЛД. Кафедра до 60-х годов прошлого века являлась практически единственным центром подготовки врачей КЛД для гражданской лабораторной службы страны.

## Введение

С 1976 г. кафедру возглавила В.Т. Морозова, на кафедру пришли новые преподаватели — Р.Л. Марцишевская, А.С. Циркина, Н.А. Авдеева, И.И. Миронова, М.А. Куклина. После окончания ординатуры на кафедре стали работать врачи С.А. Луговская, Т.Н. Соболева, К.А. Щетникович. На кафедре открываются циклы подготовки и повышения квалификации преподавателей профильных кафедр, проводятся циклы для главных специалистов лабораторной службы. Первыми курсантами были главные специалисты союзных республик, многие из них имели ученые степени кандидатов и докторов медицинских наук. Они входили в правление Всесоюзного научного общества, в редсовет журнала «Лабораторное дело», включались в экспертные комиссии, участвовали в конференциях, семинарах, съездах. Кафедра стала консолидирующей структурой работы этих специалистов над созданием квалификационных характеристик сотрудников КДЛ.

В 1990-х годах произошли очередная смена поколения и существенное расширение профессорско-преподавательского состава кафедры. В 1992 г. на должность заведующего кафедрой избирается В.В. Долгов, перешедший с кафедры патофизиологии после защиты докторской диссертации. На кафедру приходят кандидаты медицинских наук С.С. Раков, Е.К. Назарова, И.П. Шабалова, активно работают на кафедре и защищают диссертации А.П. Ройтман, М.Е. Почтарь, Л.А. Романова, Т.В. Джангирова, Н.Г. Ракова. Начиная с 2000 г. кафедра начала сотрудничать с медико-биологическим факультетом РГМУ им. Н.И. Пирогова, на кафедре работает курс КЛД. В результате кафедра пополняется выпускниками этого факультета (А.В. Бугров, К.Т. Касоян, Е.В. Наумова, М.М. Федорова), которые выполняют научные исследования, защищают диссертации и входят в профессорско-преподавательский состав кафедры. В этот же период докторские диссертации защищают и занимают должности профессоров С.А. Луговская, И.П. Шабалова, А.П. Ройтман. Несмотря на сложный период в стране, кафедра прогрессивно развивается.

Высокотехнологичные биохимические, гематологические, иммунохимические анализаторы, аналогичные тем, что имеются в лабораториях диагностических центров, поступают на кафедру, и в течение нескольких лет практически все врачи КДЛ диагностических центров страны прошли на них обучение.

Кафедра начинает ежегодно проводить профильные российские научно-практические конференции, выпускает периодический журнал «Лаборатория», открывает первый в стране диссертационный совет по специальности «клинико-диагностическая лаборатория», издает серию учебных руководств, учебных пособий, многоцветных атласов по профилям КЛД. Ежегодно сотрудниками и учениками кафедры защищается несколько докторских и кандидатских диссертаций. Группа под руководством профессора С.А. Луговской, неоспоримый лидер в диагностике онкогематологической патологии, имеет международный сертификат по диагностике пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) методом проточной цитометрии, результаты фенотипирования используются в клинике для назначения таргетной терапии онкогематологических заболеваний. Группа под руководством профессора И.П. Шабаловой имеет высокий авторитет среди цитологов и клиницистов, внедрила метод жидкостной цитологии в практику КДЛ, задает тон в комплексировании цитологии с молекулярной биологией, эффективно использует компьютерные, видеоцифровые подходы в цитологии. Группа под руководством профессора А.П. Ройтмана активно сотрудничает с клиницистами, организовала испытательную лабораторию, проводит иммунохимические исследования по широкому спектру метаболических заболеваний. Кафедра обеспечила выход первых в нашей стране книг, формирующих специальность: «Национальное руководство по клинической лабораторной диагностике» в 2 томах под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова; учебник «Клиническая лабораторная диагностика» под ред. В.В. Долгова. Непреходящее значение имеют серии атласов: «Гематологический атлас» [С.А. Луговская, М.Е. Почтарь (2004, 2007, 2011, 2016, 2023 гг.)], «Атлас осадков мочи» (2002, 2007, 2015, 2022 гг.), цитологические атласы (2001, 2005, 2010, 2016 гг.), «Общеклинические исследования» (2005, 2009, 2012, 2021 гг.) и целый арсенал учебных пособий по разным разделам лабораторных исследований.

Развитие системы здравоохранения, медицины Москвы, цифровизация и централизация КЛД потребовали новаторских решений. В 2020 г. заведовать кафедрой был приглашен руководитель отдела лабораторной диагностики Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского доктор медицинских наук М.А. Годков, а В.В. Долгов, получив звание почетного заведующего кафедрой, перешел на должность профессора. Под руководством М.А. Годкова за несколько лет кафедра значительно расширилась: в нее влились преподаватели кафедр биохимии и иммунологии, основной базой стал лабораторный корпус Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения Москвы, филиалы кафедры сформировались на базе городской клинической больницы № 1 Москвы, медицинского центра Центрального банка РФ, нескольких диагностических центров, крупных сетевых лабораторий. В городской клинической больнице им. С.П. Боткина сохранилась учебно-производственная база кафедры, на которой сотрудники кафедры обеспечивают высокотехнологичную диагностику пациентам Московского городского гематологического центра и отделениям больницы. На базе ЦНИЛ академии по согласованию с ректоратом РМАНПО начата реконструкция здания для постоянной собственной базы кафедры с действующим лабораторным сегментом. Усиливается взаимодействие сотрудников кафедры с клиникой РМАНПО им. Ю.Н. Касаткина. В РМАНПО вновь заработал диссертационный совет по КЛД; за последние 2 года подготовлены и защищены четыре диссертационные работы сотрудников кафедры (три



кандидатские и одна докторская). На кафедре сформированы и активно работают новые научно-методические и педагогические направления: лабораторная иммунология, экономика, управление и менеджмент лабораторной службы. Усилились межкафедральные взаимоотношения с Пензенским, Иркутским и Казанским филиалами РМАНПО, Национальным медицинским исследовательским центром им. В.А. Алмазова (кафедра лабораторной медицины с клиникой).

## Введение

В связи с реорганизационными мероприятиями изменилось название кафедры на «Клиническая лабораторная диагностика с курсом лабораторной иммунологии». На кафедре работают: заведующий М.А. Годков, профессора В.В. Долгов, С.А. Луговская, И.П. Шабалова, А.П. Ройтман, Г.А. Яровая (заслуженный деятель науки РФ), Ф.Ю. Гариб, Т.А. Старовойтова, Н.В. Боровкова, В.А. Метельская, доктора наук Е.Н. Славнова, А.П. Ризопулу, В.П. Мудров, доценты, кандидаты медицинских наук М.Е. Почтарь, Л.А. Романова, Н.Г. Ракова, А.В. Бугров, К.Т. Касоян, Т.В. Джангирова, Д.Г. Кисиличина, В.Г. Жуховицкий, А.А. Киреев, М.М. Федорова, И.И. Миронова, Е.В. Наумова, А.И. Мининкова, ассистенты, кандидаты медицинских наук М.Г. Ламбакахар, Н.А. Седова. Преподаватели кафедры составили основы творческого коллектива 2-го издания национального руководства «Клиническая лабораторная диагностика».

Благодаря усилиям сотрудников кафедры в РМАНПО восстановлен диссертационный совет по проблемам КЛД. Таким образом, кафедра КЛД с курсом лабораторной иммунологии РМАНПО встречает столетний юбилей структурообразующей единицей лабораторной службы. Первое поколение преподавателей кафедры, участвовавшее в ее создании, определило основные направления развития; последующие поколения, включая нынешнее, сохранили основные традиции, при этом кафедра развивалась согласно требованиям времени. Кафедра выполняет широкий спектр учебных, научных, методических, организационных задач, формирует уровень специалистов лабораторной службы, ориентируясь на самые высокие показатели, обеспечивает процесс внедрения медицинских изделий в лабораторную диагностику, выполняет высокотехнологичные лабораторные исследования для клинической практики.

Настоящее издание национального руководства «Клиническая лабораторная диагностика» во многом обеспечено деятельностью нескольких поколений сотрудников кафедры. Признательность ушедшим педагогам выражают ныне действующие преподаватели, всем сотрудникам кафедры КЛД с курсом лабораторной иммунологии посвящается данное руководство.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.1. Законодательство и нормативные акты, регламентирующие деятельность лабораторной службы

#### 1.1.1. Архитектура законодательных актов

Законодательство о здравоохранении — это система нормативно-правовых актов, регулирующих организационные, имущественные, неимущественные отношения, возникающие в связи с оказанием лечебно-профилактической помощи гражданам, проведением санитарно-противоэпидемических профилактических мероприятий.

Право граждан на охрану здоровья и бесплатную медицинскую помощь в государственной и муниципальной системе здравоохранения закреплено в Конституции Российской Федерации в статье 41. На Конституции Российской Федерации основывается законодательство в сфере охраны здоровья. Законодательство прямого действия — федеральные законы (ФЗ), принятые Государственной Думой. На основе ФЗ издаются постановления правительства и приказы министерств и ведомств. Для того чтобы приказы Министерства здравоохранения Российской Федерации (МЗ РФ) (или других министерств) получили правовую законодательную функцию, они проходят экспертизу и утверждаются Министерством юстиции. Приказы и распоряжения по МО должны быть основаны и не противоречить утвержденным приказам соответствующих министерств или ведомств.

**Конституция РФ** разграничивает ответственность за охрану здоровья населения между федеральными органами, субъектами РФ и местными (муниципальными) органами. Каждому гражданину Конституция гарантирует социальное обеспечение по возрасту, в случае болезни и инвалидности, потери кормильца, для воспитания детей.

**ФЗ от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»** — основной закон в сфере здравоохранения.

**Статья 1 № 323-ФЗ** регулирует отношения, возникающие в сфере охраны здоровья граждан России, и определяет:

- 1) правовые, организационные и экономические основы охраны здоровья граждан;
- 2) права и обязанности человека и гражданина, отдельных групп населения в сфере охраны здоровья, гарантии реализации этих прав;
- 3) полномочия и ответственность органов государственной власти Российской Федерации, органов государственной власти субъектов Российской Федерации и органов местного самоуправления в сфере охраны здоровья;
- 4) права и обязанности МО, иных организаций, индивидуальных предпринимателей при осуществлении деятельности в сфере охраны здоровья;
- 5) права и обязанности медицинских работников и фармацевтических работников.

**Статья 10 № 323-ФЗ** определяет, что доступность и качество медицинской помощи обеспечиваются:

- 1) организацией оказания медицинской помощи по принципу приближенности к месту жительства, месту работы или обучения;
- 2) наличием необходимого количества медицинских работников и уровнем их квалификации;
- 3) возможностью выбора МО и врача в соответствии с настоящим ФЗ;

4) применением порядков оказания медицинской помощи, клинических рекомендаций и стандартов медицинской помощи;

5) предоставлением МО гарантированного объема медицинской помощи в соответствии с программой государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи.

Для организации лабораторного обеспечения важно учитывать, что медицинская помощь классифицируется по видам, условиям и форме оказания такой помощи (статья 32 № 323-ФЗ).

Выделяют следующие виды:

- 1) первичная медико-санитарная помощь;
- 2) специализированная, в том числе высокотехнологичная, медицинская помощь;
- 3) скорая, в том числе скорая специализированная, медицинская помощь;
- 4) паллиативная медицинская помощь.

Медицинская помощь может оказываться в следующих условиях:

- 1) вне медицинской организации (по месту вызова бригады скорой, в том числе скорой специализированной, медицинской помощи, а также в транспортном средстве при медицинской эвакуации);
- 2) амбулаторно (в условиях, не предусматривающих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения), в том числе на дому при вызове медицинского работника;
- 3) в дневном стационаре (в условиях, предусматривающих медицинское наблюдение и лечение в дневное время, но не требующих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения);
- 4) стационарно (в условиях, обеспечивающих круглосуточное медицинское наблюдение и лечение).

Формы оказания медицинской помощи:

- 1) экстренная — медицинская помощь, оказываемая при внезапных острых заболеваниях, состояниях, обострении хронических заболеваний, представляющих угрозу жизни пациента;
- 2) неотложная — медицинская помощь, оказываемая при внезапных острых заболеваниях, состояниях, обострении хронических заболеваний без явных признаков угрозы жизни пациента;
- 3) плановая — медицинская помощь, которая оказывается при проведении профилактических мероприятий, при заболеваниях и состояниях, не сопровождающихся угрозой жизни пациента, не требующих экстренной и неотложной медицинской помощи, и отсрочка оказания которой на определенное время не повлечет за собой ухудшение состояния пациента, угрозу его жизни и здоровью.

**Статья 37 № 323-ФЗ** регламентирует оказание медицинской помощи (за исключением медицинской помощи, оказываемой в рамках клинической апробации) в соответствии:

- с положением об организации оказания медицинской помощи по видам медицинской помощи;
- с порядками оказания медицинской помощи;
- с клиническими рекомендациями (переход с 1 января 2025 г.);
- с учетом стандартов медицинской помощи.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

В соответствии с частью 2 статьи 37 Закона № 323-ФЗ порядки оказания медицинской помощи и стандарты медицинской помощи утверждаются уполномоченным федеральным органом исполнительной власти. На их основе с учетом особенностей половозрастного состава населения, уровня и структуры заболеваемости населения Российской Федерации, основанных на данных медицинской статистики, формируются программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи, призванные обеспечить конституционные права граждан на помощь за счет финансовых средств бюджетной системы, в том числе Фонда обязательного медицинского страхования.

**Статья 9 № 323-ФЗ.** Информационное обеспечение в здравоохранении указывает на необходимость предоставления:

- 1) сведений о медицинских и фармацевтических организациях;
- 2) аналитической информации по вопросам осуществления медицинской деятельности и оказания медицинской помощи, а также осуществления фармацевтической деятельности;
- 3) сведений о лицах, которые участвуют в осуществлении медицинской деятельности, а также о лицах, обучающихся по образовательным программам среднего профессионального и высшего медицинского образования.

**Статья 69 № 323-ФЗ** закрепляет право на осуществление медицинской деятельности и фармацевтической деятельности через процедуру аккредитации специалиста и право медицинских и фармацевтических работников проходить аттестацию на категорию.

**Статья 90 № 323-ФЗ** устанавливает необходимость осуществления внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.1.2. Лицензирование медицинской деятельности

Медицинская деятельность осуществляется в соответствии с ФЗ от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности». Лицензирование — деятельность лицензирующих органов по предоставлению лицензий, продлению срока действия лицензий в случае, если ограничение срока действия лицензий предусмотрено федеральными законами, оценке соблюдения соискателем лицензии, лицензиатом лицензионных требований, приостановлению, возобновлению, прекращению действия и аннулированию лицензий, формированию и ведению

реестра лицензий, формированию государственного информационного ресурса, а также по предоставлению в установленном порядке информации по вопросам лицензирования (статья 3 № 99-ФЗ).

Лицензированию подлежат (статья 12 № 99-ФЗ):

- медицинская деятельность (за исключением указанной деятельности, осуществляемой медицинскими организациями и другими организациями, входящими в частную систему здравоохранения, на территории инновационного центра «Сколково»);
- деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степени потенциальной опасности, осуществляемая в замкнутых системах;
- деятельность по оказанию услуг по дезинфекции, дезинсекции и дератизации в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Работа медицинских организаций осуществляется в соответствии с лицензией на вид деятельности.

Лицензия — специальное разрешение на право осуществления юридическим лицом или индивидуальным предпринимателем конкретного вида деятельности (выполнения работ, оказания услуг, составляющих лицензируемый вид деятельности), которое подтверждается записью в реестре лицензий (статья 3 № 99-ФЗ).

Порядок лицензирования медицинской деятельности определяет постановление Правительства РФ от 01.06.2021 № 852 «О лицензировании медицинской деятельности...». Контроль за процедурой лицензирования и соблюдения лицензионных требований осуществляют Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор) и территориальные органы здравоохранения. Для лабораторной службы следует учитывать требования, изложенные в постановлении Правительства РФ от 25.01.2022 № 46 «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях)», контроль за выполнением которого осуществляют Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) и территориальные органы. Организации, работающие в системе обязательного медицинского страхования, осуществляют свою деятельность в соответствии с Классификатором профилей медицинской помощи, в котором указана «Клиническая лабораторная диагностика» (код 34).

В соответствии с приложением к постановлению Правительства РФ от 01.06.2021 № 852 лабораторное обеспечение медицинской помощи осуществляется при указании в лицензии следующих видов работ (услуг) по:

- КЛД;
- лабораторной генетике;
- медицинской микробиологии;
- лабораторной диагностике (выполнение работ специалистами со средним медицинским образованием).

*Пункт 5 данного постановления* указывает, что лицензионными требованиями, предъявляемыми к соискателю лицензии на осуществление медицинской деятельности, являются:

- 1) наличие зданий, строений, сооружений и (или) помещений... отвечающих санитарным правилам, соответствие которым устанавливается в санитарно-эпидемиологическом заключении;
- 2) наличие принадлежащих соискателю лицензии на праве собственности или ином законном основании... зарегистрированных медицинских изделий (оборудование, аппараты, приборы, инструменты), необходимых для выполнения заявленных работ (услуг) и зарегистрированных в установленном порядке...;
- 3) наличие заключивших трудовые договоры работников, имеющих образование, предусмотренное квалификационными требованиями к медицинским и фармацевтическим работникам, и пройденной аккредитации специалиста или сертификата специалиста по специальности, необходимой для выполнения заявленных соискателем лицензий работ (услуг);
- 4) наличие заключивших с соискателем лицензии трудовые договоры работников, осуществляющих техническое обслуживание медицинских изделий (оборудование, аппараты, приборы, инструменты) и имеющих необходимое профессиональное образование и (или) квалификацию, либо наличие договора с организацией, имеющей лицензию на осуществление соответствующей деятельности;
- 5) соответствие структуры и штатного расписания... общим требованиям, установленным для соответствующих МО.

*Пункт 6 постановления* определяет лицензионные требования к медицинской деятельности, включая следующие:

- 1) соблюдение порядков оказания медицинской помощи, **правил проведения лабораторных**... диагностических исследований, положений об организации оказания медицинской помощи по видам медицинской помощи;
- 2) соблюдение требований, предъявляемых к осуществлению внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности...;
- 3) соблюдение порядка предоставления платных медицинских услуг...;

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

- 4) соблюдение правил регистрации операций, связанных с обращением лекарственных средств (ЛС) для медицинского применения...;
- 5) повышение квалификации специалистов, выполняющих заявленные работы (услуги), не реже 1 раза в 5 лет;
- 6) размещение информации в Единой государственной информационной системе в сфере здравоохранения.

Правила проведения лабораторных исследований утверждены приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18.05.2021 № 464н.

При намерении лицензиата осуществлять медицинскую деятельность по адресу, не указанному в реестре лицензий, и (или) выполнять работы (услуги), не предусмотренные реестром лицензий, в заявлении о внесении изменений в реестр лицензий указываются этот адрес и (или) работы (услуги), которые лицензиат намерен выполнять, и соответствующие сведения.

При организации в структуре учреждения мобильной медицинской бригады для оказания первичной медико-санитарной помощи населению, проведения профилактического медицинского осмотра, диспансеризации не требуется внесения изменений в реестр лицензий.

Лицензирующий орган осуществляет проверку полноты и достоверности содержащихся сведений, оценку соответствия лицензионным требованиям и принимает решение о внесении изменений в реестр лицензий или об отказе в срок, не превышающий 10 рабочих дней (для территорий закрытого административно-территориального образования — 15 рабочих дней) со дня получения заявления о внесении изменений в реестр лицензий.

Данные о лицензиях, содержащиеся в соответствующем реестре лицензий, получают статус открытых данных при внесении записи в соответствующий реестр, который ведется в электронном виде.

Ведение единого реестра лицензий осуществляется Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор). Оценка соблюдения медицинскими организациями лицензионных требований проводится в рамках федерального государственного контроля (надзора) качества и безопасности медицинской деятельности (статья 87 № 323-ФЗ).

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.1.3. Стандарты оказания медицинской помощи

Лабораторная служба, функционирующая в сфере государственного здравоохранения, ориентируется на утвержденную Правительством Российской Федерации Программу государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи. Программа призвана обеспечить конституционные права граждан на медицинскую помощь за счет финансовых средств бюджетной системы, в том числе Фонда обязательного медицинского страхования. Программа устанавливает перечень видов, форм и условий оказываемой бесплатно медицинской помощи, перечень заболеваний и состояний, медицинская помощь при которых оказывается бесплатно, нормативы объема медицинской помощи. Эти положения представлены в стандартах и порядках оказания медицинской помощи и вводимых законодательно клинических рекомендациях по видам оказания медицинской помощи.

Стандарты представляют собой минимально необходимый объем медицинской помощи в виде формализованного описания (в табличной форме), который должен быть оказан пациенту с конкретной нозологической формой (заболеванием), синдромом или в конкретной клинической ситуации. Они включают в себя усредненные показатели частоты предоставления и кратности применения медицинских услуг, включенных в номенклатуру, и лекарственных препаратов (алгоритм действий врача при определенной форме патологии в ее типичных вариантах).

Стандарты медицинской помощи подразделяют на следующие виды:

- 1) стандарты первичной медико-санитарной помощи;
- 2) стандарты специализированной медицинской помощи;
- 3) стандарты скорой медицинской помощи;
- 4) стандарты паллиативной медицинской помощи.

Стандартам медицинской помощи придано значение официальных документов для определения затрат на лечение. Они выведены из-под действия Федерального закона от 31.07.2020 № 247-ФЗ «Об обязательных требованиях в Российской Федерации».

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.1.4. Порядки оказания медицинской помощи

Порядки оказания медицинской помощи представляют собой официальные нормативно-правовые документы, в которых закреплена совокупность мероприятий организационного характера, направленных на своевременное оказание медицинской помощи надлежащего качества и в полном объеме.

В соответствии с Законом № 323-ФЗ выделяют:

- 1) порядки оказания медицинской помощи;
- 2) порядки проведения медицинских осмотров, диспансеризации, диспансерного наблюдения;
- 3) иные порядки, утвержденные в соответствии с Законом № 323-ФЗ.

Порядок оказания медицинской помощи разрабатывается по отдельным ее профилям, заболеваниям или состояниям (группам заболеваний или состояний) и включает в себя:

- этапы оказания медицинской помощи;
- правила организации деятельности медицинской организации (ее структурного подразделения, врача);
- стандарт оснащения медицинской организации, ее структурных подразделений;
- рекомендуемые штатные нормативы медицинской организации, ее структурных подразделений;
- иные положения, исходя из особенностей оказания медицинской помощи.

Лабораторное обеспечение порядков оказания медицинской помощи осуществляется в соответствии в Правилами проведения лабораторных исследований (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18.05.2021 № 464н). Отсутствие порядка лабораторных исследований компенсируется отдельным приказом Минздрава о правилах проведения клинических лабораторных исследований, в которых указаны структуры, штаты, оснащение КДЛ разных уровней и специализации.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.1.5. Клинические рекомендации

Переход медицинских организаций к оказанию медицинской помощи на основе утвержденных клинических рекомендаций осуществляется с 1 января 2025 года (статья 37 № 323-ФЗ).

Клинические рекомендации разрабатываются медицинскими профессиональными некоммерческими организациями по отдельным заболеваниям или состояниям (группам заболеваний или состояний) с указанием медицинских услуг, предусмотренных номенклатурой медицинских услуг. Перечень заболеваний, состояний (групп заболеваний, состояний), по которым разрабатываются клинические рекомендации, формируется уполномоченным федеральным органом исполнительной власти на основании установленных им критериев.

По каждому заболеванию, состоянию (группе заболеваний, состояний) для взрослых и детей может быть утверждено не более одной клинической рекомендации, которые должны пересматриваться не реже чем 1 раз в 3 года. Они могут иметь статус «применяется» либо «применение отложено» (в этом случае применяется предыдущая версия).

Специалисты клиничко-диагностических лабораторий не являются целевой аудиторией клинических рекомендаций, однако вовлечены в полной мере в их реализацию как представители диагностической «горизонтальной» специальности.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.2. Клиническая лабораторная диагностика в структуре здравоохранения

#### 1.2.1. Специальность «клиническая лабораторная диагностика»

Становление КЛД в качестве самостоятельной медицинской специальности состоялось лишь в начале XX в. Одно из первых определений медицинской лаборатории сформулировала Екатерина Андреевна Кост (1888–1975) — основоположник и первая заведующая первой в стране кафедрой КЛД. Согласно ее формулировке, **КДЛ** — лаборатория специального назначения, входящая в состав медицинского учреждения (больниц, клиник, поликлиник, диспансеров и пр.) и способствующая распознаванию болезней, наблюдению за динамикой их течения путем химических, физических и бактериологических исследований крови, отделений и выделений больного.

КДЛ могут осуществлять свою деятельность как в составе медицинских и санитарно-эпидемиологических организаций на правах клинического отделения, так и в качестве самостоятельных юридических лиц. Практическая деятельность КДЛ направлена на решение двух групп сопряженных диагностических задач: клинических (обследование конкретного пациента) и медико-социальных (обследование групп населения). При проведении исследований клинической направленности методами лабораторной диагностики у конкретного пациента оценивается вероятность развития либо наличия той или иной патологии, проводятся диагностика и мониторинг эффективности лечения заболеваний, осуществляется лекарственный мониторинг и решаются ряд других диагностических задач. Медико-социальные задачи, решаемые КДЛ, включают, прежде всего, массовый скрининг населения на наличие инфекционных и/или соматических заболеваний.

Исходя из изложенного, современное звучание: **КЛД** — клиническая специальность, направленная на выявление имманентных (присущих конкретному человеку или группе людей) факторов риска (генетических, конституциональных и иных особенностей пациента или группы пациентов), этиологических и патогенетических маркеров различных видов патологии (заболеваний, травм и т.п.), а также развития особых физиологических состояний (беременность, длительное пребывание в невесомости и т.п.) методами лабораторной диагностики.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.2.2. Миссия клинической лабораторной диагностики

Миссия КЛД — формирование медицинской информации о вероятности возникновения, наличии, характере и динамике развития определенных видов патологии у пациента (группы пациентов) методами лабораторной диагностики.

Миссия является базисным понятием, относящимся в равной степени ко всем структурам, занимающимся КЛД. Вне зависимости от формы собственности (государственная, муниципальная, ведомственная, частная), размеров и производительности, численности персонала или специализации **миссией лабораторных подразделений является формирование медицинской информации** о конкретном пациенте или группе пациентов.

Генерируемая медицинская информация состоит из двух обязательных компонентов:

1) первичные данные (чаще в виде цифровых материалов), полученные в ходе проведения специализированных лабораторных исследований;

2) трактовка полученных данных (в электронном виде, письменно или устно) в форме лабораторного заключения или шире — в интерпретации лабораторных исследований для врачей и пациентов.

Трактовка полученных первичных данных обязательна, может варьировать от оценки соответствия результатов тестирования биологического материала конкретного пациента референтным интервалам для соответствующей

группы пациентов до формирования полноценного клинического лабораторного заключения, нередко являющегося клиническим диагнозом и содержащего информацию по лечению и прогнозу заболевания. Трактовка полученных объективных данных осуществляется с учетом пола, возраста, диагноза, истории жизни и болезни пациента, проводимого лечения. В то же время лабораторные данные (особенно цифровые) без клиники мертвы, а клиника без лаборатории — слепа. Специализированной формой трактовки результатов является анализ результатов групповых (массовых, скрининговых) обследований пациентов. Роль врача КЛД все больше сдвигается к вербальной трактовке результатов лабораторных исследований в форме консультаций лечащего врача или пациента, а также в формате консилиума группы врачей.

Другой стороной миссии КЛД является междисциплинарная деятельность. Лабораторные исследования необходимы практически для каждой медицинской специальности. По разным оценкам, лабораторные данные предоставляют до 80% объективной информации лечащему врачу. Эта информация, как правило, не узкоспециализированная, она содержит данные, которые могут быть основой переквалификации характера патологии у пациента, привлечения для консультаций не только узкого специалиста, но и врачебного консилиума. Можно обозначить **миссию КЛД как объединительную в период специализации современной медицины**.

Еще один аспект деятельности КЛД, появившейся в последнее время, — персонализация медицинской информации. КЛД традиционно строится на стандартизации всех этапов лабораторного исследования, начиная от стандартов взятия материала пациента, стандартного аналитического исследования и стандартного лабораторного заключения. Это связано в значительной мере с междисциплинарной функцией лабораторных данных. Появление лабораторных исследований на уровне нанотехнологий изменило традиционный уклад. На уровне отдельных молекул исчезают многие традиционные лабораторные подходы к диагностике, уходят популяционные диапазоны. На смену приходят данные о персональных лабораторных показателях, о достижении критических значений лабораторных показателей. Лабораторные исследования становятся проводниками персонализированной диагностики, контроля за эффективностью таргетных препаратов, определения генетических полиморфизмов в предсказательной диагностике. Таким образом, КЛД наряду с выполнением скрининговых, специализированных исследований приобретает **миссию персонализированной медицинской специальности**.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.2.3. Цели и задачи клинической лабораторной диагностики

Клинические лабораторные исследования проводятся в целях выявления факторов риска и (или) причин заболевания, диагностики заболевания, определения тяжести процесса и прогноза болезни, мониторинга лечения, определения безопасности донорской крови, определения концентрации токсических веществ.

Основными задачами КЛД являются:

- проведение клинических лабораторных исследований в соответствии с профилем согласно заявленной номенклатуре исследований при аккредитации КДЛ;
- внедрение прогрессивных форм работы;
- освоение и использование новых методов исследований, имеющих высокую аналитическую точность и диагностическую надежность;
- обеспечение качества лабораторных исследований путем выполнения стандартов лабораторного исследования, систематического проведения контроля качества;
- оказание консультативной помощи врачам лечебных отделений в выборе наиболее диагностически информативных лабораторных тестов и трактовке данных лабораторного обследования больных;
- обеспечение клинического персонала, занимающегося сбором биологического материала, детальными инструкциями о правилах взятия, хранения и транспортировки биоматериала, обеспечивающими стабильность образцов и надежность результатов; ответственность за точное соблюдение этих правил клиническим персоналом несут руководители клинических подразделений;
- повышение квалификации персонала лаборатории;
- проведение мероприятий по охране труда персонала, соблюдение техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима в КДЛ;
- ведение учетно-отчетной документации в соответствии с утвержденными формами;
- ведение биобанка;
- оценка популяционного здоровья;
- выполнение эпидемиологических задач.

КЛД носит комплексный характер, обусловленный наличием нескольких субдисциплин: общеклинические исследования, клиническая гематология, клиническая биохимия, клиническая цитология, лабораторная иммунология, коагулология, молекулярная диагностика, диагностика неотложных критических состояний. Несмотря на существование нескольких субдисциплин, это единая специальность (служба), основной характеристикой которой является исследование биопроб человека в условиях *in vitro* с диагностическими целями.

Высказывается мнение, что логично объединить специальности «КЛД», «лабораторная генетика», «медицинская микробиология», предметом изучения которых является материал от человека *in vitro*, в единую специальность «лабораторная медицина». Методы исследования могут быть разнообразными, миссия едина — формирование медицинской информации о конкретном пациенте или группе пациентов методами лабораторной медицины.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.3. Организации, действующие в области клинической лабораторной диагностики

В области КЛД активно работают государственные федеральные, региональные, профессиональные и общественные организации.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.3.1. Служба главного специалиста

Служба главного специалиста — одна из традиционных форм взаимодействия законодательной власти с лабораторным сообществом. Иерархия службы включает главного специалиста МЗ РФ, главных специалистов федеральных округов, территориальных органов управления здравоохранением (областей, городов и даже городских районов), ведомств. Несмотря на то что главные специалисты назначаются органами управления здравоохранением, эта служба всегда представляла интересы лабораторного сообщества, поднимая наиболее актуальные вопросы лабораторной службы, тесно взаимодействуя с общественными профессиональными организациями. В частности, установилась полезная практика проводить профильные комиссии Минздрава по КЛД в рамках российских научно-практических мероприятий. Региональные конференции, на которых представляются результаты работы КДЛ территорий, проводятся, как правило, по инициативе главных специалистов.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.3.2. Кафедры клинической лабораторной диагностики

В России нет профильного научного центра по лабораторной медицине, который обеспечивал бы научно-методическую деятельность в области КЛД. Если кафедры КЛД в период становления специальности создавались на последипломном этапе дополнительного профессионального образования, то сейчас большинство кафедр и курсов по КЛД и сопряженным специальностям (микробиологии, генетике) работают также на этапе высшей школы, предоставляя будущим врачам-клиницистам необходимую информацию о возможностях лабораторных исследований, правилах их выполнения и интерпретации результатов.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.3.3. Федеральная система внешней оценки качества

ФСВОК — уникальная для нашей страны организация в системе здравоохранения, которая уже на протяжении более чем 30 лет обеспечивает единство лабораторных исследований, поддерживает качество лабораторных исследований путем сличения результатов медицинских лабораторий, участвует в разработке и внедрении лабораторных стандартов, в экспертизе контрольных материалов (КМ), в аттестации экспертных КДЛ. Более 100 программ внешней оценки качества (ВОК) лабораторных исследований позволяют охарактеризовать уровень лабораторной службы страны и сопоставить его с зарубежными клиническими лабораторными службами. ФСВОК в нашей стране с момента образования в 90-х гг. прошлого столетия всегда выполняла информационно-аналитическую роль, не претендуя на выполнение контрольных (фискальных) функций. Это снискало признание ФСВОК и ее головной организации — Центра внешней оценки качества — в лабораторной среде. Важными являются образовательная деятельность Центра внешней оценки качества, их инициатива по распространению учебно-методической литературы среди специалистов лабораторной службы, подключение к работе КДЛ стран Содружества Независимых Государств.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.3.4. Федерация лабораторной медицины

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «ФЛМ» объединяет юридические и физические лица, деятельность которых связана с лабораторной медициной, создана для представления профессиональных интересов, для достижения общественно полезных целей, содействия развитию эффективного взаимодействия лабораторной службы с государственными представительными и исполнительными органами власти России, усиления влияния на выработку правовой, экономической и социальной политики. В состав ФЛМ вошли несколько общественных организаций, в том числе Научно-практическое общество специалистов КЛД, которое было исторически основной общественной организацией КЛД.

Ассоциация осуществляет следующие виды деятельности:

- участвует в разработке и способствует принятию национальных стандартов в области лабораторной медицины;
- содействует повышению качества и безопасности предоставления медицинской помощи;
- разрабатывает и вносит предложения на рассмотрение заинтересованных государственных органов и организаций, принимает участие в разработке перспективных и текущих планов развития здравоохранения, повышения качества медицинской помощи населению;
- содействует внедрению в практику новейших достижений мировой медицины;
- содействует аттестации специалистов лабораторной службы и получения ими квалификационных категорий;
- организует информационную, консультационную и методическую помощь;
- представляет интересы членов ассоциации в органах государственной власти и в органах местного самоуправления;

- осуществляет издательскую деятельность, участвует в выпуске профильных журналов, сборников, монографий, энциклопедических и научно-популярных изданий;
- представляет интересы российской лабораторной службы в международных организациях.

Структурными подразделениями ФЛМ являются комитеты, они выполняют экспертные, аналитические, консультационные, научные, образовательные и коммуникационные функции, а также способствуют достижению консолидированной позиции для разработки и совершенствования законодательства в области охраны здоровья граждан, регулирующего деятельность лабораторной службы. Консолидирующую роль ФЛМ выполняет при организации и проведении российских и региональных научных форумов и конференций, при делегировании членов ассоциации на международные научные мероприятия, в первую очередь в страны ближнего зарубежья. ФЛМ имеет региональные комитеты, что позволяет консолидировать лабораторную службу, представлять интересы территориальных обществ и ассоциаций в органах федерального управления здравоохранением, оказывать регионам консультативно-методическую и юридическую помощь. В состав ФЛМ входят компании, работающие в области лабораторной медицины, что важно для продвижения передовых технологий в практическое здравоохранение.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.4. Научная составляющая клинической лабораторной диагностики

Вклад лабораторной медицины в здравоохранение значителен. В настоящее время 70–80% клинических решений основываются на лабораторных данных по сравнению с 10–15% 40 лет назад. Некоторые лабораторные тесты в определенных пороговых точках определяют клинические решения, например гликированный гемоглобин (HbA<sub>1c</sub>) при сахарном диабете (СД) или тропонин при остром коронарном синдроме (ОКС), результаты иммунофенотипирования при лимфопролиферативных заболеваниях. Клинические рекомендации часто основной задачей лечения ставят достижение пороговых значений лабораторных показателей, современные лабораторные исследования лежат в основе принятия клинических решений. Фактически произошло переосмысление роли лабораторной медицины; из специальности, которая в традиционной медицине выполняла роль простого тестирования, современные клинические лаборатории становятся ведущими в миссии «профилактика, диагностика, оценка эффективности лечения и прогноз течения заболевания». Очевидно, что клиническая лаборатория становится центром принятия клинических решений.

Реализация столь масштабных задач не может быть выполнена без научного обоснования лабораторных исследований. Клиническая лабораторная диагностика стала полноправной научной специальностью. Метод исследования клинической медицины — комплексный анализ с использованием биохимических, иммунологических, биофизических, цитологических, молекулярно-биологических методов. Предметом (объектом) исследования является биоматериал от живого человека в условиях *in vitro*.

Формализованными признаками научной дисциплины является то, что КЛД — дисциплина Высшей аттестационной комиссии (ВАК), функционируют защитные диссертационные советы, издаются специализированные научные журналы, проводятся научные форумы, осуществляется международное сотрудничество. Большинство диссертаций медицинского и фармакологического направлений основывается на данных лабораторных исследований.

Одна из основополагающих характеристик научной дисциплины — постоянный прогресс, непрерывное развитие специальности. Лабораторная медицина наряду с расширением диагностического тестирования активно включилась в современные направления развития технологий. Новой задачей лабораторного специалиста стало внедрение цифровых решений в лабораторной медицине, в частности лабораторная поддержка клинических решений.

Лабораторная поддержка клинических решений в режиме реального времени анализирует данные в лабораторной информационной системе (ЛИС) или в базе данных пациентов и на других платформах, таких как электронные медицинские карты или электронные справочники. Лабораторная поддержка клинических решений за миллисекунды консолидирует информацию, подсчитывает общие баллы и способна рекомендовать действия в соответствии с установленными клиническими рекомендациями или стандартами ведения пациентов с диагностированным заболеванием. Решения, основанные на искусственном интеллекте или машинном обучении, могут обрабатывать огромные объемы данных для обнаружения закономерностей и как предоставлять информацию в режиме реального времени, так и прогнозировать клинические решения и формулировать рекомендации пациентам. Лабораторная поддержка клинических решений может применяться в повседневной клинической практике, в клинике для оценки рисков, в анестезиолого-реанимационных отделениях, для которых важна ранняя диагностика. Целью научных исследований является разработка лабораторных технологий для ранней диагностики заболевания, использования адекватного лечения, снижения осложнений и смертности пациентов и, следовательно, общего повышения эффективности здравоохранения. Лабораторная медицина за достаточно короткий период времени прошла путь от простого тестирования до переднего края борьбы за спасение жизней пациентов.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.4.1. Диссертационные советы и публикации

На июль 2024 г. в Российской Федерации действовали шесть диссертационных советов, в которых можно защитить диссертацию по специальности 3.3.8 «Клиническая лабораторная диагностика». Четыре совета работают в Москве, два — в Санкт-Петербурге, из них два диссертационных совета присваивают ученую степень по биологическим и медицинским наукам, три совета рассматривают работы по медицинским наукам и один совет имеет право присваивать степень только по биологическим наукам.



ВАК провела ряд реформ, направленных на повышение качества диссертационных исследований. В частности, для защиты диссертации нужны публикации в журналах из перечня, которые были рекомендованы ВАК не только по специальности, но и по научной отрасли (медицинские или биологические науки), по которой представляется диссертационная работа. Аналогичные требования к научным публикациям предъявляются при получении ученых званий. Многие преподаватели высших учебных заведений переведены на работу по «эффективному контракту», который предусматривает требования к научной, в том числе публикационной, активности. Публикационная активность сотрудников вуза и научных учреждений перестала быть частным делом преподавателя, поскольку она влияет не только на величину заработной платы, но и на показатели учреждения в многочисленных рейтингах. ВАК издал приказ о перечне рецензируемых журналов, в которых возможна публикация основных положений диссертационных исследований применительно к специальности 3.3.8 «Клиническая лабораторная диагностика», их распределение по научным отраслям, а также анализ публикационной активности этих журналов. В списке ВАК от июля 2024 г. содержатся сведения о 3151 научном издании по всем отраслям науки, в 79 из них возможны публикации по направлению «Клиническая лабораторная диагностика». Наиболее авторитетный в нашей специальности журнал «Клиническая лабораторная диагностика» [ISSN 0869-2084 (Print), ISSN 2412-1320 (Online)] входит в перечень ВАК.

Журналы по специальности КЛД и по направлению «Лабораторная медицина» выполняют важную роль в пропаганде лучших практик в этой сложной, многогранной дисциплине. Важно, что в журналах публикуются научно-практические результаты, материалы диссертационных исследований, принципиальные статьи и обзоры ведущих отечественных и зарубежных авторов, дискуссии по актуальным проблемам, разъяснения законодательных актов, случаи из практики. Все это формирует единое пространство специальности и позволяет охарактеризовать КЛД как интегральную медицинскую специальность, имеющую свой предмет, цели и задачи.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.4.2. Другие атрибуты научного направления лабораторной медицины

*Руководства, монографии, атласы, учебные пособия* активно издаются в Российской Федерации. Данное, второе, издание национального руководства по КЛД — свидетельство этой деятельности. По специальности издан двухтомный учебник «Клиническая лабораторная диагностика». Ежегодно в разных издательствах выпускается научная, учебная, практическая литература по специальности, востребованная не только специалистами лабораторной службы, но и врачами других специальностей, организаторами здравоохранения, учащимися высших учебных заведений. Под эгидой ФЛМ кафедрой КЛД через издательство «ГЭОТАР-Медиа» выпускается уникальная серия «Клиническая лаборатория — врачу-клиницисту», в которой на конкретных клинических случаях интерпретируются результаты лабораторных исследований.

*Конгрессы и конференции* стали постоянными атрибутами лабораторной медицины в России. Ежегодный конгресс лабораторной медицины (РКЛМ), организуемый ФЛМ и проходящий в рамках Российского диагностического саммита — один из наиболее представительных среди научно-практических мероприятий в медицинской среде. Ни одно другое ежегодное мероприятие не может сравниться по количеству участников, широте охвата поднимаемых вопросов, представительству компаний — участников сопряженной выставки медицинского оборудования. Кафедра клинической лабораторной медицины ежегодно, включая период пандемии, организует и проводит очно всероссийские научно-практические конференции, в 2025 г. состоится 30-я, юбилейная конференция кафедры. ФЛМ поддерживает несколько ежегодных российских форумов по лабораторной медицине. В регионах систематически проходят региональные конференции, на которых как обсуждаются локальные проблемы, так и выступают ведущие специалисты КЛД страны. Эти научные форумы позволяют поддерживать высокий научно-практический потенциал специальности, консолидировать специальность в стране и странах ближайшего окружения, передавать практический опыт молодым специалистам, которые активно включаются в развитие специальности. На профессиональных форумах по лабораторной медицине всегда присутствуют врачи других специальностей, что важно для продвижения достижений лабораторной науки в практику здравоохранения. В то же время специалисты КЛД востребованы на медицинских форумах широкого круга медицинских специальностей.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.5. Организация деятельности клинко-диагностических лабораторий

В соответствии с миссией КЛД, сформулированной выше, лабораторные исследования проводятся с целью выявления вероятности возникновения, наличия, характера и динамики развития определенных видов патологии у пациентов, выступают в качестве скрининговых технологий оценки распространенности (или вероятности распространения) заболеваний, в том числе инфекционных. Этими особенностями определяются объект и субъект лабораторного исследования.

*Субъект исследования:* конкретный человек (пациент).

*Объект исследования:* человек как биологический вид (группа или когорта пациентов или обследуемых контингентов).

*Предметом клинических лабораторных исследований* является биологический материал человека.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.5.1. Типы клинко-диагностических лабораторий

*КДЛ* подразделяются на:

- КДЛ общего типа — многопрофильные, обеспечивают разные виды исследований, выполняют плановую лабораторную диагностику в МО и мониторинг лечения больных, обеспечивая повседневные потребности лечащих врачей в наиболее распространенных исследованиях;
- специализированные лаборатории — для узкого спектра исследований (цитологические лаборатории, микробиологические и др.);
- экспресс-лаборатории — для экстренного круглосуточного выполнения исследований по неотложным показаниям;
- централизованные КДЛ — для выполнения исследований нескольких МО.

Централизованные КДЛ создаются по указанию соответствующих территориальных органов управления. Организационная структура и порядок финансирования устанавливаются органом управления здравоохранением с учетом выполняемых ими задач и в соответствии с договором об участии лабораторий в осуществлении территориальных медицинских программ. В крупных городах, в частности в Москве, централизация лабораторных исследований является приоритетным направлением организации лабораторной службы. Создание крупных автоматизированных лабораторных комплексов, обслуживающих группу МО и выполняющих широкий перечень лабораторных исследований, позволяет увеличить производительность и оптимизировать расходы на лабораторную диагностику. Это достигается за счет применения более рациональных методов контроля и управления ресурсами, внедрения технологий управления качеством лабораторных исследований, автоматизации исследований. Лабораторная служба, интегрированная в систему городских медицинских учреждений, имеет три уровня организации оказания помощи.

- 1-й уровень — лаборатории малой мощности, обеспечивающие в основном выполнение исследований для одной МО, в том числе оказывающей первичную медико-санитарную помощь.
- 2-й уровень — лаборатории средней мощности, выполняющие клинико-диагностические лабораторные исследования для МО, имеющих в своем составе диагностические отделения (функциональной, ультразвуковой, рентгенодиагностики и лабораторной диагностики), поликлиник, стационаров. Специализированные лаборатории обеспечивают выполнение исследований по отдельным видам клинических лабораторных исследований.
- 3-й уровень — крупные лаборатории многопрофильных МО, специализированные, централизованные и межрайонные лаборатории, обеспечивающие выполнение различных, в том числе уникальных и высокотехнологичных, видов исследований (диагностические центры, краевые, областные и городские больницы и другие МО).

Формирование лаборатории того или иного типа, а также структура лабораторной службы учреждения определяются медико-экономической задачей МО и самой лабораторией.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.5.2. Этапы лабораторного исследования

В соответствии с приказом МЗ РФ от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении правил проведения лабораторных исследований» лаборатория осуществляет следующие функции: прием образцов биологического материала человека; отбраковку биоматериала, непригодного для выполнения исследования; анализ причин «брака» с последующим доведением этой информации до сведения медицинских работников, принимающих участие в преаналитическом процессе; выполнение клинических лабораторных исследований; оценку и валидацию результатов клинических лабораторных исследований; интерпретацию результатов клинических лабораторных исследований; обеспечение качества клинических лабораторных исследований; проведение межлабораторных сличений; разработку и осуществление мер, предупреждающих негативное влияние факторов преаналитического (нарушение правил взятия, маркировки, хранения, первичной обработки биоматериала), аналитического (нарушение правил проведения аналитической процедуры, ошибки калибровки метода и настройки измерительного прибора, использование реагентов и других расходных материалов, не допущенных к использованию) и постаналитического (оценка достоверности полученных результатов исследований, их интерпретация) этапов, способных помешать получению достоверного результата исследования и его правильной оценки; разработку и внедрение в работу стандартных операционных процедур (СОП) в области клинических лабораторных исследований; обеспечение мер биологической безопасности при работе с потенциально инфицированным биоматериалом; предоставление отчетности в установленном порядке, сбор и предоставление первичных данных о медицинской деятельности для информационных систем в сфере здравоохранения.

С целью эффективного выполнения перечисленные функции распределяются на производственные этапы лабораторной диагностики:

- преаналитический:
  - долабораторный;
  - лабораторный;
- аналитический;
- постаналитический:
  - лабораторный;
  - внелабораторный.

*Преаналитический долабораторный (внелабораторный) этап* включает: выбор и назначение лабораторного исследования в соответствии с порядками оказания медицинской помощи и с учетом стандартов медицинской помощи; оформление направления на исследование; инструктаж пациента по правилам подготовки к клиническому лабораторному исследованию; взятие (сбор) биоматериала; маркировку и идентификацию биоматериала; хранение и транспортировку биоматериала к месту проведения исследования.

*Преаналитический лабораторный этап* проводится медицинскими работниками со средним медицинским образованием и включает: прием, регистрацию, сортировку и идентификацию биоматериала (вручную или с применением автоматизированных систем); проверку соответствия типа контейнера (пробирки) и заявленного биоматериала перечню лабораторных исследований; проверку качества поступившего биоматериала; выбраковку биоматериала ненадлежащего качества; обработку биоматериала для получения аналитической пробы; распределение биоматериала по видам и методам клинических лабораторных исследований; формирование рабочих листов по методикам исследований в электронном виде или на бумажных носителях; подготовку рабочего места, реагентов, расходного материала и лабораторного оборудования для проведения клинических лабораторных исследований в соответствии с СОП, с соблюдением правил эксплуатации оборудования и техники безопасности.

*Аналитический этап* включает проведение клинических лабораторных исследований с использованием аналитических методик, реагентов и оборудования, имеющих регистрационное удостоверение и разрешенных для применения на территории Российской Федерации, с выполнением ежедневного контроля качества лабораторных исследований и регулярного участия в межлабораторных сличительных испытаниях.

*Постаналитический лабораторный этап* включает: валидацию результатов исследований, интерпретацию результатов с оформлением лабораторного заключения (при необходимости), передачу результатов лечащему врачу или пациенту, интерпретацию лечащим врачом в совокупности с другими сведениями о пациенте, хранение биоматериала (при необходимости) при обязательном создании условий для их хранения без потери информативности. Лабораторное заключение о результатах клинических лабораторных исследований должно содержать:

- наименование, контактный телефон и адрес электронной почты МО (лаборатории);
- фамилию, имя, отчество (при наличии) пациента, пол, дату его рождения, при необходимости — дополнительные данные: номер страхового полиса, номер истории болезни (при наличии);
- дату и время поступления биоматериала; наименование биоматериала, с использованием которого проводились клинические лабораторные исследования; тип пробы или указание локализации, откуда был взят биоматериал, и способ взятия (при необходимости); метод исследования (при необходимости);
- результаты клинических лабораторных исследований, выраженные в соответствующих единицах измерения, в сопоставлении с референтными интервалами с использованием четырех видов шкал (количественной, номинальной, описательной и порядковой);
- заключение по результатам клинических лабораторных исследований (при необходимости), требующих оценки врача КЛД или врача — лабораторного генетика;
- дату выполнения исследования; фамилию, имя, отчество (при наличии) и должность медицинского работника, проводившего исследование; номер страницы из общего числа страниц отчета; сведения об использованных медицинских изделиях *in vitro*-диагностики с указанием тест-системы (название, номер лота/серии, срок годности) и оборудования (название анализатора) при проведении исследований для диагностики социально значимых инфекций иммунохимическими методами [иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохемилюминесцентный анализ и иные методы].

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

При проведении цитологических исследований результатом исследования является цитологический диагноз, который формулируется с использованием цитологических и гистологических терминов в соответствии с международными классификациями и Международной классификацией болезней. Отчет о результатах исследований выдается пациенту, его законному представителю или лечащему врачу либо в направившую МО на бланке организации, проводившей исследование, в электронном виде или на бумажном носителе при соблюдении требований законодательства России по защите конфиденциальной информации и персональных данных.

*Постаналитический внелабораторный этап* осуществляется при необходимости интерпретации результатов клинических лабораторных исследований в сложных диагностических или лечебных ситуациях. В этих случаях врачи КЛД, врачи — лабораторные генетики и врачи — медицинские микробиологи приглашаются для участия в консилиуме врачей, в том числе с использованием телемедицинских технологий.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.5.3. Группы методов, категории сложности

Методы лабораторной диагностики по направленности разделяются на:

- усиливающие воспринимающие возможности человека, например оптическая микроскопия;
- оценивающие характерные биологические особенности исследуемого организма, например биохимия, серология, цитометрия;
- исследующие характерные особенности патологического агента: биологические, культуральные, химико-аналитические и др.

Клинические лабораторные исследования включают химико-микроскопические, гематологические, цитологические, биохимические, коагулологические, иммунологические, молекулярно-генетические, химико-токсикологические. Клинические лабораторные исследования проводятся с использованием микроскопических, химических, биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических технологий.

По категориям сложности клинические лабораторные исследования подразделяются на следующие.

- Первой категории сложности (базовые или простые), к которым относятся исследования по обнаружению и (или) измерению количества аналита в биологических образцах, оценке физико-химических свойств биологических жидкостей с помощью ручных методов, исследования при помощи тест-полосок и/или проведение исследований по месту оказания медицинской помощи. Эти методы могут выполнять лица без специальной подготовки по лабораторной диагностике, в частности бригада скорой медицинской помощи.
- Второй категории сложности (технологичные), к которым относятся исследования, выполняемые с использованием полуавтоматических и автоматических анализаторов, автоматизированных систем анализа, результаты которых проходят первичную оценку при сопоставлении полученных данных с референтными интервалами и пороговыми значениями; при наличии отклонений результаты дополнительно валидируются сотрудником лаборатории. Эти исследования корреспондируются для выполнения специалистами со средним медицинским образованием.
- Третьей категории сложности (аналитические), к которым относятся исследования на полуавтоматических и автоматических анализаторах, в том числе высокотехнологичных, автоматизированных системах анализа, а также морфологические исследования, которые требуют дополнительной валидации результатов при отклонении от референтного интервала и (или) лабораторного заключения с описанием выявленных патологических процессов. Эти аналитические исследования в основном возлагаются на специалистов с высшим немедицинским образованием (биологи).
- Четвертой категории сложности (клинико-аналитические), к которым относятся исследования на полуавтоматических и автоматических анализаторах, в том числе высокотехнологичных, автоматизированных системах анализа, для валидации результатов которых требуется анализ клинической ситуации, знание патофизиологических процессов и (или) формирование клинико-лабораторного заключения, консультирование лечащих врачей с рекомендациями по дальнейшему лабораторному обследованию пациентов. Прерогатива этих исследований отводится врачам КЛД.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.5.4. Номенклатура клинических лабораторных исследований

Номенклатура клинических лабораторных исследований — это совокупность названий, употребляемых в перечне клинических лабораторных исследований. Развитие фундаментальных и прикладных научных дисциплин значительно расширило круг лабораторных исследований, выполняемых в целях диагностики болезней и контроля за состоянием пациентов. В целях унификации терминологии при составлении учетно-отчетных документов, совершенствования планирования деятельности лабораторной службы и оценки объема работы КДЛ приказом МЗ РФ от 21.02.2000 № 64 «Об утверждении Номенклатуры клинических лабораторных исследований» эта номенклатура была утверждена. Затем Номенклатура была переработана в виде Справочника лабораторных тестов, который представляет собой систематизированный перечень лабораторных исследований и включает следующие разделы:

- химико-микроскопические исследования (общеклинические исследования);
- гематологические исследования;
- биохимические исследования;
- коагулологические исследования;
- цитологические исследования;
- иммунологические исследования, в том числе иммуногематологические исследования;
- химико-токсикологические исследования;
- микробиологические исследования;
- молекулярно-биологические методы, в том числе молекулярно-генетические, протеомные, цитогенетические;
- лекарственные средства для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

По мере развития лабораторной службы и внедрения новых технологий появилась необходимость использовать Справочник лабораторных тестов как основную структурную единицу Федерального справочника лабораторных исследований. Он содержит максимально полный набор лабораторных тестов, которые могут быть выполнены в медицинской лаборатории и в виде результата исследования переданы в медицинские информационные системы (приказ Минздрава России от 27.08.2020 № 906н «Об утверждении перечня, порядка ведения и использования классификаторов, справочников и иной нормативно-справочной информации в сфере здравоохранения»). На основе Федерального справочника лабораторных исследований разрабатываются структурированные электронные медицинские документы.

Перечень лабораторных тестов из Федерального справочника лабораторных исследований включен в Номенклатуру медицинских услуг, построенную по комбинированной классификационной системе с использованием иерархического и фасетного методов классификации услуг в сфере здравоохранения.

Медицинская организация, проводившая лабораторные исследования, предоставляет информацию о результатах исследований в федеральный реестр электронных медицинских документов единой государственной информационной

системы в сфере здравоохранения (постановление Правительства Российской Федерации от 9 февраля 2022 г. № 140 «О единой государственной информационной системе в сфере здравоохранения»).

В номенклатуре отдельно выделен раздел «ЛС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга». Это чрезвычайно важный аспект деятельности КДЛ, который следует из расширения ЛС таргетного назначения. Эти средства применяются в микрограммовых количествах, но обладают выраженными метаболическими эффектами и требуют индивидуального контроля дозирования для оптимального соотношения эффективности и безопасности. В этой связи встает вопрос об оснащении КДЛ аналитическим оборудованием нового поколения, включая хроматографы высокой эффективности (высокоэффективная жидкостная хроматография), масс-спектрометрами, аппаратурой для капиллярного электрофореза, приборами для секвенирования и т.д.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.6. Кадровое обеспечение клинико-диагностических лабораторий

#### 1.6.1. Штатное расписание клинико-диагностических лабораторий

КДЛ должна располагать необходимыми ресурсами персонала. Штатный состав КДЛ, как и других отделений МО, утверждается приказом главного врача, в котором учитываются приказы МЗ РФ о формировании штатов МО и рекомендации о штатных нормативах КДЛ с учетом фактической потребности конкретной МО в количестве и видах лабораторных исследований. В КДЛ в зависимости от объема исследований и направления деятельности предусмотрены наименования следующих штатных единиц:

- заведующий КДЛ (отделом, отделением) — врач КЛД;
- врач КЛД/врач — лабораторный генетик/врач — медицинский микробиолог/ врач-бактериолог/биолог/врач-лаборант/химик-эксперт;
- медицинский технолог, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), лаборант, старший технолог/техник/лаборант;
- санитар.

На должность заведующего КДЛ назначается специалист, соответствующий квалификационным требованиям к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «здравоохранение и медицинские науки», утвержденным приказом МЗ РФ по специальности «клиническая лабораторная диагностика», и профессиональному стандарту «Специалист в области клинической лабораторной диагностики», прошедший аккредитацию специалиста, имеющий стаж работы по специальности не менее 3 лет и прошедший повышение квалификации по специальности «организация здравоохранения и общественное здоровье». Специалист с высшим немедицинским образованием также может работать на должности заведующего лабораторией в соответствии с действующей законодательной базой.

На должность врача КЛД, врача — лабораторного генетика, врача — медицинского микробиолога назначаются специалисты, имеющие медицинское образование и прошедшие аккредитацию по соответствующей специальности.

На должность биолога, химика-эксперта назначается специалист с высшим профессиональным (немедицинским) образованием, имеющий дополнительное профессиональное образование в соответствии с направлением профессиональной деятельности. На должности врача-лаборанта работает специалист с высшим немедицинским образованием, назначенный на эту должность до 1 октября 1999 г.

На должность медицинского технолога, медицинского лабораторного техника (фельдшера-лаборанта), лаборанта назначается медицинский работник, соответствующий квалификационным требованиям к медицинским и фармацевтическим работникам со средним медицинским и фармацевтическим образованием по специальности «лабораторная диагностика» или «лабораторное дело».

Квалификация работника КДЛ определенного вида профессиональной деятельности должна соответствовать характеристикам, представленным в соответствующем профессиональном стандарте. Возглавляется КДЛ лицом, обладающим ответственностью за исполнение обязанностей и компетентностью для обеспечения выполнения лабораторией исследований, руководство лабораторией должно гарантировать компетентность сотрудников лаборатории, выполняющих преаналитические процедуры, измерение аналитов, оценку качества результатов и приемлемость выдаваемой лабораторной информации. На должности специалистов КДЛ зачисляются лица, имеющие, соответствующее, высшее или среднее профессиональное (медицинское или немедицинское) образование, дополнительное профессиональное образование и аккредитацию специалиста по специальности в соответствии с квалификационными требованиями в сфере здравоохранения, утверждаемыми в установленном порядке. Для специалистов с высшим медицинским образованием поступление на должность врача КЛД возможно:

- после окончания ординатуры по специальности «клиническая лабораторная диагностика»;
- после прохождения профессиональной переподготовки по специальности «клиническая лабораторная диагностика» при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей укрупненных групп специальностей «Клиническая медицина» или «Науки о здоровье и профилактическая медицина» (с 1 января 2016 г.);
- после окончания высшего учебного заведения по специальности 30.05.01 «Медицинская биохимия» и успешной первичной аккредитации.

В руководстве по качеству должны быть данные о персонале лаборатории: состав, базовая профессиональная подготовка, квалификация, сведения о прохождении различных форм обучения, данные по аккредитации каждого сотрудника.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.6.2. Профессиональные стандарты специалистов лабораторной службы и аккредитация

Требование о наличии профессионального стандарта введено в ФЗ № 236-ФЗ от 03.12.2012 «О внесении изменений в Трудовой кодекс Российской Федерации». В области лабораторной медицины компетенции специалистов с высшим образованием определяют профессиональные стандарты:

- специалист в области КЛД;
- врач-биохимик;
- врач — медицинский микробиолог.

По специальности «лабораторная генетика» используется профессиональный стандарт «Специалист в области клинической лабораторной диагностики».

Для специалистов со средним медицинским образованием (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант) действует профессиональный стандарт «Специалист в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием».

Профессиональный стандарт — это характеристика квалификации работника, то есть уровень его знаний, умений, профессиональных навыков и опыта. Профессиональные стандарты применяются работодателями при формировании кадровой политики и в управлении персоналом, разработке должностных инструкций, тарификации работ, присвоении тарифных разрядов, установлении системы оплаты труда. Образовательные организации обязаны использовать профессиональные стандарты при разработке образовательных программ подготовки и переподготовки специалистов. Профессиональные стандарты построены по единой форме. Формулируется цель профессиональной деятельности по специальности, указываются обобщенные трудовые функции, по которым проводится аккредитация специалистов, раскрываются конкретные трудовые функции, трудовые действия, необходимые знания и умения, требования к образованию и обучению, опыту практической работы.

В профессиональном стандарте «Специалист в области клинической лабораторной диагностики» основная цель обозначена как клиничко-лабораторное обеспечение медицинской помощи. Сформулированы три обобщенные трудовые функции для:

- специалистов с немедицинским образованием — выполнение, организация и аналитическое обеспечение клинических лабораторных исследований;
- врачей КЛД — наряду с выполнением, организацией и аналитическим обеспечением клинических лабораторных исследований упор делается на консультирование медицинских работников и пациентов;
- заведующих (руководителей) лабораторными подразделениями — организация работы и управление лабораторией.

*Профессиональный стандарт декларирует профессиональную аккредитацию специалистов. Виды аккредитации:*

- первичная аккредитация проводится по окончании высшего учебного заведения; врачи с квалификацией «врач-биохимик», аккредитованные согласно профессиональному стандарту «Врач-биохимик», могут работать в КДЛ на должности «врач КЛД, уровень квалификации 7»;
- первичная специализированная аккредитация проводится по окончании ординатуры по специальности «КЛД» или профессиональной переподготовки по этой специальности согласно профессиональному стандарту «Специалист в области клинической лабораторной диагностики». Врачи могут работать в КДЛ на должности «врач КЛД, уровень квалификации 8»;
- периодическая аккредитация проводится 1 раз в 5 лет: одно из требований — повышение квалификации.

В профессиональном стандарте «Специалист в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием» основная обобщенная трудовая функция — выполнение клинических лабораторных исследований первой и второй категории, включая первичную интерпретацию результатов лабораторных исследований по полученным описательным, полуколичественным и количественным данным, сопоставление с референтным интервалом. Для них также предусмотрена первичная и периодическая (1 раз в 5 лет) аккредитация после повышения квалификации.

Таким образом, профессиональный стандарт определяет требования к профессиональным качествам специалистов, аккредитация проверяет соответствие специалистов этим требованиям. Специалисты, успешно прошедшие аккредитацию, допускаются к работе в КДЛ.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.6.3. Повышение квалификации

Система повышения квалификации на профильных кафедрах является не только освоением навыков, но и технологией формирования единого подхода к профессии, организационно-практического наставничества по созданию в стране профессионального подхода к работе КДЛ. Профильные кафедры КЛД стараются придерживаться единых программ обучения ординаторов, курсантов на циклах профессиональной переподготовки, работают согласованно при повышении квалификации специалистов КЛД. Согласованные программы, учебные руководства, пособия, постоянный обмен опытом на конференциях — все это создает единую базу в стране работы лабораторной службы.

В отсутствие профильного научно-исследовательского института по КЛД именно на кафедры легла основная нагрузка по формированию современной научной методологии специальности. Кафедры активно привлекают специалистов практического здравоохранения, что обеспечивает своевременное реагирование в подготовке кадров на изменения в лабораторной службе.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.7. Модели реструктуризации лабораторной службы для оптимизации деятельности клинико-диагностических лабораторий

#### 1.7.1. Направления развития лабораторной службы

Современный тренд ценностно-ориентированного здравоохранения — результативность лечения пациента за счет внедрения инструментов доказательности, использования информационных технологий для измерения, управления и контроля качества медицинской помощи в условиях ограниченного финансирования. В рамках этого подхода перед КЛД стоит задача максимизировать ценность результатов деятельности, влияющих на показатели здоровья, при минимизации затрат, обеспечивая при этом функцию по Международной организации по стандартизации № 15189:2012 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности» — предоставление информации для диагностики, предупреждения или лечения болезни либо оценки состояния здоровья людей. Стратегия решения этой задачи в рамках концепции ценностно-ориентированного здравоохранения состоит в достижении оптимального соотношения между результатами исследований и затратами на их выполнение. Реализация этой стратегии основывается на выборе и обеспечении функционирования оптимальной организационной структуры, то есть модели организации лабораторной диагностики в рамках территориально-административного образования: города, области, края, района.

Подходы к построению организационной структуры лабораторной службы территориально-административного образования.

1. «Локальный» — дискретное управление и организационная работа конкретной лаборатории МО или отдельной «сети», образованной централизованной лабораторией и обслуживаемыми ею МО с пунктами сбора биоматериала.

2. «Многомерный» — объединение клинических лабораторий территории в единую службу лабораторной диагностики; стандартизация, информатизация, планирование и управление с позиций общей стратегии здравоохранения в данном регионе.

Локальный подход фактически утратил свою актуальность в силу несостоятельности управления на уровне крупной административно-территориальной единицы. Этот недостаток особенно наглядно проявился во время пандемии COVID-19. Многомерный подход подразумевает объединение лабораторий в единую систему взаимосвязанных и эффективно взаимодействующих, применяющих единые стандарты, оперативно реагирующих на ситуации из общей информационной системы.

Не существует универсальной модели в рамках «многомерного» подхода. Преимущества, недостатки и особенности каждой модели должны рассматриваться в контексте системы здравоохранения конкретного территориально-административного образования. При реструктуризации организационной модели лабораторной диагностики наряду с территориальными особенностями и организационными возможностями необходимо учитывать медицинскую результативность и экономическую эффективность.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.7.2. Медицинская результативность

Медицинская результативность — степень, с которой запланированные задачи выполнены и запланированные результаты достигнуты. Основные показатели медицинской результативности лабораторной диагностики в рамках клиентоориентированного подхода:

- удовлетворенность врача, назначившего исследование;
- удовлетворенность пациента (законного представителя).

Медицинская результативность лабораторной диагностики ориентирована на конечных адресатов, формирующих запрос на соответствующее исследование и оценивающих его смысловые результаты и качество медицинского сервиса — удобство заказа, сроки ожидания ответа, форму представления результатов и т.д. Основную группу заказчиков лабораторных исследований составляют лечащие врачи, медицинские работники различной специализации (фармакотерапевты, эпидемиологи), организаторы здравоохранения и ряд других специалистов. В соответствии с действующей нормативной юридической базой и современными этическими нормами пациенты также имеют право на получение информации о ходе лечебно-диагностического процесса и даже на частичное влияние на него. Кроме того, пациенты имеют возможность активно обращаться в коммерческие лаборатории для проведения альтернативного обследования и выполнять процедуры самотестирования с помощью простейших диагностических средств (например, иммунохроматографических полосок).

Вместе с тем врачи не являются специалистами лабораторной диагностики, а пациенты в подавляющем большинстве не имеют медицинского образования. В связи с этим для исключения субъективизма при оценке медицинской результативности лабораторной диагностики необходимо оперировать объективными критериями. Такими критериями, позволяющими объективно оценивать медицинскую результативность лабораторной диагностики, являются следующие.

**Клиническая информативность:** многомерный критерий, включающий:

- прогноз вероятности развития того или иного заболевания;
- диагностика заболевания;
- оценка состояния пациента, оценка эффективности лечения (в том числе динамическая);
- прогноз исхода заболевания.

#### **Качество исследований:**

- аналитическое качество исследований;
- сокращение времени выдачи результатов;
- процент брака и повторных исследований (посещений).

#### **Доступность исследований:**

- номенклатура выполняемых тестов;
- время ожидания результата исследований.

#### **Участие врачей КЛД в клиническом процессе:**

- помощь непосредственно в лечении (уведомление о критически важных показателях или помощь в интерпретации и выборе необходимых дополнительных тестов);
- время на восстановление после терапии;
- клинические исходы (в том числе стойкая утрата трудоспособности, летальность).

**Важно** определить критерии вклада лабораторных исследований в результат лечения пациентов как индикатор качества (ИК) лабораторной диагностики. Это увеличивает значимость лаборатории в клиническом процессе, стимулирует внимание и ответственность сотрудников. Медицинская результативность лабораторной службы очевидна, она проистекает из активной востребованности лабораторных исследований. Тем не менее лабораторные исследования влияют на результаты лечения опосредованно через их использование лечащими врачами. На исход лечения влияет значительное число разнообразных факторов, оценка степени вклада и его характера со стороны лабораторной диагностики может быть крайне затруднительной, очень субъективной и трудноизмеримой. Обеспечение доступности лабораторных исследований — один из ключевых компонентов достижения требуемой медицинской результативности. Оценка, планирование мероприятий и мониторинг доступности лабораторной диагностики могут проводиться с использованием измеримых критериев:

- временны́х (в минутах, часах, днях);
- пространственных (возможность непосредственного контакта с исполнителем исследования);
- объемных (количество выполненных исследований по отношению к обозначенным в стандартах/клинических рекомендациях медицинской помощи).

Наиболее разработана временна́я доступность лабораторных исследований, которая оценивается с помощью показателя **«время получения результата теста»** (или общее аналитическое время, Total analytic time — TAT). Это время от момента взятия биоматериала до момента предоставления результатов исследования назначившему его медицинскому работнику и/или пациенту (законному представителю). Целевые значения TAT устанавливаются:

- в зависимости от особенностей, характеристик и возможностей лаборатории МО или региона;
- соответственно потребностям, видам, условиям и формам оказания медицинской помощи;
- для каждой категории сложности исследований отдельно (градация категорий установлена приказом МЗ РФ от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований»).

## **Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»**

### **1.7.3. Экономическая эффективность**

Экономическая эффективность — отношение между достигнутым результатом и затраченными ресурсами, где основными видами затрат являются: заработная плата сотрудников, оборудование, реагенты, обслуживание оборудования, расходы на использование и обслуживание помещения, аутсорсинг.

Способы максимизации ценности лабораторной диагностики.

- Использование эффекта масштаба для минимизации затрат. Основной объект управления — лаборатория. Себестоимость формируется так, что постоянные издержки составляют основную часть затрат, в то время как стоимость производства каждого следующего теста достаточно невелика. С подобной структурой себестоимости эффект масштаба играет серьезную роль в оптимизации стоимости конкретного теста.
- Выполнение клинически обоснованных лабораторных тестов; акцент на системе управления назначениями и интерпретации. Основной объект управления, «заказчик» исследований — врач-клиницист, пациент. Их следует ориентировать на снижение числа необоснованных, дублирующих, нецелесообразных направлений на исследования, а врачей КЛД — на улучшение интерпретации результатов анализов, повышение вклада конкретных, адекватных тестов в клинические решения и исход.



**Важно** не столько учитывать стоимость конкретного теста и даже расходов на лабораторную помощь, сколько оценивать и контролировать стоимость всего лечебного процесса и возможности оптимизации его стоимости за счет правильной организации лабораторной помощи.

*Подходы к оптимизации затрат на лабораторную диагностику.*

- Снижение количества лабораторных анализов за счет исключения необоснованных, дублирующих, нецелесообразных. Основные мероприятия для реализации этого подхода:
  - формирование списков рекомендуемых назначений в тех или иных клинических ситуациях;
  - верификация списков заказываемых тестов;
  - интеграция списков в информационные системы (системы поддержки принятия врачебных решений);
  - интеграция списков в документы методического и/или юридического характера, в первую очередь в клинические рекомендации медицинской помощи по направлениям.
- Повышение качества диагностического процесса, направленного на всестороннее ускорение постановки диагноза. Основные мероприятия:
  - организационно-клинические;
  - технологические.

Основная организационно-клиническая мера: формирование специальных команд из экспертов по лабораторной диагностике в конкретной клинической специальности; задача команд — оперативное информирование, консультирование и обучение лечащих врачей по вопросам выбора, назначения и интерпретации лабораторных тестов. Основная технологическая мера — создание непрерывного информационного канала для поддержки принятия решений в клинические процессы за счет цифровизации.

- Аналитический аудит показателей деятельности. Основные мероприятия:
  - анализ технологических показателей каждой лаборатории и на этой основе перераспределение тестов для загрузки автоматизированных систем (анализаторов), чтобы они работали с оптимальной производительностью и эффективностью;
  - сравнительный анализ расходов и тарифов лаборатории с выявлением наиболее дорогостоящих исследований, нерациональных тарифов.

**Важно**, чтобы подходы не рассматривались отдельно. Совместно применяемые мероприятия разных подходов должны органично дополнять и усиливать друг друга. Платформа для реализации подходов — Единая информационная система в сфере здравоохранения субъекта РФ, интегрирующая медицинские и лабораторные информационные сети МО.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.7.4. Стратегии медико-экономических моделей клинико-диагностической лаборатории

Как уже указывалось, миссия и цель КЛД как практической клинической дисциплины едины вне зависимости от формы собственности МО, в которой проводятся лабораторные исследования, ее подчиненности, специализации, объема оказываемой медицинской помощи. Вместе с тем задачи, решаемые лабораторными подразделениями конкретных МО, существенно различаются и зависят от медико-экономической модели (МЭМ) учреждения и самой лаборатории.

МЭМ учреждения определяется двумя группами факторов:

- 1) медицинскими: профиль организации (плановый стационар, стационар экстренной медицинской помощи, поликлиника, амбулатория), ее специализация (кардиология, онкология и др.), мощность (размер коечного фонда, количество и специализация реанимационного коечного фонда, величина амбулаторного приема) и ряд других особенностей;
- 2) правовыми и экономическими:
  - форма собственности и подчиненность (федеральная, региональная, ведомственная, частная);
  - источники финансирования;
  - экономическая модель.

Для типовых МО (например: поликлиник одного города, с одинаковой мощностью — количеством прикрепленного населения, при отсутствии специфических особенностей региона) МЭМ может быть единообразной. Однако, как правило, МЭМ различных МО существенно отличаются друг от друга. В **табл. 1.1** представлены ориентировочные данные по трем МО: крупному частному диагностическому центру, муниципальному стационару скорой медицинской помощи и кардиологическому стационару федерального подчинения. У всех трех МО основным видом профессиональной деятельности является оказание медицинской помощи населению. В соответствии с действующей нормативной базой эти МО могут использовать схожие источники финансирования: бюджет, обязательное и добровольное медицинское страхование, платный прием населения. Однако на этом совпадения практически заканчиваются.

По форме собственности и подчиненности эти МО существенно различаются. В первом случае собственником и учредителем МО является частная компания, для второй и третьей МО собственник — государство. Однако в качестве учредителя кардиологического стационара федерального подчинения выступает МЗ РФ, а для стационара скорой медицинской помощи — департамент здравоохранения территории, на которой расположена МО, в силу этого

у данных двух МО имеются отличия в организационной, юридической и нормативной документации. Кроме того, все три учреждения отличаются по специализации, профилю и мощности. Существенно различается структура медицинских услуг и обслуживаемых контингентов населения, что влечет за собой существенные различия в структуре доходов и расходов.

**Таблица 1.1.** Сравнительный анализ функциональной нагрузки медицинских организаций различного профиля и мощности

	Стационар скорой помощи муниципального подчинения	Кардиологический стационар федерального подчинения	Частный диагностический центр
Количество коек отделений/реанимации	950/120	550/24	0/0
Количество госпитализаций в год	75 000	40 000	0
Количество пациентов, принятых амбулаторно	50 000	30 000	500 000
Количество операций плановых	8000	25 000	10 000
Количество операций экстренных	45 000	1000	700

В итоге для этих трех МО существенно разнятся цели: для частной МО — оказание медицинской помощи с условием получения прибыли, для федеральной МО — оказание высокотехнологичной медицинской помощи, для муниципальной МО — оказание медицинской помощи пациентам вмененной территории в заданном учредителем объеме. Следовательно, у этих МО не может быть единой МЭМ. Они решают разные задачи на основе различной нормативной базы с использованием различных организационно-экономических инструментов. В силу этого у каждого из данных лечебно-профилактических учреждений формируется оригинальная МЭМ.

Формирование МЭМ лаборатории строится на МЭМ учреждения, в котором она работает. Невозможно предположить, что лабораторные подразделения этих МО будут проводить исследования одинаковой номенклатуры, в равном количестве, с одинаковой скоростью. При наличии единой цели и миссии лабораторной диагностики прикладные задачи этих лабораторных подразделений будут различны. Это следует понимать и учитывать при планировании помещений под конкретную лабораторию, закупке оборудования и расходных материалов, подборе и расстановке кадров, решении иных подобных вопросов.

Формирование МЭМ лаборатории конкретной МО должно строиться на точном знании и описании специализации учреждения, его профиле, мощности, количестве больных амбулаторного, стационарного и реанимационного профиля, особенностях организации лечебно-диагностического процесса. Кроме того, при разработке МЭМ лаборатории необходимо учитывать характер источников финансирования, особенности экономической модели учреждения, векторы предполагаемого развития МО. Следует использовать максимально возможное количество разрешенных источников финансирования лаборатории. МЭМ лаборатории должна быть органической частью МЭМ учреждения.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.7.5. Стратегии организации лабораторной службы региона

В основе базовой модели организации лабораторной диагностики территориально-административной единицы лежат:

- стратегия консолидации и модель централизации;
- стратегия децентрализации и модель аутсорсинга;
- стратегия интеграции и модель горизонтальной интеграции;
- стратегия прорывных технологий и мобильная модель;
- динамическая модель организации лабораторной диагностики.

**Стратегия консолидации, модель централизации** — иерархическая двух- или трехуровневая система, которая включает:

- первый уровень — пункты взятия биологического материала на базе МО, оказывающей амбулаторно-поликлиническую помощь;
- второй уровень (опциональный) — выполнение поточных (скрининговых) исследований на базе автоматизированной лаборатории, формируемой по «кустовому» принципу в МО, оказывающей амбулаторно-поликлиническую помощь (для оптимизации логистики);
- третий уровень — централизованная КДЛ, самостоятельная или на базе МО, оказывающей стационарную помощь.

В рамках этой модели:

- лаборатории в МО, оказывающих амбулаторно-поликлиническую помощь, ликвидируются;
- централизованная лаборатория отдельной сети обслуживает МО с пунктами сбора биоматериала, выполняет технологические скрининговые исследования при первичном и диспансерном исследовании пациентов;

- центральная КДЛ — многомерное объединение клинических лабораторий территории в единую службу лабораторной диагностики: принадлежит государственному сектору или создается в рамках государственно-частного партнерства, выполняет подавляющий объем лабораторных исследований независимо от срочности и сложности для стационара, на базе которого она расположена, и весь спектр лабораторных исследований для сети МО.

Второй и третий уровни этой модели могут быть объединены.

**Стратегия децентрализации, модель аутсорсинга** — размещение заказа на проведение определенного объема и спектра исследования в сторонней независимой лаборатории:

- на коммерческой основе;
- путем включения сторонней лаборатории в систему обязательного медицинского страхования субъекта РФ.

В рамках этой модели:

- амбулаторно-поликлинические МО:
  - полностью или частично сохраняют лаборатории для основного потока исследований;
  - передают на аутсорсинг высокотехнологичные, редкие, особо сложные или дорогостоящие исследования;
- стационарные МО:
  - сохраняют экспресс-лаборатории для оказания медицинской помощи в экстренном и неотложном порядке;
  - частично передают на аутсорсинг поток плановых исследований.

**Стратегия интеграции, модель горизонтальной интеграции** — единоначалие и единое управление в сети лабораторий, сохраняемых во всех МО административно-территориальной единицы. В рамках этой модели единоначалие и единое управление обеспечиваются за счет:

- стандартизации процессов назначения, проведения и документирования исследований во всех лабораториях;
- формирования единой информационной системы;
- обеспечения преемственности (доступности результатов исследований вне зависимости от места их проведения);
- выделения всех лабораторий в отдельное юридическое лицо (опционально).

**Стратегия прорывных технологий, мобильная модель** — проведение исследований непосредственно на месте оказания медицинской помощи или местонахождения пациента. Такая модель реализуется в передвижных бригадах, выезжающих в отдаленные малонаселенные районы или по месту чрезвычайных ситуаций.

В рамках этой модели могут проводиться исследования:

- основного потока, за исключением сложных и редких;
- основного потока только в экстренном и неотложном порядке;
- только специальные исследования (например, иммунологические).

**Динамическая модель организации лабораторной диагностики** — контролируемая и изменяемая совокупность организационных подходов, направленных на решение конкретных задач лабораторной диагностики в специфических условиях данной территориально-административной единицы. Все предыдущие модели организации лабораторной диагностики — это базовые, фундаментальные элементы динамической модели. На уровне региона РФ элементы применяются в различных соотношениях в зависимости от:

- конкретных задач (на разных уровнях, при разных условиях и формах оказания медико-санитарной помощи);
- медико-социальной обстановки;
- экономических и иных специфических характеристик территориально-административной единицы.

Соотношение элементов претерпевает периодическую адаптацию. Метрики для принятия решений по адаптации модели для каждой измеримой цели развития лабораторной диагностики:

- темп прироста количества и перечня лабораторных исследований за определенный период;
- процент достижения общего целевого значения;
- разница между целевым и достигнутым значением за период.

При отставании от целевого значения, которое должно быть достигнуто за период наблюдения (месяц, квартал, год), более чем на 15% проводится качественный анализ ситуации с формированием дополнительных аналитических материалов для принятия управленческого решения.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

Характеристики системы здравоохранения (оцениваются в динамике):

- охват информатизацией и уровень функционального покрытия МО субъекта;
- удельный вес лабораторной информации, интегрированной в государственную информационную систему, в том числе опосредованно через ЛИС и медицинскую информационную систему (МИС);

- среднее ТАТ для исследований по категориям сложности, выполняемых в экстренном, неотложном и плановом порядке, для видов и условий оказания медицинской помощи; среднее значение определяется для каждой ситуации (например, «среднее ТАТ для исследований первой и второй категории сложности, выполняемых при оказании специализированной помощи в условиях дневного стационара в плановом порядке»), для МО каждой территориально-административной единицы субъекта РФ;
- удельный вес лабораторного оборудования, используемого по месту лечения пациента (со структуризацией по видам);
- удельный вес незанятых (вакантных) ставок в подразделениях лабораторной диагностики;
- удельный вес исследований по категориям и срочности, выполняемых в централизованных лабораториях, лабораториях МО, «внешних» лабораториях по аутсорсингу.

Мониторинг принципиальных изменений в субъекте:

- статистически значимые отклонения в динамике заболеваемости и летальности от социально значимых заболеваний;
- значимые изменения эпидемиологической ситуации;
- динамика соотношения городского и сельского населения за репрезентативный период (не менее 12 мес);
- значимые инфраструктурные изменения (качественный анализ).

Комплекс метрик может быть дополнен исходя из практических потребностей и особенностей каждого конкретного субъекта РФ.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.8. Санитарно-противоэпидемический режим в клиничко-диагностических лабораториях

#### 1.8.1. Санитарно-эпидемиологические требования в клиничко-диагностических лабораториях

Все медицинские лаборатории должны соблюдать санитарное законодательство Российской Федерации.

Нормативными правовыми актами, устанавливающими санитарно-эпидемиологические требования, являются государственные санитарно-эпидемиологические правила [санитарные правила, санитарные правила и нормы (СанПиН), санитарные нормы, гигиенические нормативы].

Весь биологический материал человека, поступающий в МО, должен рассматриваться как потенциально инфицированный, и работы с ним в лаборатории должны проводиться с обеспечением биологической безопасности в отношении как сотрудников лаборатории, так и окружающей среды. Особое место в организации деятельности медицинских лабораторий занимает процедура подготовки к лицензированию и получения санитарно-эпидемиологического заключения, которое устанавливает соответствие или несоответствие проектной документации или условий осуществления медицинской деятельности существующим СанПиНам.

В условиях цифровизации в Российской Федерации порядок выдачи санитарно-эпидемиологических заключений определен административным регламентом Роспотребнадзора в соответствии с приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 05.11.2020 № 747 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по предоставлению государственной услуги по выдаче санитарно-эпидемиологических заключений на основании результатов санитарно-эпидемиологических экспертиз, расследований, обследований, исследований, испытаний, токсикологических, гигиенических и иных видов оценок соблюдения санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований».

Срок действия санитарно-эпидемиологического заключения на соответствие условий выполнения работ с биологическими веществами, биологическими и микробиологическими организмами и их токсинами, в том числе условий работы в области геномной инженерии, составляет 5 лет. Санитарно-эпидемиологические заключения подлежат переоформлению в случае реорганизации, изменения наименования, местонахождения юридического лица, области применения продукции при изменении вида работ, группы патогенности (опасности) возбудителя инфекционной болезни.

Деятельность всех медицинских лабораторий, включая КДЛ и отдельно развернутые иммунологические лаборатории и лаборатории полимеразной цепной реакции (ПЦР), должна осуществляться в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». В состав централизованных КДЛ, лабораторных отделов (отделений) или КДЛ могут входить микробиологические лаборатории, либо на их базе могут выполняться микробиологические исследования («Правила проведения лабораторных исследований»). Однозначным является выполнение требований при работе с патогенными биологическими агентами (ПБА).

ПБА (патогены) — «микроорганизмы, вирусы, белковоподобные инфекционные частицы (прионы), яды биологического происхождения (токсины) и иные биологические агенты, в том числе созданные в результате генетических манипуляций, применения технологий синтетической биологии и другой направленной деятельности, способные вызывать патологический процесс в организме человека, животного или в растениях, а также биологические материалы, в которых могут содержаться перечисленные патогены».

Основным документом по организации деятельности медицинских лабораторий является СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», в котором изложены требования:

- к комплексу организационных, профилактических, в том числе лечебно-профилактических, санитарно-противоэпидемических, лабораторно-диагностических мероприятий, направленных на обеспечение раннего

- выявления, предупреждения возникновения и распространения инфекционных болезней среди населения Российской Федерации;
- к организационным, санитарно-противоэпидемическим, инженерно-техническим мероприятиям, направленным на обеспечение личной и общественной безопасности, защиту окружающей среды при работе с патогенами, способными вызывать патологический процесс в организме человека или животного, а также биологические материалы, в которых могут содержаться ПБА;
  - к порядку учета, хранения, передачи и транспортирования ПБА, а также объектов и материалов, содержащих или подозрительных на содержание ПБА.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.8.2. Требования к проведению работ с патогенными агентами

Виды работ с использованием ПБА, объектов и материалов, содержащих ПБА или подозрительных на содержание ПБА, на которые распространяются требования СанПиН 3.3686-21:

1) диагностические исследования объектов биотической и абиотической природы:

- с целью выявления маркеров ПБА (индикация ПБА), в том числе: установление биологической природы агента, детекция нуклеиновых кислот, обнаружение антигенов или антител к патогенному агенту, нуклеиновых кислот и других маркеров;
- с целью выделения и идентификации ПБА;

2) экспериментальные работы, включая манипуляции на молекулярном, клеточном уровнях для создания модифицированных, в том числе генно-инженерно-модифицированных, вариантов ПБА, с использованием микроорганизмов и продуктов их микробиологического синтеза, прионов, токсинов и ядов биологического происхождения:

- микробиологические (вирусологические) исследования (в том числе с использованием животных);
- агробиологические исследования;
- исследования в области биотехнологии, в том числе генно-инженерная деятельность;

3) производственные работы (работы по производству иммунобиологических препаратов — вакцин, сывороток, иммуноглобулинов, диагностических тест-систем — и другой продукции с использованием микроорганизмов и продуктов их микробиологического синтеза);

4) обеззараживание материала, содержащего или подозрительного на содержание ПБА [участки/секторы/отделы/организации, осуществляющие централизованное обеззараживание объектов, содержащих или подозрительных на содержание ПБА, химическими и (или) физическими методами];

5) зоолого-энтомологические работы, включая сбор зоолого-паразитологического материала, объектов окружающей среды на эндемичных по природно-очаговым инфекциям территориях и его транспортирование; содержание диких позвоночных животных и членистоногих;

6) работы с ПБА в очагах инфекционных заболеваний, в инфекционных больницах (отделениях), изоляторах и учреждениях, определенных для обсервации (обсерваторах);

7) оказание специализированной медицинской помощи в больницах (госпиталях), изоляторах и учреждениях с койками, предназначенными для обсервации (далее — обсерваторы);

8) эвакуация больных особо опасными инфекционными болезнями;

9) работы, связанные с забором клинического, секционного или любого иного биологического материала людей и животных, содержащего или подозрительного на содержание ПБА, в том числе при патологоанатомическом исследовании трупов людей и павших животных, для проведения исследований по обнаружению и идентификации ПБА;

10) работы по хранению, передаче, транспортированию ПБА I–IV групп патогенности (коллекционная деятельность);

11) образовательная деятельность с использованием ПБА;

12) другие виды работ с использованием ПБА или с использованием объектов и материалов, содержащих ПБА или подозрительных на содержание ПБА.

Осуществление работ с биологическими веществами, биологическими и микробиологическими организмами и их токсинами допускается при наличии *санитарно-эпидемиологических заключений* о соответствии условий выполнения таких работ санитарным правилам. Каждое структурное подразделение, выполняющее работу с ПБА I–IV группы, должно иметь отдельное санитарно-эпидемиологическое заключение.

Выделяют четыре уровня биобезопасности (УББ). Большинство КДЛ осуществляют деятельность с уровнем УББ 1 и 2. Биологическую опасность деятельности с использованием ПБА определяют в зависимости от вида осуществляемых работ и потенциальных рисков, обусловленных патогенными (опасными) свойствами ПБА, с которыми проводят работу. Хранение ПБА I–IV группы осуществляют в специально определенном помещении «заразной» зоны.

Особенности деятельности с использованием ПБА в лабораториях (подразделениях) предусматривают их классификацию по УББ:

- **базовые** — УББ 1, осуществление всех видов работ с ПБА IV группы;
- **базовые** — УББ 2, осуществление всех видов работ с ПБА III–IV группы, а также проведение работ с ПБА II группы, не сопровождающихся накоплением (культивированием или концентрированием) жизнеспособного

патогена;

- **изолированные** — УББ 3, осуществление всех видов работ с ПБА I (возбудитель чумы) — II группы, а также проведение работ с вирусами I группы, не сопровождающихся накоплением (культивированием или концентрированием) жизнеспособного патогена;
- **максимально изолированные** — УББ 4, все виды работ с вирусами I группы патогенности, микроорганизмами, ассоциированными с клиническими проявлениями, характерными для ПБА I–II групп, таксономическое положение которых не определено, а степень опасности не изучена, экспериментальные исследования штаммов со множественной устойчивостью к антибиотикам и химиопрепаратам; аэриобиологические исследования с ПБА I–II группы.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.8.3. Требования к размещению клиничко-диагностических лабораторий

КДЛ должны соответствовать требованиям, предъявляемым к базовым лабораториям (УББ 1) или лабораториям с УББ 2.

*Требования к лабораториям базового уровня 1* (лаборатории, осуществляющие работы с ПБА IV группы патогенности) допускают размещение производственных лабораторий, работающих с ПБА IV группы, в изолированном блоке производственного или административного корпуса. Работу выполняют сотрудники, допущенные к работе с ПБА III–IV групп, прошедшие обучение на курсах профессиональной подготовки с освоением методов безопасной работы с ПБА. В лабораториях, осуществляющих диагностические исследования, разграничивают потоки движения персонала, поступления материала на исследование, отходов.

Набор помещений должен определяться функциональными задачами лаборатории. Для лабораторий обеспечивают наличие санитарно-бытовых помещений для переодевания и раздельного хранения личной и рабочей одежды, душевой, санузлов. Биоматериал должен поступать в плотно закрытых промаркированных контейнерах, биксах, сумках-холодильниках. Его передача в лаборатории, осуществляющие диагностические исследования, должна осуществляться через дверь с тамбуром, но допускается передача через передаточное окно.

Для проведения подготовительных работ выделяют отдельные помещения — «чистую» зону: для мойки лабораторной посуды, препараторской, стерилизации питательных сред и лабораторной посуды, приготовления и розлива питательных сред, для приготовления и хранения дезрастворов, работы с документами, для хранения материальных средств.

*Лаборатории базового уровня 2* (лаборатории, осуществляющие работы с ПБА III группы патогенности) должны иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарным правилам, условиям проведения работ с ПБА III–IV групп, а также проведения работ с ПБА II группы, не сопровождающихся накоплением (культивированием или концентрированием) жизнеспособного патогена. Работу выполняют сотрудники, допущенные к работе с ПБА III–IV групп, прошедшие обучение на курсах профессиональной подготовки.

Обеспечивается зонирование лаборатории. Помещения лаборатории разделяют на «заразную» зону, где осуществляют манипуляции с ПБА, и «чистую» зону, где не проводят работы с ПБА. Во вновь строящихся и реконструируемых лабораториях вход персонала в «заразную» зону осуществляется через санпропускник.

В приказе Минтруда России от 18.12.2020 № 928н «Об утверждении Правил по охране труда в медицинских организациях» уточнено, что «биохимические, гематологические, иммунологические, коагулологические и иные исследования биомаркеров на автоматических анализаторах боксированного помещения не требуют».

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.8.4. Требования к работе с отходами

Сбор, использование, обезвреживание, размещение, хранение, транспортировка, учет и утилизация медицинских отходов должны осуществляться с соблюдением требований санитарных правил в зависимости от степени их эпидемиологической, токсикологической и радиационной опасности, а также негативного воздействия на человека и среду обитания человека... (требования к обращению с отходами СанПиН 2.1.3684-21).

Выделяют пять классов медицинских отходов:

- класс А — отходы, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными (эпидемиологически безопасные);
- класс Б — отходы, инфицированные и потенциально инфицированные микроорганизмами III–IV групп патогенности (эпидемиологически опасные);
- класс В — отходы от деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний III–IV группы патогенности, а также в области использования генно-инженерно-модифицированных организмов в медицинских целях (эпидемиологически опасные отходы);
- класс Г — отходы, не подлежащие последующему использованию (токсикологически опасные отходы 1–4-го классов опасности);
- класс Д — все виды отходов, в которых содержание радионуклидов превышает допустимые уровни (радиоактивные отходы).

После аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов и изменения внешнего вида отходов, исключающего возможность их повторного применения, медицинские отходы классов Б и В собираются хозяйствующим субъектом, осуществляющим обращение медицинских отходов, в упаковку любого цвета, кроме

**желтого и красного**, которая должна иметь маркировку, свидетельствующую о проведенном обеззараживании отходов, и содержать информацию: «Отходы класса Б/В, обеззараженные», наименование и адрес организации, дата обеззараживания.

Последующее обращение с такими отходами обеспечивается хозяйствующим субъектом.

*Система сбора, хранения и транспортирования, обеззараживания медицинских отходов должна включать следующие этапы:*

- сбор отходов внутри организаций, осуществляющих медицинскую и (или) фармацевтическую деятельность;
- перемещение отходов и хранение отходов на территории организации;
- обеззараживание (обезвреживание) отходов;
- транспортирование отходов с территории организации;
- размещение, обезвреживание или утилизация медицинских отходов.

Смешение медицинских отходов различных классов в общей емкости недопустимо. В МО утверждается схема обращения с медицинскими отходами, разработанная в соответствии с требованиями санитарных правил, в которой определены ответственные за обращение с отходами работники и процедура обращения с медицинскими отходами в данной организации.

Медицинские отходы **класса Б** должны собираться работниками организации в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) (контейнеры) упаковку желтого цвета или в упаковку, имеющую желтую маркировку, в зависимости от морфологического состава отходов. Для сбора острых медицинских отходов **класса Б** организацией должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости (контейнеры) с плотно прилегающей крышкой.

Для сбора органических, жидких медицинских отходов **класса Б** организацией должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости (контейнеры) с крышкой, обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

В случае применения аппаратных методов обеззараживания медицинских отходов в организации допускается сбор медицинских отходов **класса Б** на рабочих местах в общие емкости (контейнеры, пакеты), использованных шприцев в неразобранном виде с предварительным отделением игл, перчаток, перевязочного материала. Для отделения игл должны использоваться иглосъемники, иглодеструкторы, иглоотсекатели.

Медицинские отходы **класса В** подлежат обязательному обеззараживанию (обезвреживанию), дезинфекции физическими методами.

Вывоз **необеззараженных** медицинских отходов **класса В**, а также относящихся к классу Б, загрязненных и потенциально загрязненных мокротой пациентов, лиц, больных туберкулезом, отходов микробиологических лабораторий, осуществляющих работы с возбудителями туберкулеза, за пределы территории МО **не допускается**.

Медицинские отходы **класса В** должны собираться в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) **красного** цвета или имеющую красную маркировку.

При упаковке медицинских отходов **класса В** для удаления из структурного подразделения организаций одноразовые емкости (пакеты, баки) с медицинскими отходами **класса В** маркируются надписью «Отходы. Класс В» с нанесением названия организации, подразделения, даты дезинфекции и фамилии лица, ответственного за сбор и дезинфекцию отходов, а также даты окончательной упаковки медицинских отходов. Медицинские отходы **класса В** в закрытых одноразовых емкостях должны быть помещены в специальные контейнеры и храниться в помещении для хранения медицинских отходов не более 24 ч (без использования холодильного оборудования). При использовании холодильного оборудования срок хранения не более 7 сут.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

*В случае получения работником при обращении с медицинскими отходами травмы [укол, порез с нарушением целостности кожных покровов и (или) слизистых] персоналу МО необходимо принять меры экстренной профилактики. Ответственным лицом организации вносится запись в журнал учета, составляется акт о травме [укол, порез с нарушением целостности кожных покровов и (или) слизистых] на производстве установленной формы с указанием даты, времени, места, характера травмы. При травме осуществляются извещение руководителя МО, учет и расследование случаев инфицирования персонала возбудителями инфекционных заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью.*

*К способам и методам обеззараживания и (или) обезвреживания медицинских отходов классов Б и В предъявляются следующие санитарно-эпидемиологические требования:*

- а) обеззараживание медицинских отходов класса Б может осуществляться централизованным или децентрализованным способом, при котором участок по обращению с отходами располагается на территории МО;
- б) медицинские отходы класса В обеззараживаются только децентрализованным способом, хранение и транспортирование необеззараженных медицинских отходов класса В не допускается;
- в) физический метод обеззараживания медицинских отходов классов Б и В, включающий воздействие водяным насыщенным паром под избыточным давлением, высокой температурой, в том числе плазмой, радиационным, электромагнитным излучением, применяется при наличии специального оборудования — установок для обеззараживания медицинских отходов;
- г) химический метод обеззараживания медицинских отходов классов Б и В, включающий воздействие растворами дезинфицирующих средств, обладающих бактерицидным, вирулицидным, фунгицидным действием, в соответствующих режимах, применяется с помощью специальных установок или способом погружения отходов в промаркированные емкости с дезинфицирующим раствором в местах их образования;

д) жидкие медицинские отходы класса Б (рвотные массы, моча, фекалии, мокрота) больных туберкулезом допускается сливать без предварительного обеззараживания в систему централизованной канализации при условии ее оснащения системой обеззараживания сточных вод.

К условиям хранения медицинских отходов предъявляются следующие санитарно-эпидемиологические требования:

а) сбор медицинских отходов в местах их образования осуществляется в течение рабочей смены, при использовании одноразовых контейнеров для колющего и режущего инструментария допускается их заполнение в течение 3 сут с начала момента накопления отходов;

б) хранение (накопление) более 24 ч необеззараженных медицинских отходов класса Б и В осуществляется в холодильных шкафах не более 7 сут или в морозильных камерах — до 1 мес;

в) одноразовые пакеты, используемые для сбора медицинских отходов классов Б и В, должны обеспечивать возможность безопасного сбора в них не более 10 кг отходов;

г) накопление и временное хранение необеззараженных медицинских отходов классов Б и В осуществляется персоналом МО отдельно от отходов других классов в специальных помещениях, исключающих доступ лиц, не связанных с обращением с медицинскими отходами.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.9. Охрана труда

Охрана труда — это система сохранения жизни и здоровья работников в процессе трудовой деятельности, включающая правовые, социально-экономические, организационно-технические, санитарно-гигиенические, лечебно-профилактические, реабилитационные мероприятия. Медицинские лаборатории относятся к категории учреждений, подверженных сочетанному влиянию различных факторов, прежде всего биологических, физических, химических, в связи с чем соблюдению требований охраны труда и санитарного законодательства отводится важная роль.

Установлены классы (подклассы) условий труда на рабочих местах. Условия труда по степени вредности и (или) опасности подразделяются на четыре класса — оптимальные, допустимые, вредные и опасные условия труда.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.9.1. Степень вредности условий труда

*Оптимальными условиями труда (1-й класс)* являются условия, при которых воздействие на работника вредных и (или) опасных производственных факторов отсутствует или воздействия не превышают гигиенические нормативы, принятые в качестве безопасных для человека.

*Допустимыми условиями труда (2-й класс)* являются условия, при которых вредные факторы не превышают уровни, установленные гигиеническими нормативами, а измененное функциональное состояние организма работника восстанавливается во время регламентированного отдыха или к началу следующего рабочего дня (смены).

*Вредными условиями труда (3-й класс)* являются условия труда, при которых уровни вредных производственных факторов превышают уровни, установленные гигиеническими нормативами, в том числе:

- *подкласс 3.1 (вредные условия труда 1-й степени)* — условия труда, при которых на работника воздействуют вредные и (или) опасные производственные факторы, после воздействия которых измененное функциональное состояние организма работника восстанавливается при более длительном сроке, чем до начала следующего рабочего дня (смены), и увеличивается риск повреждения здоровья;
- *подкласс 3.2 (вредные условия труда 2-й степени)* — условия труда, при которых на работника воздействуют вредные и (или) опасные производственные факторы, уровни воздействия которых способны вызвать стойкие функциональные изменения в организме работника, приводящие к появлению и развитию заболеваний легкой степени тяжести (без потери профессиональной трудоспособности), возникающих после продолжительной экспозиции (15 лет и более);
- *подкласс 3.3 (вредные условия труда 3-й степени)* — условия труда, при которых на работника воздействуют вредные и (или) опасные производственные факторы, уровни воздействия которых способны вызвать стойкие функциональные изменения в организме работника, приводящие к появлению и развитию профессиональных заболеваний легкой и средней степени тяжести (с потерей профессиональной трудоспособности) в период трудовой деятельности;
- *подкласс 3.4 (вредные условия труда 4-й степени)* — условия труда, при которых на работника воздействуют вредные и (или) опасные производственные факторы, уровни воздействия которых способны привести к появлению и развитию тяжелых форм профессиональных заболеваний (с потерей общей трудоспособности) в период трудовой деятельности.

*Опасными условиями труда (4-й класс)* являются условия труда, при которых на работника воздействуют вредные и (или) опасные производственные факторы, уровни воздействия которых в течение всего рабочего дня (смены) или его части способны создать угрозу жизни работника, а последствия воздействия данных факторов обуславливают высокий риск развития острого профессионального заболевания в период трудовой деятельности.

Чаще всего в КДЛ устанавливается *подкласс 3.2 (вредные условия труда 2-й степени)*. Периодичность проведения специальной оценки условий труда — 1 раз в 5 лет, а также при появлении нового рабочего места. Например, в МО открыта ПЦР-лаборатория, или создано новое рабочее место для ПЦР-диагностики, или введена новая должность (старшего лаборанта). В таких случаях следует провести специальную оценку условий труда.



## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.9.2. Правила по охране труда в медицинских организациях

Правила по охране труда в МО устанавливают государственные нормативные требования охраны труда при оказании медицинской помощи, организации и проведении основных работ в МО и утверждены приказом Минтруда России от 18.12.2020 № 928н «Об утверждении Правил по охране труда в медицинских организациях».

Требования правил обязательны для исполнения работодателями независимо от их организационно-правовых форм. При осуществлении медицинской деятельности в МО на работников возможно воздействие вредных и (или) опасных факторов производственной среды и трудового процесса. К вредным и (или) опасным факторам производственной среды и трудового процесса относятся:

- 1) *биологические факторы*, в том числе микроорганизмы-продуценты, живые клетки и споры, содержащиеся в бактериальных препаратах, патогенные микроорганизмы — возбудители инфекционных заболеваний;
- 2) *химические факторы*, в том числе химические вещества и смеси, измеряемые в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работников, в том числе некоторые вещества биологической природы (антибиотики, витамины, гормоны, ферменты, белковые препараты), которые получают химическим синтезом и (или) для контроля содержания которых используют методы химического анализа;
- 3) *физические факторы* — аэрозоли преимущественно фиброгенного действия, шум, параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха, тепловое облучение), параметры световой среды (искусственное освещение рабочей поверхности);
- 4) *тяжесть трудового процесса* — показатели физической нагрузки на опорно-двигательный аппарат и на функциональные системы организма работника;
- 5) *напряженность трудового процесса* — показатели сенсорной нагрузки на центральную нервную систему (ЦНС) и органы чувств работника;
- 6) *угроза жизни и здоровью работников*, связанная с возможным совершением в отношении них противоправных действий со стороны пациентов, их родственников и третьих лиц.

При организации медицинской деятельности работодатель обязан оценивать профессиональные риски, связанные с возможным причинением вреда здоровью работника в процессе его трудовой деятельности. При заключении трудового договора работодатель обязан обеспечить информирование работников о полагающихся им средствах индивидуальной защиты, а работники обязаны правильно применять выданные им средства индивидуальной защиты, санитарную одежду.

На рабочем месте запрещается курить, принимать пищу, хранить личную одежду, употреблять алкогольные напитки, наркотические средства и иные токсические и сильнодействующие лекарственные препараты (в том числе психотропные). Запрещается:

- а) выполнять работы, не предусмотренные трудовыми обязанностями;
- б) работать с неисправным инструментом, на неисправном оборудовании, использовать неисправные приспособления, средства индивидуальной и коллективной защиты;
- в) эксплуатировать медицинские изделия, не имеющие регистрации в порядке, установленном законодательством Российской Федерации.

## Глава 1. Специальность «Клиническая лабораторная диагностика»

### 1.9.3. Требования охраны труда в клинико-диагностических лабораториях

Пробы биологического материала, поступающие в КДЛ, считаются потенциально инфицированными, что требует соблюдения мер безопасности, направленных на защиту персонала.

При транспортировке биоматериал должен помещаться в пробирки, закрывающиеся резиновыми или полимерными пробками, а сопроводительная документация — в упаковку, исключающую возможность ее загрязнения биоматериалом. Не допускается помещать бланки направлений в пробирки с кровью или контейнеры с иными биологическими материалами. Транспортировка биоматериала должна осуществляться в закрытых контейнерах, регулярно подвергающихся дезинфекционной обработке.

Исследование проб биоматериала следует проводить в ламинарных боксах, в боксах биологической безопасности и на автоматических анализаторах. Следует пользоваться автоматическими и полуавтоматическими устройствами дозирования проб, механическими и электронными пипетками, пипеточными дозаторами.

При открывании пробок бутылок, пробирок с кровью или другими биологическими материалами следует не допускать разбрызгивания их содержимого.

Порядок работы должен свести к минимуму риск заражения. С этой целью на преаналитическом и аналитическом этапах следует использовать системы для перемещения лабораторных контейнеров, автоматические анализаторы, автоматизированные и роботизированные системы, мультимодальные комплексы.

Рабочие места для проведения исследований мочи и кала должны быть оборудованы вытяжными шкафами с механическим побуждением.

Биохимические, гематологические, иммунологические, коагулологические и иные исследования биомаркеров могут проводиться на автоматических анализаторах (отдельно стоящих либо интегрированных в мультимодальные комплексы) или на полуавтоматических анализаторах.

Потенциальные вредные и/или опасные производственные факторы в КДЛ представлены в **табл. 1.2**.

**Таблица 1.2.** Характерные вредные и (или) опасные производственные факторы, профессиональные риски при выполнении отдельных работ в клинико-диагностических лабораториях

КДЛ МО	<p>Высокий риск отравлений, аллергизации, ожогов, связанных с применением ядовитых и огнеопасных веществ, сильных кислот, щелочей, аэрозолей.</p> <p>Высокий риск заражения персонала при исследовании материалов, содержащих возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний. Высокий риск заражения гемоконтактными инфекциями при возникновении аварийных ситуаций.</p> <p>Высокий риск травмирования при работе со специальными приборами, аппаратами, оборудованием и стеклянной посудой.</p> <p>Вынужденная рабочая поза.</p> <p>Повышенное напряжение органов зрения.</p> <p>Высокий уровень неионизирующих электромагнитных излучений.</p> <p>Высокий уровень опасности поражения электрическим током.</p> <p>Высокий уровень опасности возникновения взрыво- и пожароопасной ситуации</p>
Работа с кровью и другими биологическими жидкостями пациентов	<p>Высокий риск заражения гемоконтактными инфекциями при возникновении аварийных ситуаций.</p> <p>Высокий риск травмирования при работе со специальными приборами, аппаратами, оборудованием и стеклянной посудой.</p> <p>Высокий риск нервно-эмоционального напряжения.</p> <p>Наличие вредных веществ, выделяющихся в воздух рабочей зоны.</p> <p>Вынужденная рабочая поза.</p> <p>Повышенный уровень шума на рабочем месте.</p> <p>Повышенная ионизация воздуха.</p> <p>Высокий уровень напряжения органов зрения.</p> <p>Высокий риск возникновения аварийных ситуаций в условиях:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• дефицита рабочего времени;</li> <li>• высокой нервно-эмоциональной нагрузки;</li> <li>• работы в ночное время</li> </ul>

#### Рекомендуемая литература

1. Виханский О.С., Наумов А.И. Менеджмент. М.: Магистр, 2024. 672 с.
2. Кишкун А.А. Назначение и клиническая интерпретация результатов лабораторных исследований. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 448 с.
3. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. В 2 т. / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
4. Клиническая лабораторная диагностика: учебник в 2 т. / Под ред. В.В. Долгова. М.: Лабдиаг, 2017. Т. 1. 688 с.
5. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2006. 544 с.
6. Медицинская лабораторная диагностика. Программы и алгоритмы. Руководство для врачей / Под ред. А.И. Карпищенко. 4-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 976 с.
7. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 года № 4 Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
8. Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 14.03.2018 № 145н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области клинической лабораторной диагностики»».

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Сущность лабораторных исследований заключается в анализе пробы биоматериала, взятой у пациента для обнаружения или измерения в ней содержания компонентов, структурно или функционально отражающих состояние и деятельность органов и систем организма. Информация о данных компонентах, представленная в описательной или количественной форме, составляет результат клинического лабораторного исследования, который должен обладать следующими свойствами: аналитической надежностью, клинической информативностью и оперативностью. Лабораторные исследования организуются и управляются системой менеджмента медицинской лаборатории. Система менеджмента — это скоординированная деятельность по руководству и управлению процессом производства. Система менеджмента качества в медицинской лаборатории — это скоординированная деятельность по руководству и управлению процессом применительно к качеству (ИСО 9000 Система менеджмента качества. Основные положения и словарь). Согласно ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетенции», система менеджмента качества включает планирование качества, управление качеством, обеспечение качества и непрерывное улучшение качества. В КДЛ это разработка и осуществление мер, обеспечивающих необходимые условия для получения качественной аналитической информации, отражающей истинное состояние здоровья пациента. Качество лабораторного исследования — это правильно и своевременно назначенный тест для нуждающегося в нем пациента, выполненный на достаточном аналитическом уровне с необходимой информацией для его интерпретации.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1. Менеджмент в лабораторной медицине

Управление, или менеджмент, в КЛД принципиально ничем не отличается от любых других структур. Это означает, что руководитель любого подразделения должен обладать базовыми навыками по целому ряду направлений. В этой главе речь пойдет о базовых основах законодательства и выстраивании процессов для управления деятельностью клинических лабораторий.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.1. Бережливое производство

За последние годы в России появилось понимание, что в медицинской сфере не только можно, но и нужно использовать лучшие бизнес-практики. Хотя в медицинской сфере есть специфические ограничения (фокус на пациента, клинические рекомендации, нормативные документы, информационная безопасность, особенности Федерального фонда обязательного медицинского страхования и добровольного медицинского страхования). Инструменты повышения эффективности в государственном и коммерческом секторе во многом схожи. Преимущества бережливого подхода для любой сферы деятельности едины:

- прозрачность работы организации;
- рост эффективности, качества работы и скорости принятия решений;
- бережное и эффективное использование человеческого потенциала;
- оптимальное распределение финансовых ресурсов;
- построение фундамента цифровой трансформации организации и возможность ее постоянного совершенствования;
- повышение мотивации сотрудников, вовлеченность и позитивный настрой команды.

Бережливый подход помогает достичь главных целей, связанных как с развитием оказания медицинской помощи, так и с качеством жизни отдельного человека, в том числе это путь соблюдения прав пациента.

Здравоохранение постоянно требует вложений в совершенствование технологий. Бережливый подход позволяет оптимизировать процессы, найти участки, которые не приносят пользы, но потребляют ресурсы, изменить процессы в лучшую сторону и переложить используемые средства в более ценные для результата активности. Тогда можно будет экономить средства каждого гражданина, расходовать бюджет разумнее и эффективнее. Все решаемые в здравоохранении задачи стоит рассматривать не как оторванные от жизни бюрократические процедуры, а как элемент функционирования государственной медицинской машины.

В основе бережливого производства лежат технологии Lean-менеджмента (англ. lean — «тощий», «ничего лишнего»). Внедрение Lean даст эффект, будет значительным при сопутствующей комплексной работе, включающей применение гибких подходов управления проектами, разработку стратегии цифровой трансформации, учет этических аспектов и т.д. Для понимания основ бережливого производства, когда во главу угла ставится человек, приведем пример из урбанистики. Если дорожки для пешеходов прокладывает архитектор, даже очень профессиональный, он не всегда делает это оптимально. Известна история о том, что в качестве эксперимента решили не асфальтировать дорожки сразу. Сначала пешеходы протаптывали тропинки там, где это было удобно, только потом их заасфальтировали. Этот пример показывает, что следует учитывать сложившиеся практики; они могут быть значимыми, поскольку сформировались как способ удобной работы людей в конкретной команде и отражают их психологические и когнитивные особенности. На оптимизацию процессов в медицине надо уметь смотреть по этой аналогии: сначала «протоптали дорожки» интуитивно, затем с помощью профессиональных инструментов делаем их более удобными, отвечающими решаемым задачам. Принципы бережливого производства универсальны, работают в здравоохранении, промышленности, сфере услуг, коммунальном хозяйстве, госуправлении. Сформулированы концепции бережливой организации и бережливого управления.

**Выстраивание процессов.** Рекомендации по бережливой организации и бережливому управлению отличаются для разной степени погруженности в проблему, нами представляются лишь важные общие моменты.

*В первую очередь* это наличие мотивированного лидера, который хочет изменить работу своей организации и ведет за собой команду. Важно, чтобы он сам был приверженцем бережливого управления и транслировал свою убежденность подчиненным и организации в целом. Этот фактор имеет решающее значение как на уровне отдельной организации, так и на уровне отрасли. Например, если значимость бережливого управления (или любого другого подхода) будет провозглашена на уровне МО, но в отделениях врачи не будут понимать, что это за инструменты и как ими пользоваться, есть риск, что новый подход останется только лозунгом и реальных изменений в медицинской практике не будет.

*Второй момент* связан с поддержкой инициатив, будь то на уровне организации, департамента или одного человека. Ситуация, когда инновационные инструменты начинают внедряться на местах инициативно, встречается довольно редко, но такие примеры особенно ценны. Переход к активной позиции не может быть быстрым, так как требуются изменения мышления, организационной культуры, модели управления. Очень важно поддерживать такие активности, показывать, что это хорошо и правильно.

*Третий шаг* на пути к успеху — планомерная работа с сопротивлением. Пока сотрудники и коллеги не увидят эффективности новых инструментов, работа по оптимизации процессов выглядит для них как дополнительная нагрузка с неочевидным результатом. Важно не жалеть времени на разъяснения, на общение с командой, показывать, что анализ и исправление процессов окупаются, что в результате изменений будет возможность больше времени уделять интересным проектам, обучению и т.д. Если руководитель поможет своим сотрудникам осознать ценность этой работы, то успех оптимизации обеспечен.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

*Четвертая задача* — учитывать загрузку команды. На этапе анализа и описания процессов сотрудникам в течение нескольких недель (в зависимости от сложности и количества процессов) приходится практически ежедневно по несколько часов работать над оптимизацией. Нужно понимать, что значительную часть времени команда будет недоступна для решения текущих задач, следует согласиться на это ради выигрыша в будущем, иначе неизбежны перегрузка команды, выгорание сотрудников, конфликты и увольнения. И последний по порядку, но не по значимости, фактор успеха — это работа с мотивацией. Сотрудники, занятые оптимизацией, работают на успех организации. Нужно продумать, каким образом их поощрить.

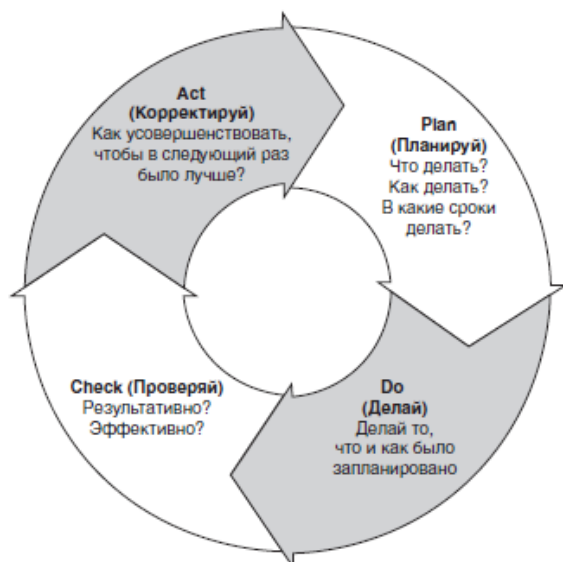
**Основной посыл оптимизации процессов.** Комплекс методов и принципов, которые позволяют определить **ценность** той или иной деятельности, а затем выявить и устранить **потери** (то есть действия, не имеющие ценности), — это определение цели предпринимаемых действий. Использование Lean в медицине строится на убеждении, что *здравоохранение существует ради граждан, пациентов, а не для самой системы здравоохранения*. Именно граждане, которым оказывают услугу или предоставляют сервис, должны в результате внедрения бережливой технологии получить эффективные преимущества. Принцип, внедренный в промышленности, — «точно вовремя» и «бездефектность» — реализуется в программе «Бережливая поликлиника», и его же следует применить и для обеспечения качества лабораторных исследований, сформулированного выше: правильно и своевременно назначенный тест для нуждающегося в нем пациента, выполненный на достаточном аналитическом уровне, с необходимой информацией для его интерпретации. В применении к лаборатории Lean — клиентоцентричная концепция, которая требует от сотрудника не только сосредотачиваться на своих внутренних профессиональных навыках и обязанностях, но постоянно помнить, что за всеми манипуляциями стоит пациент, больной человек, обратившийся за помощью, поэтому следует направлять все внимание на то, что твои результаты исследования нужны пациенту.

**Сложности внедрения бережливой технологии.**

1. *Спротивление персонала.* Исходя из названия («бережливое производство»), медицинские работники чаще всего не знают о существовании данных технологий. Для устранения этого пробела на кафедрах лабораторной диагностики должны формироваться циклы повышения квалификации по менеджменту качества, на котором слушатели могут осваивать эту технологию. Также необходимо включение данной темы в программы ординатуры по КЛД, лабораторной генетике, медицинской микробиологии. Существует заблуждение, что в КДЛ нет клиента в лице пациента, которому оказывают услугу или предоставляют сервис. Клиентом видят в лучшем случае клинициста, назначившего лабораторное исследование.
2. *Нормативное регулирование.* Незрелость нормативных правовых актов в области работы с документами, не удается отказаться от бумажного носителя и интегрировать системы электронного документооборота и архивы. Информация дублируется на бумажных носителях, проекты развития региональных ЛИС и МИС тормозятся. Процессные регламенты делопроизводства, разработанные для бумажных документов, устарели, однако регионы не решаются отказаться от двойной регистрации документов.
3. *Недостатки стратегического планирования.* Термин «процесс стратегического планирования» неоднократно используется в ФЗ № 172-ФЗ «О стратегическом планировании в Российской Федерации». На практике, за редким исключением, в МО нет работающих процессных инструментов, таких как «оценка результативности и эффективности документов стратегического планирования», «оценка результативности и эффективности реализации решений, принятых в процессе стратегического планирования» и т.д.
4. *Коммуникативные помехи.* Не хватает открытых площадок, на которых можно делиться опытом внедрения процессного подхода. Внедрение бережливых технологий в области медицины и особенно в части лабораторной диагностики пока не стало приоритетом. Интерес к Lean-практикам вырос в связи с пилотным проектом «Бережливое государство», который стартовал в 2017 г. в пяти регионах России. Государственные организации, которые строят свою деятельность на основе процессного подхода, демонстрируют впечатляющие результаты. Например, процессное управление доказало свою эффективность в предоставлении гражданам и бизнесу сервисных госуслуг; особенно наглядно преимущества процессных подходов проявились при перезапуске работы многофункционального центра, который потребовал интенсивного горизонтального взаимодействия с разными органами власти. Московская программа «Бережливая поликлиника» позволила реструктурировать многие зоны регистратур и процедурных кабинетов для более быстрого, качественного и удобного использования пациентами. В Москве принципиально перестроена лабораторная служба. Сейчас в государственных поликлиниках, не имеющих КДЛ, многие диагностические центры вошли в структуру московского Научно-практического центра лабораторных исследований. Несомненные преимущества такой организации, как централизация, эффективное использование дорогостоящего оборудования, комплексный анализ и др., активно презентуются во многих публикациях. Вопрос о целесообразности такой организации для пациентов требует анализа результатов долгосрочной деятельности. Однако в основе перестройки лабораторной службы Москвы декларируется основная идея Lean — максимальная польза для клиента с минимальными затратами ресурсов.

**Концепция непрерывного улучшения качества.** В концепции Lean разработана модель PDCA (от англ. Plan–Do–Check–Act, то есть «планируй–делай–проверяй–корректируй») — универсальный управленческий цикл, на основе которого выстраивается регулярный менеджмент (рис. 2.1).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями



**Рис. 2.1.** Управленческий цикл для применения концепции непрерывного улучшения качества

При кажущейся простоте и очевидности полный круг PDCA присутствует далеко не во всякой организации: где-то особое внимание уделяют анализу или контролю, где-то — лишь контролю. Концепция непрерывного улучшения процессов эффективно работает там, где в нее включены не только управленцы, но и каждый работник, который стремится постоянно, практически ежедневно улучшать производственный процесс, внедряя пусть небольшие, незначительные с точки зрения глобального производства улучшения. Но в совокупности такая тактика способна принести результаты. Бурный рост производства в Китае во многом связан именно с технологией непрерывного улучшения качества, когда в него были вовлечены миллионы работающего населения. Более глубокий смысл этого подхода основан на том, что большая часть результатов любого процесса определяется системой, в которой этот процесс проходит, и лишь небольшая их часть вызвана внешними по отношению к этой системе причинами. В глобальном масштабе наша страна осознала это при преодолении санкций, наложенных на нас странами коллективного Запада.

Сравнение традиционного и Lean-мышления в концентрированном виде представлено в табл. 2.1.

**таблица 2.1.** Сравнение традиционного и Lean-мышления

Традиционное мышление руководителей	Lean-мышление
Необходимо использовать меньшие масштабы, чтобы сэкономить	Гибкость важнее, чем объемы
Работа с клиентами и обращениями — это расходы, от которых никуда не денешься	Основная стоимость создается «на первой линии», на уровне взаимодействия с потребителем
Руководители ставят цели и говорят людям, что им делать	Каждый сотрудник должен понимать, как его деятельность соотносится с целями организации
Когда что-то идет не так, надо быстро исправить ситуацию, чтобы никто не заметил	Необходимо устранять первопричины проблем, а не только их симптомы
Когда что-то идет не так, надо найти виноватого	Любая проблема — это возможность совершенствования

Базовые принципы Lean:

- главная цель — ориентация на клиента/пациента;
- ключевая задача — обеспечить ценность услуги для пациента;
- технология — сначала определить потери, затем ликвидировать их;
- стратегия — сделать сотрудников владельцами процессов;
- концепция руководителя — вдохновлять сотрудников на прорывы.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.2. Требования к качеству исследований в клинической лаборатории

Экспертами ВОЗ согласованы три основных подхода к определению требований к качеству в клинических лабораториях. Эти подходы используют разные принципы, а потому полностью независимы один от другого. Один из них лучше подходит для одной группы анализов, но может оказаться неприемлемым для другой.

**Подход от достигнутого уровня аналитического качества** основан на нынешнем состоянии лабораторной службы страны и соблюдении требований, установленных национальными регулирующими органами или документами (такими, например, как CLIA в США, ГОСТы в России). Суть подхода сводится к тому, чтобы установить такие требования к качеству измерений, которые могут поддерживать большинство лабораторий страны. Такой подход — не объективная оценка качества лабораторных исследований, а способ соответствовать качеству измерений в большинстве лабораторий, использующих такой же метод измерения аналита. Все это не стимулирует улучшение

качества измерений. Легко допустить ситуацию, где есть две группы лабораторий: первая (наиболее многочисленная) для количественного определения концентрации гормонов использует плащечные иммуноферментные методы, а вторая небольшая группа лабораторий для этих же целей использует, скажем, закрытую иммунохимическую систему. Следуя принципу согласованного подхода, требования к качеству будут устанавливаться на основании аналитических возможностей методов с большой вариабельностью измерений, в данном случае плащечных иммуноферментных методов. Очевидно, что лаборатории второй группы легко достигнут установленного уровня качества, стимула для улучшения качества у них не будет, и, скорее всего, со временем оно будет ухудшаться. Кроме того, в этом случае требования определяются лабораторным сообществом и не отражают пожеланий клиницистов и пациентов к качеству лабораторного обслуживания.

**Подход на основе компонентов биологической вариации** опирается на данные биологической вариации аналита. На основе многолетних исследований биологической вариации предложены базовые, минимальные и оптимальные требования к качеству. Именно эта трехуровневая модель — сейчас самая признанная в лабораторном мире. Зная коэффициенты внутрииндивидуальной и межиндивидуальной (групповой) биологической вариации, нужно рассчитать или найти целевые значения.

Протокол исследования биологической вариации аналита практически исключает влияние аналитической вариации. Отсюда основное преимущество этого подхода: он игнорирует аналитические возможности используемых методов и определяет, каким должно быть хорошее выполнение лабораторного исследования, на основе требований к качеству, объективно установленных на основе биологической вариации.

К недостаткам этого способа можно отнести то, что сформированные таким образом требования могут оказаться недостижимыми для методов, используемых сегодня в КДЛ. Так, для аналитов с низкой природной вариабельностью, таких, например, как натрий, альбумин, кальций, существуют сложности по достижению биологически обоснованных требований к качеству измерений. Кроме того, есть аналиты (например, ТВ — тромбиновое время), для которых биологическая вариация пока не установлена. В таких случаях следует устанавливать требования к аналитическому качеству либо от достигнутого уровня, либо на основе влияния аналитического качества на клинические исходы.

**Подход на основе влияния аналитического качества на клинические исходы.** По мнению экспертов, это наилучший, но в то же время самый сложный в реализации способ задать требования к качеству лабораторных исследований. Он состоит из трех моделей — исследование прямого влияния на клинические исходы; симуляционные исследования и согласованное мнение клиницистов и/или экспертов. Первые две опираются на знание того, какие именно результаты лабораторного исследования заставляют клинициста принимать то или иное решение (например, изменять тактику ведения пациента, включая изменение схемы лечения; назначение дополнительных исследований). Оказывается, можно оценить, как лечащие врачи на основе пороговых значений аналитов принимают такого рода решения, и перевести эту информацию в требования к аналитическому качеству. Третья модель — согласованное мнение ведущих клиницистов, признанных экспертов в той или иной области медицины.

Подход основан на существующей клинической практике и не принимает во внимание ни биологическую вариацию аналитов, ни аналитические характеристики нынешних лабораторных методов. Они могут совпадать, а могут и не совпадать с требованиями к качеству, установленными на основе биологической вариации. Например, требования американской ассоциации эндокринологов, специализирующихся на лечении заболеваний щитовидной железы (ЩЖ), к определению тиреотропного гормона [общая допустимая аналитическая ошибка ( $TE_{\text{макс}}$ ) — не более 5%] выглядят очень жестко по сравнению с требованиями, установленными на основе биологической вариации (базовый уровень  $TE_{\text{макс}}$  для тиреотропного гормона составляет 23,7%). Напротив, для  $HbA_{1c}$   $TE_{\text{макс}}$ , установленная американской и европейской ассоциацией диабетологов, не должна превышать 6%, что значительно мягче, чем требования, установленные по данным биологической вариации этого аналита (базовый уровень  $TE_{\text{макс}} < 3,0$ ).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.3. Паспорт проекта

Когда определены цели, задачи, мотивирована команда исполнителей, понятны конкретные этапы реализации проекта, создается по принципу цикла DMAIC (от англ. Define, Measure, Analyze, Improve, Control) единый документ — паспорт проекта. Это наиболее полный и целостный способ совершенствования процессов. Согласно DMAIC, решение каждой задачи улучшения процесса или устранения проблемы должно последовательно пройти через несколько фаз; для каждой фазы предполагаются конкретные действия и инструменты. Описание работы по этим фазам выкладывается в паспорт проекта. *Паспорт проекта* — это соглашение между руководителем организации и проектной командой, в котором записаны ожидания заказчика. Паспорт — живой документ, который создается на начальном этапе работы рабочей группы и по мере реализации проекта редактируется. Паспорт позволяет прояснить ожидания, мотивировать команду на результат и определить предполагаемые выгоды. В паспорте фиксируются проблемы, границы, риски, цель оптимизации, целевой показатель. Такой документ рекомендуется иметь перед началом работ. Считается, что именно такая последовательность обеспечивает структурированный подход, позволяющий двигаться от определения сути проблемы к внедрению решений.

Таким образом, на базе Lean-клиентоориентированной концепции с учетом требований к аналитическому качеству внедряемой технологии выстраивается программа реализации проекта, которая излагается в паспорте проекта. Программа реализации проекта на основании фаз цикла DMAIC включает определение, измерение, анализ, совершенствование и проверку выбранных решений.

1. *Определение.* Цель этапа — понять, что именно и почему нужно совершенствовать. Выбираются цель оптимизации, процесс для улучшения, основные проблемы этого процесса и его границы, определяется команда проекта оптимизации. Есть смысл собрать представителей всех подразделений, которые участвуют в процессе, — все ключевые заинтересованные стороны, тех, кто обеспечивает вход и выход процесса. Для прохождения цикла DMAIC

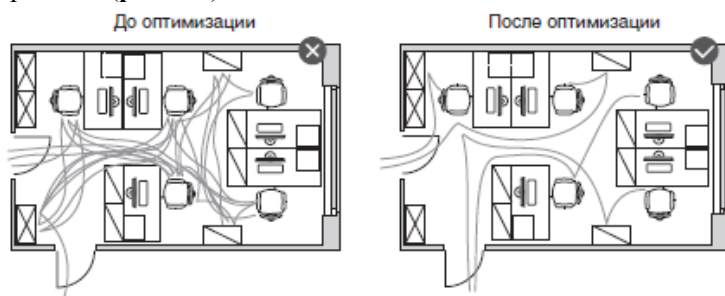
необходимо, чтобы у процесса был руководитель; именно ему предстоит принимать ключевые решения по оптимизации. На этой стадии происходит утверждение проекта у руководителя организации или должностного лица, который будет курировать проект и сможет обеспечить его приоритет и наличие ресурсов. Рекомендуются провести общую встречу участников проекта, на которой курирующий руководитель организации и руководитель проекта расскажут о предстоящих шагах. На этой же встрече курирующий руководитель сможет подчеркнуть ответственность каждого участника за общий результат, а также высказать свои ожидания от оптимизации. Важно отметить, что не только этот, но и все последующие этапы работ должны регулярно докладываться курирующему руководителю. И только после его одобрения проделанной работы и поддержки следующего этапа работ можно двигаться дальше.

Описать проблему — значит кратко указать, что работает не так и почему это нужно исправить. Предположения о причинах неполадок или о том, какие действия необходимо предпринять, здесь не требуются.

Особое внимание стоит уделить масштабу процесса. Желательно не подниматься слишком высоко, чтобы сохранить ценность процесса, не сделать его слишком общим. Масштаб можно менять в зависимости от уровня презентации: руководству по этой модели показывать сквозной кросс-функциональный процесс, а рабочим группам — описывать его части.

Сбор и анализ мнений может включать опросы в организации и интервью с клиентами/пациентами. На основании этих данных определяется целевой показатель оптимизации процесса. Анализ жалоб — это источник, из которого надо делать правильные выводы и формировать план действий по улучшению.

**2. Измерение.** Чтобы детально разобраться с процессом, необходимо понять, как он реализуется на месте, где происходит рабочий процесс, где сотрудники совершают определенные действия. В изучении рабочего процесса проводятся замеры процесса, сбор необходимой информации, есть возможность пообщаться с сотрудниками, которые выполняют процесс, узнать из первых рук о проблемах и потерях, услышать идеи для будущего улучшения, увидеть, что процесс не реализуется так, как написано в нормативном документе или как докладывают на совещаниях. В качестве примера приведем анализ движения проб пациентов в КДЛ до и после предложенной оптимизации процесса (**рис. 2.2**).



**Рис. 2.2.** Изменение перемещения сотрудников (маршрутизации проб) в результате оптимизации процесса. Линии отображают движения людей или проб в клинко-диагностической лаборатории

**3. Анализ.** Сделайте резюме по итогам проведенного измерения. Оно может быть в виде схемы, презентации, инфографики. В результате должны быть показаны картина реального процесса, болевые точки, будущие идеи для улучшения процесса. Как представлено на примере, движение биологического материала по лаборатории строго маршрутизировано. Нужна фиксация каждого действия, совершаемого в процессе, продолжительность наблюдений не менее 1 ч. В результате получится схема реального процесса, его болевые точки, идеи улучшения процесса, данные по процессу, понимание участниками необходимости перемен.

Фаза DMAIC «Анализ» предполагает работу групп по определенным правилам. В группу нужно включить всех участников процесса и представителей заинтересованных сторон. Соберитесь в большом помещении, представьте и обсудите шаги процесса. Проблемы, которые называют участники процесса, нужно записать и поместить на соответствующий шаг процесса.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

**4. Совершенствование процессов.** С точки зрения значимости действий в оптимизируемом процессе можно выделить три зоны: деятельность, добавляющую ценность; деятельность, не добавляющую ценность, и деятельность, которая не добавляет ценности, но необходима по регламенту. Во всех зонах рекомендуется выявлять потери.

Существует простой способ поиска коренных причин потерь — «пять почему». Суть метода заключается в том, чтобы, рассматривая проблему, пятикратно задавать вопрос: «Почему это произошло?» Инструмент наиболее эффективен при групповой работе.

Сформулируйте проблему, которую планируете решать; ее можно записать на доске или на карточке. Задается вопрос: «Почему это произошло?» — группа отвечает на него, записываются все варианты ответов, похожие ответы можно сгруппировать. На второй итерации вопрос «Почему это произошло?» задается по отношению к факторам, выявленным в первой итерации; на третьей — к факторам, выявленным в ходе второго ответа на вопрос, и т.д. Практика показывает, что чаще всего именно на пятом ответе происходит выявление «корневой» причины.

По выявленной причине проблем следует расставить приоритеты и начинать разрабатывать решения. Для поиска потенциальных решений рекомендуется применять мозговой штурм — свободную, не ограничиваемую разработку идей в группе. Результат мозгового штурма — множество предложений за короткое время. Эта ключевая техника креативности позволяет каждому участнику высказывать свое мнение в безопасной среде. Особенности мозгового штурма:



- не критикуйте чужие идеи, воздержитесь от их оценки, забудьте о догмах и стереотипах;
- чем больше идей, тем лучше;
- записывайте все предложения.

После мозгового штурма группе следует выбрать наиболее удачные инициативы, проработать их и довести до итоговых решений, которые надо будет проверить на следующем шаге.

**5. Проверка выбранных решений.** Для внедрения процесса существует практика пилотных проектов. Они дают возможность сразу запустить наиболее перспективную инициативу (или несколько инициатив). В течение «пилота» следует продолжать измерять показатель, который выбран для оптимизации процесса. Его динамика будет наглядно демонстрировать команде, что даже небольшие улучшения начинают работать на конечный результат. На фазе «Совершенствование» имеет смысл изучить опыт и практики других организаций и подразделений. Не исключено, что кто-то уже сталкивался с аналогичными проблемами и нашел решения, которые можно внедрить. Внедрение принятых решений следует документировать, указав три элемента: кто делает, что делает и когда делает. Рекомендуется проводить регулярные встречи команды проекта — 1 раз в неделю или 2 раза в месяц. На них рассматривают статус анализа и внедрения предложений, отслеживают динамику целевого показателя. Не реже 1 раза в месяц полезно показывать результаты оптимизации курирующему руководителю: это стимулирует команду активно продвигать и реализовывать свои инициативы.

По результатам «пилотов» закрепляются решения и создается системный подход к управлению процессом, определяется, как будет выглядеть целевой результат. Он закрепляется в нормативных документах, а команда продолжает отслеживать целевые показатели. В конце проекта необходимо поощрить команду за работу. Предпочтительны нематериальные способы поощрения: грамоты, фото, публикации и интервью с участниками в прессе и на информационных порталах. Продвижение результата будет способствовать тому, что в других организациях, включая КДЛ, начнется работа по улучшению результатов.

**Заключение.** Применение DMAIC к процессам напоминает работу врача: ему необходимо понять, что болит, описать симптомы, собрать информацию, назначить анализы и провести другие исследования, затем найти реальную причину болезни и понять, как ее устранить. А дальше врач следит за тем, чтобы пациент регулярно проходил обследования и контролировал свои показатели, например артериальное давление или уровень гликемии. На начальной стадии оптимизации важно, чтобы руководитель организации настойчиво и публично говорил о необходимости изменений. Нет необходимости обязательно проводить полный проект оптимизации, можно использовать отдельные инструменты для небольших улучшений конкретных функций. Если процесс не оптимизировали больше двух лет, в нем точно есть потери, и его можно улучшить. Важен вклад не только руководителей, но и рядовых сотрудников, их нужно привлекать к участию в оптимизации процессов.

Универсального решения, как всегда, нет. Рекомендуется пробовать разные подходы и выбирать то, что будет работать для вашей организации. Единственный совет — помнить о конечных бенефициарах процессов. В госсекторе ими могут быть и внутренние клиенты — сотрудники МО, и внешние — пациенты и бизнес. Чтобы действительно понять их запросы, нужны исследования, основанные на данных, и здесь в дополнение к традиционным процессным подходам появляются клиентоцентричные. С их помощью возможно проектировать процессы, благодаря которым пациенты будут получать то, что им по-настоящему важно.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.4. Управление персоналом

Управление персоналом является ключевой задачей менеджмента, персонал — основной ресурс любого производства. Процесс управления персоналом включает множество задач по кадровому учету, обучению, развитию, мотивации, планированию, анализу и оценке деятельности. Согласно профессиональному стандарту любой специальности, каждый сотрудник должен быть компетентным, иметь необходимое образование, подготовку, навыки и опыт для выполнения работы.

При эффективном взаимодействии между сотрудниками лаборатории, клиницистами, медицинскими сестрами, обслуживающим персоналом выстраивается стандартизация лабораторных процессов, что способствует повышению качества всего диагностического и лечебного процесса. В систему управления персоналом входят следующие элементы.

**Подбор и адаптация персонала.** Подбор сотрудников лаборатории осуществляется заведующим и отделом кадров в соответствии с требованиями к составу, численности штата и квалификации персонала лаборатории. Для сотрудника, поступающего в КДЛ, может быть установлен испытательный срок (3 мес). Программа адаптации сотрудника направлена на приспособление к условиям трудовой деятельности и социальной среде лаборатории, разрабатывается и включает несколько этапов информирования работника об условиях трудовой деятельности, о МО и об общих требованиях к охране труда и обеспечению безопасности труда.

**Обучение персонала.** Это один из главных разделов управления персоналом. Обучение сотрудников лаборатории выполняется согласно плану, который разрабатывается ежегодно. Он подразделяется на внутреннее и внешнее обучение. Внутреннее обучение проводится старшими врачами отделений, специалистами по контролю качества, заведующими лабораторией. Данные о проведенном обучении фиксируются в протоколе по проверке результатов обучения сотрудников. Внешнее обучение сотрудников лаборатории по дополнительным профессиональным образовательным программам осуществляется в образовательных и научных организациях, которые должны иметь лицензию на осуществление образовательной деятельности в соответствии с ФЗ РФ от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».



Для эффективной организации развития персонала лаборатории необходимо своевременно решать следующие задачи: поддерживать способных к обучению работников; распространять и внедрять лучшее из накопленных знаний; систематически обучать сотрудников лаборатории.

**Аккредитация персонала.** Порядок проведения аккредитации специалистов установлен приказом МЗ РФ от 28.10.2022 № 709н «Об утверждении Положения об аккредитации специалистов». Аккредитация специалистов лаборатории проводится по окончании освоения ими дополнительных профессиональных программ медицинского образования не реже 1 раза в 5 лет.

**Мотивация персонала.** Мотивация персонала предполагает регулярное выполнение сотрудниками требуемых действий для повышения качества работы. Она обеспечивает добровольное, а не административное вовлечение сотрудников в рабочий процесс. Мотивация персонала может быть: внешняя — оказание на персонал определенного воздействия, которое приведет к результату и получению за него либо поощрения, либо наказания; внутренняя — самостоятельное стремление персонала выполнить определенные действия для удовлетворения внутренних потребностей и возможного получения выгоды. Мотивация есть материальная и нематериальная. Материальная мотивация — это не только уровень заработной платы, но и социальный пакет. Нематериальная мотивация — когда сам человек хочет повышать свои знания, свой уровень компетенции и, соответственно, работать лучше и лучше, не допускать ошибок. Важно понимать, что, как и в любой сфере человеческой деятельности, ошибки, совершаемые в КДЛ, неизбежны. Задача каждой лаборатории — с помощью системы обеспечения качества создать надежный набор инструментов, позволяющий выявлять ошибки и проводить целенаправленные мероприятия, сводящие их к минимуму.

**Аттестация специалистов лаборатории** проводится с целью присвоения специалисту квалификационной категории: вторая, первая, высшая. Аттестация проводится аттестационной комиссией территориального или ведомственного органа управления, сформированной из экспертов по медицинским специальностям. Порядок прохождения медицинским персоналом аттестации по специальности установлен приказом МЗ РФ от 31.08.2023 № 458н «Об утверждении порядка и сроков прохождения медицинскими работниками и фармацевтическими работниками аттестации для получения квалификационной категории». Получение квалификационной категории способствует движению по тарифной сетке и повышению заработной платы сотрудников.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.5. Управление материально-техническими ресурсами

Согласно профессиональному стандарту «Специалист в области клинической лабораторной диагностики», к трудовой функции «управление материально-техническими, информационными и кадровыми ресурсами лаборатории» относятся:

- составление паспорта лаборатории;
- руководство внедрением и координация внедрения новых лабораторных методов;
- планирование потребности в материально-технических и кадровых ресурсах лаборатории;
- управление информационными ресурсами, процессами в лаборатории и ее структурных подразделениях;
- разработка, внедрение в деятельность лаборатории системы документооборота, в том числе в виде электронного документа, ее эксплуатация;
- подготовка плана закупок.

Для бесперебойной работы любое предприятие, в том числе лаборатория, должно вовремя получать необходимые ему сырье, материалы, комплектующие изделия в необходимом для производства продукции составе. Данные материально-технические ресурсы должны рационально использоваться, чтобы увеличивать производство продукции при оптимальном количестве сырья, материалов и снижать ее себестоимость. При планировании потребности в материально-технических ресурсах лаборатории необходимо принимать во внимание: планирование бюджета и закупок, классификацию и оценку запасов, управление группами материальных запасов (текущий запас, страховой, транспортный, технологический, неликвидный). Необходимо обеспечить процесс управления материальными запасами: отчетность, программное обеспечение, обеспечение безопасности. Потребность в запасах возникает в случае внедрения новых методик, испытаний, а также по мере расходования имеющихся запасов, по истечении срока их годности, при неудовлетворительных результатах контроля качества. Внеплановая потребность в реактивах может возникнуть при повышенном расходе, указывающем на наступление его дефицита до совершения следующей закупки; за 4 мес до истечения срока годности последней партии реактива.

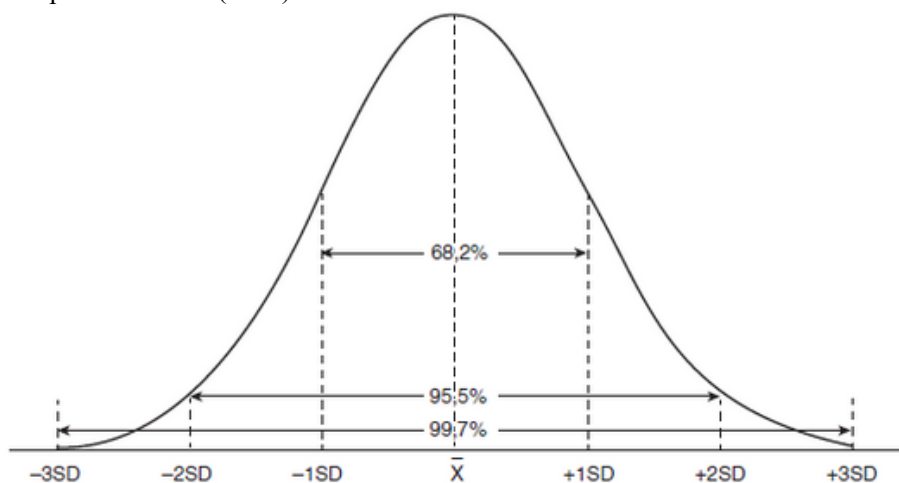
С помощью информационных технологий лаборатории могут отслеживать движение материалов, контролировать их использование и обеспечивать своевременную закупку. Сегодня элементы цифровизации присутствуют практически в любой сфере экономики, в любой отрасли, и лабораторный бизнес не является исключением. Правильно функционирующая система управления информацией лаборатории используется для сбора, обработки, записи, предоставления результатов, хранения и поиска данных. Система управления информацией должна быть защищена от искажения, потери данных, несанкционированного доступа, должна соответствовать спецификации лаборатории.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.1.6. Методология «шесть сигм» в оценке аналитического процесса

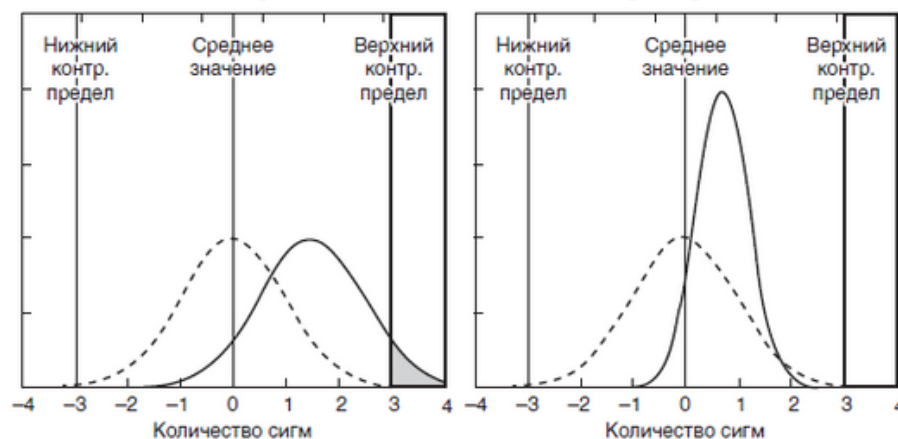
В середине 1980-х гг. под влиянием теории всеобщего управления качеством корпорации Motorola была разработана концепция «шесть сигм» (Six Sigma, «6  $\sigma$ »). В результате применения этой методологии на производстве был получен положительный экономический эффект (в 20 раз снизилось количество брака). В дальнейшем популярность концепции «6  $\sigma$ » постепенно возрастала, в комплексе с концепцией «бережливого производства» она стала применяться в разных областях: машиностроении, банковском деле, строительстве, медицине.

Концепция «6  $\sigma$ » — это улучшение качества, выявление проблем, снижение брака посредством анализа данных с использованием статистических расчетов. Концепция позволяет измерять уровень качества и основана на прямой зависимости между количеством дефектной продукции, величиной производственных затрат и уровнем удовлетворенности потребителей качеством продукции. Со статистической точки зрения, процесс «6  $\sigma$ » означает, что на 1 млн возможностей допускается только три-четыре ошибки, то есть «уровень успешности» работы организации составляет 99,9997%. Большинство современных производств и организаций работают на уровне «3  $\sigma$ », что подразумевает наличие 66 800 дефектов на 1 млн возможностей. С практической точки зрения концепция «6  $\sigma$ » определяет как стратегию контроля качества, направленную на повышение эффективности всех процессов. По сути этой методологии любой процесс, описываемый нормальным или Гауссовым распределением (**рис. 2.3**), является процессом «3  $\sigma$ ». Это означает, что если, например, измерить бесконечное количество раз концентрацию аналита в одной пробе, то 99,7% результатов измерений попадут в пределы  $\pm 3$  среднеквадратических (стандартных) отклонения (SD) (или «3  $\sigma$ ») от среднего значения измеряемой величины. Именно на этом положении основаны правила Вестгарда оценки результатов контрольных измерений, которые приведены выше для внутрилабораторного контроля качества (ВКК).



**Рис. 2.3.** Нормальное распределение результатов измерения аналита в пробе, при котором 99,7% результатов попадают в пределы  $\pm 3$  стандартных отклонения от среднего арифметического значения ( $X_{\text{ср.}}$ )

Термин «6  $\sigma$ » возник от стремления добиться такого разброса результатов исследования аналита, чтобы  $\pm 6 \sigma$  уложились в интервале от нижнего до верхнего предела приемлемости качества. На **рис. 2.4** показаны два процесса измерения концентрации одного и того же аналита с помощью разных аналитических систем. На **рис. 2.4, а**, представлен процесс, который с точки зрения воспроизводимости практически укладывается в пределы приемлемости. Появление даже небольшого смещения приведет к выходу части распределения за пределы приемлемости и к существенному увеличению количества ошибок. На **рис. 2.4, б**, в тех же координатах показан график процесса, воспроизводимость которого в 2 раза лучше, то есть  $\sigma$  в 2 раза меньше. В этом случае, если даже смещение достигнет 1,5  $\sigma$ , количество ошибок останется очень низким. Значение 1,5  $\sigma$  для смещения было взято не случайно. Разработчики концепции «6  $\sigma$ » в результате тщательного исследования сделали вывод, что со временем даже хорошо отрегулированный, достаточно стабильный процесс может давать сдвиги в среднем значении до 1,5  $\sigma$ . Причины смещения могут быть разными и зависеть от многих факторов.



**Рис. 2.4.** Графическое изображение процесса «6  $\sigma$ »: а — смещение процесса с низкой воспроизводимостью приводит к существенному увеличению ошибок лабораторного процесса в целом; б — смещение процесса с высокой воспроизводимостью не сопровождается увеличением ошибок лабораторного процесса в пределах допустимого аналитического качества

Методология «6 ó» направлена на максимальное удовлетворение ожиданий потребителя и касается всего процесса производства. Потребителями услуг медицинской лаборатории являются клиницисты и пациенты.

Основные требования пациента: достоверность результата анализа, скорость выполнения анализа, доступность услуг 24 ч 7 дней в неделю, безопасность (при взятии пробы), разнообразный спектр лабораторных тестов по приемлемой цене, а также вежливость персонала.

Требования врача-клинициста: достоверность результатов; высокая клиническая чувствительность, специфичность и диагностическая значимость тестов; быстрота получения результата; возможность выполнения теста у постели больного (для отделений реанимации и интенсивной терапии); минимальный объем пробы (педиатрия и гериатрия); высокая квалификация персонала лаборатории и консультационная помощь лабораторных специалистов.

Организация работы лаборатории по принципу «6 ó» означает полное отсутствие претензий у потребителя. Такая ситуация сейчас представляет собой недостижимый идеал, но служит ориентиром в работе.

Для расчета количества ó необходимо знать коэффициент вариации (CV) из результатов внутреннего контроля качества, систематическую погрешность или смещение (B, Bios) из результатов ВОК, а также так называемые пределы приемлемости, то есть  $TE_{\text{макс}}$ . Величина последней определяется нормативными документами, принятыми в каждой стране. В России это ГОСТ Р 53133.1-2008. Приложение 2 этого документа содержит предельные допустимые значения (ПДЗ)  $B_{20}$  и  $CV_{20}$ , которые рекомендуется использовать для расчета  $TE_{\text{макс}}$  по формуле:

$$TE_{\text{макс}} = B_{20} + 2CV_{20}.$$

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Данные этого документа основаны на биологической вариации аналитов.

Расчет количества ó проводится по следующей формуле:

$$\text{Sigma} = \frac{(TE_{\text{макс}} - B)}{CV},$$

где  $TE_{\text{макс}}$  — установленные в лаборатории требования к аналитическому качеству; CV — долгосрочный коэффициент вариации, полученный из результатов ВКК; B — смещение из результатов ВОК.

Рекомендованное применение сигматрии при оценке качества аналитического процесса в КДЛ — не реже 1 раза в год. Необходимо использовать CV и B для концентраций, лежащих в зоне принятия диагностического решения, так как в этой зоне «цена ошибки» наиболее высока. Расчет количества ó применяется для управления качеством аналитического процесса. Оценку результатов сигматрии проводят следующим образом:

- 6 ó и более — отличный результат;
- >5 ó — проблем с аналитом нет;
- <5 ó — надо думать об улучшении качества;
- <4 ó — готовы серьезные изменения (вплоть до смены методики);
- <3 ó — процесс нестабилен.

Результаты сигматрии можно использовать при планировании проведения работ по контролю качества (табл. 2.2).

Под планированием качества подразумевается подбор адекватной системы для каждого аналита, удовлетворяющей требованиям к аналитическому качеству при минимальных затратах. Суть ее сводится к формированию нескольких групп аналитов: первая группа — ó >6, вторая группа — от 4 до 6, третья — от 3 до 4 и четвертая — <3. В первую группу попадают аналиты, аналитическое качество которых можно контролировать по упрощенной схеме, экономя время и средства одним запрещающим правилом  $1_{3,5S}$  для двух уровней КМ, анализируемых через день. Во вторую группу попадают аналиты, для которых рекомендуется использовать правило  $1_{2,5S}$  для двух уровней концентрации КМ (два измерения в день). В третью группу попадают так называемые проблемные аналиты, показывающие плохое аналитическое качество. Для этой группы рекомендуется применение предупредительного правила  $1_{2S}$  и всего комплекта правил Вестгарда для двух уровней КМ, анализируемых дважды в день (четыре контрольных измерения).

**Таблица 2.2.** Результаты сигматрии и алгоритм ведения контроля качества

Результат сигматрии аналитов	Контрольные правила (N — число контрольных измерений в день)
Количество ó >6	$1_{3,5S}$ при N=1
Количество ó между 4 и 6	$1_{2,5S}$ при N=2
Количество ó <4 (проблемные аналиты)	Правила Вестгарда при N=4
Количество ó <3 (нестабильность процесса)	Правила Вестгарда при N=9

Для четвертой группы (ó <3) следует использовать правила Вестгарда при исследовании трех уровней концентрации КМ трижды в день (см. табл. 2.2). Дополнительно для этой группы аналитов рекомендуется проводить анализ проблем аналитической системы, разрабатывать корректировочные и предупреждающие действия. Для нестабильных аналитов необходимо проводить оценку аналитических характеристик используемого метода, тщательно выбирать закупаемые реагенты, калибраторы и расходные материалы, контролировать условия их хранения, проводить систематическое техническое обслуживание оборудования, использовать высококвалифицированный персонал.

Использование сигматрии помогает количественно охарактеризовать качества аналитической системы или метода в конкретной лаборатории и позволяет специалистам КЛД продуманно и дифференцированно подходить к проблеме

обеспечения аналитического качества, уделять больше внимания проблемным анализам и максимально снизить количество ложных выбраковок результатов для стабильных методик.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

2.2. Организация лабораторного процесса в медицинской лаборатории согласно нормативным документам и отраслевым стандартам

2.2.1. Разработка лабораторной документации (руководства по качеству, политики в области качества)

Разнообразие клинических задач требует расширения спектра лабораторных исследований, выполняемых в разных условиях, на разном оборудовании, с разными реагентами и расходными материалами. При всем разнообразии практических форм лабораторного обеспечения медицинской помощи существуют общие принципы организации деятельности лабораторных структур, поставляющих клинически важную информацию. Для обеспечения стандартизации в лабораторной медицине Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии утвержден технический комитет № 380 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы инвитро». Методическое руководство работой технического комитета № 380, мониторинг и контроль над его деятельностью осуществляют Росстандарт и подведомственный ему Институт стандартизации. Одной из основных задач технического комитета № 380 является непрерывное повышение качества клинических лабораторных исследований.

Основным документом, регламентирующим ключевые стороны работы медицинской лаборатории, является ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетенции», являющийся русскоязычной версией международного стандарта ISO 15189. Согласно этому стандарту, администрация КДЛ должна разработать и внедрить систему менеджмента качества, предполагающую стандартизацию лабораторного процесса с разработкой и использованием необходимой для этого документации.

Руководство по качеству КДЛ включает в себя паспорт лаборатории и описание управленческих и технических процессов, применяемых в лаборатории для реализации соответствия требованиям национальных стандартов. Типовая модель руководства по качеству представлена в ГОСТ Р 53079-2008 «Технологии лабораторные клинические.

Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по управлению качеством в КДЛ. Типовая модель».

*Руководство по качеству КДЛ* содержит описание структуры лаборатории. В этот раздел необходимо включить документы, подтверждающие функционирование системы менеджмента качества в лаборатории: порядок рассмотрения контрактов, порядок приобретения оборудования, реагентов и расходных материалов, регламент оказания консультативных услуг и урегулирования претензий. Должен быть определен алгоритм действий сотрудников в случае выявления и устранения несоответствий (ошибок), показан процесс проведения непрерывного совершенствования путем своевременного выявления недостатков, их анализа и разработки корректирующих и предупреждающих действий. Раздел «Технические требования» включает в себя описание кадрового состава лаборатории, производственных условий и условий окружающей среды, перечень оборудования, алгоритм процедур, выполняемых до и после исследования, правила проведения ВКК, формы представления отчетов о результатах исследования, правила ведения учетно-отчетной документации лаборатории.

*Политика в области качества* определяет задачи в области непрерывного повышения качества лабораторного процесса. В этом документе устанавливается уровень качества работы, обязательный для реализации сотрудниками лаборатории, декларируются критерии повышения качества лабораторных услуг. Совершенствование всех этапов лабораторного процесса проводится путем их правильной организации, введения «управления рисками», проведения систематического контроля качества, процедуры межприборных сличений и использования квалифицированного персонала.

Документ «Политика в области качества» должен включать разделы:

- 1) организация лабораторного процесса;
- 2) обеспечение качества лабораторного процесса;
- 3) введение процесса «управления рисками»;
- 4) контроль качества лабораторного процесса;
- 5) обучение персонала.

Организацию лабораторного процесса осуществляет администрация лаборатории. Основными принципами организации являются стандартизация в соответствии с ГОСТ Р ИСО 15189, ГОСТ Р ИСО 9001, разработка и внедрение системы менеджмента качества, проведение непрерывного анализа эффективности функционирования лабораторной службы, использование высококвалифицированного персонала, высокотехнологичных аналитических систем.

Обеспечение качества лабораторного процесса осуществляют администрация лаборатории, специалист по качеству (если таковой имеется), ответственные врачи в лабораторных подразделениях, рядовые сотрудники лаборатории. Администрация лаборатории и/или специалист по качеству разрабатывают и вводят в действие единые формы ведения документации в соответствии со стандартами ГОСТ Р ИСО, лабораторные документы и СОП, обеспечивающие единство качества преаналитического, аналитического и постаналитического этапов. На основании действующих нормативных документов администрация лаборатории устанавливает правила проведения контроля качества, требования к аналитическому качеству проводимых исследований, правила учета и анализа лабораторных ошибок, правила выдачи и доставки результатов клинических лабораторных исследований. Заведующий лабораторией осуществляет контроль использования аналитического оборудования, зарегистрированного в МЗ РФ, периодически проверяет профессиональную подготовленность персонала и обеспечивает его необходимую численность.

Специалист по качеству реализует задачи в области обеспечения качества, проверяет соблюдение технологических процедур, осуществляет координацию действий лабораторных подразделений, организует проведение внутреннего аудита.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Врачи КЛД на рабочих местах проверяют правильность выполнения сотрудниками процедур, оценивают результаты лабораторных исследований, проводят корректирующие мероприятия в случае выявления нарушений в работе. В их обязанности входят контроль правильности ведения документации, анализ лабораторных ошибок, верификация результатов с точки зрения биологической достоверности, клинической значимости и динамической прослеживаемости.

Использование технически исправных аналитических систем — обязательное требование для выполнения качественных исследований, их своевременное освидетельствование специалистами инженерной службы, систематическое проведение технического обслуживания — необходимое условие отсутствия аналитических проблем в лаборатории.

*Управление рисками лабораторного процесса* заключается в разработке алгоритма установления рисков выдачи неправильного результата, регистрации лабораторных ошибок, анализа их причин, реализации правил их исправления, введения мероприятий по разработке корректирующих и предупреждающих действий. Важно, чтобы в лаборатории проводился мониторинг качества лабораторных исследований, осуществлялись мероприятия по выявлению и устранению причин снижения его уровня. Для предупреждения лабораторных ошибок необходимо проводить проверку воспроизводимости результатов с использованием данных ежедневного контроля качества, правильности с применением экспертной оценки в программах ВОК, динамической прослеживаемости результатов.

*Обучение персонала* является важнейшим фактором, повышающим качество работы лаборатории. Администрация лаборатории утверждает план проведения занятий с персоналом лаборатории. Занятия проводятся администрацией лаборатории, специалистом по качеству, инженерно-техническим персоналом фирм-поставщиков. Цель занятий: обучение работе с оборудованием, следование единым правилам проведения ВКК, исполнение регламентов, методических рекомендаций, инструкций, СОП, стандартных диагностических процедур, определяющих деятельность лаборатории.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.2.2. Стандартные операционные процедуры как элемент обеспечения качества

Для реализации требований ГОСТ Р ИСО 15189 в лаборатории должны быть разработаны, утверждены и введены в действие СОП по проведению всех этапов лабораторного процесса. СОП — документ, описывающий технологию и последовательность процедур операционного процесса. Применение СОП в практической деятельности лаборатории — один из показателей высокого уровня организации работы. СОП необходима при выполнении манипуляций с критическими аспектами, для установления последовательности действий, а также при выполнении трудоемких процедур, требующих дополнительного обучения персонала. Документ должен быть детальным, ясным, немногословным, понятным даже сотрудникам с небольшим опытом работы, должен содержать не только описание процедур выполнения исследования согласно инструкции производителя лабораторного теста, но и включать алгоритм выполнения процедуры. СОП описывают подробный алгоритм действий; кто участвует в реализации; в каком подразделении лаборатории выполняется процедура; в какой временной промежуток необходимо уложиться; в какой последовательности и при каких обстоятельствах должен осуществляться процесс.

Ответственность за разработку и внедрение СОП в лабораторный процесс возлагается на заведующего лабораторией. Заведующий должен назначить ответственного сотрудника, контролирующего работу по подготовке и реализации документа. Разработка СОП начинается на рабочем месте. В СОП должны быть перечислены национальные стандарты (ГОСТ Р ИСО), нормативные документы (приказы, правила) и любые другие источники информации, которые использовались при его создании. Документ должен включать определения, термины, сокращения, применяемое оборудование, требования к условиям окружающей среды и процедуре выполнения, действия при обнаружении несоответствий, приложения, лист фиксации и лист изменений. Формулировки должны быть конкретными без использования сослагательного наклонения, неопределенностей и сложных определений.

СОП сохраняют в электронной форме. Электронная форма проверяется ответственным за написание СОП сотрудником (менеджером по качеству, специалистом по качеству), обсуждается среди пользователей, адаптируется на рабочем месте. Затем проводится окончательная редакция документа с учетом комментариев и возможных поправок, возникших в процессе обсуждения и адаптации. На рабочем месте проводится обучение сотрудников, которые письменно подтверждают процедуру проведения обучения. Документу присваивается индивидуальный номер, он утверждается у руководства лаборатории и вносится в реестр документов «Руководства по качеству КДЛ». Основания для модификации СОП — изменение условий исследования, методики, требований к проведению исследований, аналитической системы.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.2.3. Стандартизация преаналитического этапа лабораторного процесса

Преаналитический этап — процедуры, хронологически начинающиеся с назначения клиницистом исследования, включения исследования в заявку, подготовки пациента, взятия первичной пробы, транспортировки ее в лабораторию

и заканчивающиеся началом исследования. Преаналитический этап делится на две стадии: внелабораторную и внутрилабораторную.

Внелабораторная стадия включает: выбор и назначение исследования врачом; подготовку пациента к проведению анализа; взятие образца биоматериала, чаще всего клиническим медицинским персоналом; маркировку образца для идентификации его с пациентом; первичную обработку, краткосрочное хранение и транспортировку образца биоматериала в лабораторию.

Внутрилабораторная стадия: регистрация образца биоматериала; распределение проб по рабочим местам; пробоподготовка.

На результаты лабораторных исследований могут влиять:

- ошибки идентификации пациента и образца биоматериала;
- биологические факторы — пол, возраст, этнос, физиологическое состояние (тренированность, беременность), биологические ритмы, влияние среды;
- устранимые факторы — прием пищи, голодание, положение тела, физическая активность, курение, употребление алкоголя;
- ятрогенные факторы: диагностические процедуры (пальпация, пункция, биопсия, функциональные тесты, физический стресс при нагрузках, введение контрастных сред); оперативные вмешательства; лечебные процедуры (инъекции и трансфузии); прием лекарственных препаратов;
- условия взятия, временного хранения и транспортировки материала; подготовка пациента (сидя, лежа); процедуры взятия крови, мочи, других биоматериалов; посуда (чистота, материал); воздействие факторов среды (температура, состав атмосферы); консерванты, антикоагулянты;
- процедуры первичной обработки (смешивание, центрифугирование, охлаждение, замораживание);
- свойства аналита: биологический полупериод распада аналита; стабильность в биологическом материале при разных температурах; метаболизм *in vitro*, включая чувствительность к свету.

Сложность организации преаналитического этапа приводит к достаточно высокой доле выявляемых ошибок на этом этапе: от 46 до 68% на внелабораторной стадии и 3–5% на внутрилабораторной. Проблемы организации преаналитического этапа обусловлены преобладанием ручного труда, использованием многочисленного персонала с разной степенью подчиненности и разным уровнем образования.

Для качественного выполнения процедур преаналитического этапа в лаборатории проводится его стандартизация.

В связи с тем что специфика МО и КДЛ, обслуживающих эти МО, достаточно разнообразна, единого стандарта по ведению преаналитического этапа не существует. Сотрудникам КДЛ совместно с клиницистами МО, используя национальные и международные стандарты и рекомендации, необходимо разработать и ввести в действие внутренний стандарт преаналитического этапа конкретной МО. Обоснование создания СОП «Порядок проведения преаналитического этапа лабораторных исследований» изложено в национальном ГОСТ Р 53079.3-2008 («Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Правила взаимодействия персонала клинических подразделений и клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций при выполнении клинических лабораторных исследований»). В пункте 4.3 этого документа указано, что для оптимального проведения преаналитического этапа в лаборатории «должны быть разработаны подробные инструкции для пациентов и клинического персонала по подготовке пациентов к проведению лабораторных тестов разных видов, правила взятия образцов биоматериала, условия их первичной обработки, хранения и транспортировки в лабораторию». Инструкция разрабатывается сотрудниками КДЛ при участии персонала клинических отделений.

Инструкция «Правила проведения преаналитического этапа лабораторных исследований» утверждается у руководителя МО и подлежит исполнению сотрудниками клинических отделений.

**Внелабораторная часть преаналитического этапа** начинается с назначения клиницистом перечня анализов, необходимых для постановки диагноза или мониторинга состояния здоровья пациента. Обоснованность назначения лабораторного обследования — важный критерий качества преаналитического этапа. Большое значение имеет выбор оптимального объема, основанного на предполагаемом диагнозе. Неумение правильно сформировать направление на лабораторное обследование — один из самых распространенных источников ошибок клиницистов и причина увеличения затрат на лечение больных. Минимальное количество тестов может быть недостаточным для своевременной диагностики и затянуть время на принятие клинического решения. Избыточный набор лабораторных анализов по типу «все» может увести клинициста в сторону от реального состояния пациента, привести к потере времени на постановку диагноза. Анализы, назначенные для подтверждения или исключения маловероятной болезни, могут принести больше вреда, чем пользы, привести к дополнительному дорогостоящему обследованию, повлечь небезопасные для пациента инвазивные процедуры, способные ухудшить состояние его здоровья.

**Выбор обоснованного оптимального набора тестов** возможен только при хорошей профессиональной подготовке лечащего врача, знания им клинических рекомендаций, диагностической значимости аналитов и технических возможностей лаборатории. Клиницист должен хорошо ориентироваться в клинических лабораторных тестах, хотя в условиях стремительного развития современной лабораторной службы уследить за разнообразием лабораторных исследований достаточно сложно. Поэтому наилучшее решение этой проблемы возможно при непосредственном контакте врача-клинициста и врача КЛД. Информированность врачей клинических отделений напрямую зависит от сотрудничества с врачами лабораторной службы, которые призваны разъяснять диагностическую значимость лабораторных аналитов, организовывать семинары и занятия, посвященные их клинической информативности, уделять особое внимание интерпретации результатов исследований.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

*Форма бланка заявки* разрабатывается в лаборатории. Главное требование к бланку (направлению на анализ) — удобство работы с ним для клиницистов, медсестер и лабораторных регистраторов. Наилучшее решение в современной лаборатории — организация электронной регистрации заявок в МИС или в ЛИС (включая удаленную регистрацию из внешних МО).

*Подготовка пациента к исследованиям* — одна из важных составляющих внелабораторной части преаналитического этапа. В обязанности врачей КЛД входит информирование о технологии подготовки пациента к обследованию. На качество результатов лабораторных анализов оказывают влияние диета, физическое и эмоциональное состояние пациента, суточные ритмы. Врачи лаборатории разрабатывают инструкции, методические указания, памятки по подготовке к конкретному виду обследования. Клинический персонал информирует пациента о необходимости выполнения требований и следит за их соблюдением. Лечащий врач объясняет пациенту необходимость назначения лабораторного обследования, палатная или процедурная медицинская сестра информирует его о правилах подготовки к процедуре. Нарушения, связанные с неправильной подготовкой пациента:

- липемия (хилез) сыворотки (кровь взята не натощак);
- отсутствие коагуляции в образцах для исследования гемостаза (взятие крови на фоне приема антикоагулянтов);
- физиологический лейкоцитоз (взятие крови после физических упражнений, приема пищи, сильного эмоционального возбуждения).

Врачи КЛД должны отличать лабораторные несоответствия из-за нарушения правил подготовки пациента к обследованию от патологического состояния пациента. Это возможно лишь при тесном контакте с клиницистами. В обязанности врачей КЛД входит предупреждение пациентов и лечащих врачей о влиянии ЛС и диагностических процедур на лабораторный результат. Для этого разрабатывается стандарт подготовки пациента с указанием влияния лечебных манипуляций и приема лекарственных препаратов на результат исследования и определяется механизм его предупреждения.

*Идентификация пациента* — важный технологический процесс. На этом этапе встречаются два вида ошибок: ошибки маркировки образца и ошибки при заполнении направления на анализ. Существенное улучшение этой процедуры следует за внедрением штрихкодирования при маркировке проб.

*Инструкция «Порядок получения крови и биоматериала»* разрабатывается сотрудниками лаборатории, утверждается руководством МО. Действующую инструкцию администрация лаборатории передает заведующим клиническими и реанимационными отделениями, которые доводят ее до сведения старших, процедурных и палатных медицинских сестер отделений. Средний медицинский персонал изучает инструкцию, под руководством старших медицинских сестер отделений проходит тестирование по основным вопросам документа, при положительной оценке результатов тестирования приступает к выполнению процедур. Если при изучении возникают проблемы с пониманием документа и знания сотрудников оцениваются как неудовлетворительные, с этими сотрудниками проводятся занятия с привлечением специалистов лаборатории. Процедурные сестры должны не только знать последовательность манипуляций, но и уметь качественно их выполнять. Для изучения конкретных процедур и манипуляций администрация лаборатории организывает для клинического персонала мастер-классы с отработкой техники флеботомии на муляжах. Занятия с процедурными сестрами включают не только процесс обучения их технике и последовательности действий флеботомии, но и акцентирование внимания на возможных последствиях в случае неправильного выполнения процедуры.

*Правила хранения образца и доставки его в лабораторию.* Стандартизация этой процедуры имеет принципиальное значение для централизованных лабораторий. Персонал клинических отделений должен быть проинформирован о сроках доставки образцов в лабораторию без потери качества пробы. В инструкции должны быть разделы, посвященные правилам доставки образцов, месте приема образцов, указана персональная ответственность за правильное и своевременное выполнение доставки.

Многие лаборатории (особенно обслуживающие внешние лечебные учреждения) используют для получения сыворотки или плазмы пробирки с разделительным гелем или подобными технологиями. После центрифугирования таких пробирок между форменными элементами крови и сывороткой создается надежный долговременный барьер, что позволяет увеличить сроки доставки проб в лабораторию. Использование биохимических пробирок без разделительного геля значительно снижает временной интервал доставки проб. В этом случае пробы крови должны быть доставлены в лабораторию в течение часа после взятия, центрифугированы и отделены от контакта с клетками крови в течение следующего часа.

*Доставка гематологических образцов.* Оптимальное время гематологического исследования крови — в интервале от 1 до 4 ч после взятия. В промежутке от 5 до 30 мин происходит временная адаптация тромбоцитов к антикоагулянту и их агрегация, что может привести к ложному снижению их количества в пробе. При необходимости проведения отсроченного анализа (например, длительная транспортировка) пробы венозной крови хранят в холодильнике при температуре от 4 до 8 °C и исследуют в течение 24 ч. При этом следует учитывать, что при длительном хранении происходит набухание клеток и изменение параметров, связанных с их объемом. У практически здоровых людей эти изменения не носят критического характера и не сказываются на количественных параметрах, но при наличии патологических клеток последние могут меняться или даже разрушаться в течение нескольких часов с момента взятия крови. Кровь нельзя замораживать.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

*Доставка проб для исследования параметров гемостаза.* Для исследования плазменных показателей пробирки должны быть доставлены в лабораторию в течение 45 мин, для исследования агрегационной активности тромбоцитов — в течение не более чем 15 мин с момента взятия крови. При невозможности соблюдения вышеуказанных



требований в лабораторию доставляется центрифугат бедной тромбоцитами плазмы в течение не более 3 ч с момента взятия крови.

*Правила приема крови и биоматериала в лаборатории* регламентируют процедуру входного контроля образцов в приемных пунктах лаборатории. Правила обязательны для исполнения регистраторами/лаборантами и процедурными сестрами клинических отделений. Прием образцов крови и биоматериала осуществляют в утренние часы. Сотрудники лаборатории (регистраторы, лаборанты) должны проверить качество доставленных образцов, правильность маркировки пробирок/контейнеров, соответствие сопроводительной документации и отметить время поступления пробы в лабораторию. В правилах приема образцов должны быть определены критерии отказа в приеме материала на исследования (например, отсутствие этикетки со штрихкодом на контейнере или бланке заявки; материал взят или собран не с тем антикоагулянтом или консервантом; превышение сроков доставки, наличие сгустков в цельной крови с антикоагулянтом и пр.). Выявленные несоответствия фиксируют в лабораторной документации. Если нарушения связаны с качеством образца, ошибками, которые исправить нельзя (например, присланы немаркированные пробирки или образцы, взятые в неправильный контейнер), проводится выбраковка с регистрацией, некачественный образец утилизируется. Сотрудника, доставившего образец, информируют о необходимости проведения повторного сбора биоматериала.

**Лабораторная часть преаналитического этапа** начинается с момента доставки пробы и заявки в лабораторию. Ответственные за этот участок работы сотрудники проводят оценку качества и своевременности поступления доставленного материала. К пробоподготовке допускаются только качественные образцы. Если в процессе обработки проб выявляются дефекты (гемолиз, хилез, сгустки), ответственный персонал осуществляет выбраковку с записью о причинах выбраковки в журнале дефектуры. Врач лабораторного подразделения информирует лечащего врача пациента о невозможности выполнения исследования и необходимости повторного взятия крови или сбора биоматериала с соблюдением правил преаналитического этапа. Переданная информация регистрируется в журнале телефонограмм с указанием фамилии сотрудника лаборатории, передавшего сообщение, и сотрудника клинического отделения, принявшего его.

Протокол анализа ошибок преаналитического этапа составляют врачи лабораторных подразделений на основании анализа зарегистрированных в журналах отдела лабораторной диагностики преаналитических нарушений. Анализ проводят ежемесячно на рабочих местах, при этом ошибки подсчитывают, дифференцируют, анализируют причины, разрабатывают алгоритм предупреждающих и корректирующих мероприятий.

Согласно ГОСТ Р ИСО 15189-2024, в лаборатории должны быть установлены ИК преаналитического этапа — объективные и измеряемые количественные характеристики качества процесса. ИК — доля преаналитических несоответствий и дефектов к общему количеству доставленных образцов зарегистрированных в лабораторной документации (гемолиз, хилез, наличие сгустков, нарушение температурного режима при доставке образцов, ошибки в маркировке, ошибки в сопроводительной документации, нарушения при процедуре флеботомии). Изменение показателя в сторону увеличения свидетельствует об ухудшении качества процесса, снижения — об улучшении. ИК служит основанием для разработки корректирующих и предупреждающих мероприятий. Мероприятия заключаются в проведении занятий с процедурными сестрами, обеспечении процедурных кабинетов качественными системами для взятия крови и необходимыми расходными материалами, снижении времени доставки образцов из приемных пунктов в лабораторные подразделения.

Книга претензий и жалоб предназначена для их регистрации и последующего анализа, который проводят ежемесячно сотрудники лаборатории (заведующие лабораторией, ответственные врачи лабораторных подразделений, специалисты по качеству). Персонал лаборатории анализирует жалобы на предмет их обоснованности. По итогам анализа жалоб и претензий в случае их обоснованности разрабатываются корректирующие действия.

Списки о персональном распределении обязанностей и ответственности персонала за выполнение процедур имеют единую форму, своевременно корректируются. В списке указываются фамилия сотрудника, зона его ответственности за определенный временной период. Информированность сотрудника об ответственности на определенном участке подтверждается его подписью в соответствующей графе списка.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.2.4. Стандартизация аналитического этапа лабораторного процесса

Стандартизация аналитического этапа лабораторного процесса способствует качественному выполнению лабораторных исследований, обеспечивает точность и правильность отчетов, предупреждает выдачу ошибочных результатов клиницисту/пациенту.

Аналитический этап включает комплекс процедур, объединяемых методикой исследования и завершающихся получением результата в числовой или описательной форме. В рамках аналитического этапа на результат оказывают влияние условия выполнения анализа и компоненты аналитической системы.

На этом этапе необходим налаженный алгоритм действий сотрудников лаборатории при выполнении процедур.

Требуются входной контроль используемых калибраторов, реагентов и КМ, проверка рабочего состояния аналитических систем. С целью стандартизации аналитического этапа в лаборатории необходимо разработать и ввести в действие инструкции, правила, СОПы, регламентирующие алгоритмы проведения аналитического этапа, процедуры ВКК и участие в системах ВОК.

Перечень документов аналитического этапа разрабатывается и утверждается заведующим лабораторией, он индивидуален для каждой конкретной лаборатории с учетом ее специфики. В перечне должны быть представлены действующие документы лабораторного подразделения (бумажные или электронные формы, журналы, протоколы), а также рекомендации для сотрудников по их оформлению и ведению. Стандартные диагностические процедуры



аналитического этапа разрабатывают ответственный врач подразделения совместно со специалистом по качеству лаборатории (при наличии), утверждает и вводит в действие заведующий лабораторией. Стандартные диагностические процедуры аналитического этапа описывают действия сотрудников при реализации ежедневных процедур по выполнению и контролю качества лабораторных исследований. В документе описываются принципы планирования качества с использованием современных методов оценки.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.2.5. Стандартизация постаналитического этапа лабораторного процесса

Стандартизация постаналитического этапа оптимизирует выпуск лабораторных отчетов, предупреждает выдачу ошибочных результатов, способствует сокращению времени получения лабораторной информации врачами-клиницистами.

Постаналитический этап включает внутри- и внелабораторную стадии.

С целью стандартизации постаналитического этапа в лаборатории необходимо определить перечень документов постаналитического этапа, разработать рекомендации для сотрудников по их оформлению и ведению, создать и ввести в действие стандартную диагностическую процедуру «Организация постаналитического этапа лабораторных исследований», включающую:

- СОП «Порядок выдачи результатов исследований» с алгоритмом выявления и регистрации лабораторных ошибок, установления их причин, разработки корректирующих мероприятий;
- СОП «Порядок выдачи “критических” результатов»;
- СОП «Порядок хранения отработанных образцов»;
- СОП «Порядок взаимодействия персонала лаборатории и клинических отделений».

*Верификация результата* — проверка правильности выполнения лабораторного исследования. Проверка осуществляется ответственным врачом лабораторного подразделения. Согласно СОП, врач анализирует данные ВКК, проводит оценку качества работы оборудования. Оценка биологической вероятности результата проводится путем сопоставления полученных показателей исследуемого образца с референсными значениями и с данными, полученными у этого же пациента ранее (delta check). Если правильность выполнения исследования не вызывает сомнения, результат исследования одобряется (валидируется).

При получении сомнительных, маловероятных, динамически не прослеживаемых результатов врач КЛД должен выяснить причину ошибки, исключить возможность преаналитических и аналитических нарушений. При выявлении нарушения качества пробы проводятся ее замена и повторное исследование.

Валидацию осуществляет врач подразделения лаборатории, в котором проводилось исследование. После того как результат валидирован, бланк отчета распечатывается или в электронной форме передается в МИС, где становится доступным для врачей-клиницистов. В случае отсутствия возможности автоматической передачи в МИС врач КЛД подписывает (авторизирует) отчет и передает бланки сотрудникам, ответственным за их доставку в пункт выдачи результатов.

Форма выдачи отчета о выполненном исследовании важна для интерпретации клиницистами результата лабораторного исследования. В лаборатории должна быть установлена единая форма отчета, содержащая паспортную часть, результат исследования, единицы измерения и референсные интервалы. Форматирование бланков отчетов заслуживает особого внимания сотрудников лаборатории. Использование группировки результатов анализов по их патофизиологическому принципу и графическое представление данных относительно референсных пределов значительно упрощает трактовку результатов. Клиницист, взглянув на бланк, должен быстро получить наиболее важную информацию, не отвлекаясь на количество нулей после запятой, единицы измерения или неактуальные референсные интервалы.

Своевременное доведение лабораторной информации до сведения клиницистов — важная задача лаборатории. СОП «Порядок выдачи результатов исследований» определяет сроки выдачи результатов.

ТАТ лабораторного исследования зависит от правильной организации работы лабораторного персонала, исправности оборудования, наличия реагентов и необходимых расходных материалов. Исследования, требующие незамедлительной реакции клиницистов, сотрудники лаборатории выполняют экстренно в экспресс-режиме. Общее аналитическое время выполнения лабораторного исследования должно быть установлено для каждого анализа.

СОП «Порядок выдачи критических результатов» определяет правила выдачи лабораторных данных пациента, требующих принятия экстренных мер по стабилизации его состояния, утверждает алгоритм экстренного доведения результата до лечащего врача. Обнаружив критическую величину, врач КЛД должен немедленно сообщить об этом клиницисту. Выбор критических значений и алгоритм их сообщения разрабатывается совместно с клиницистами.

Понятие «критическое значение анализа» необходимо конкретизировать в каждой лаборатории (табл. 2.3).

**Таблица 2.3.** Критические величины лабораторных показателей

Аналит	Критическая величина
<b>Гематология</b>	
Гематокрит (HCT)	<14% или >60%
Лейкоциты (WBC)	<2,0×10 <sup>9</sup> /л у нового пациента или разница в 1,0×10 <sup>9</sup> /л по сравнению с предыдущим анализом при уровне 4,0×10 <sup>9</sup> /л.

	>50×10 <sup>9</sup> /л у нового пациента
Мазок крови	Наличие лейкоэмических клеток (програнулоцитов или бластов)
Тромбоциты (PLT)	<20×10 <sup>9</sup> /л или >1000×10 <sup>9</sup> /л
Ретикулоциты (RET)	>20%
<b>Микробиология</b>	
Культура крови	Положительная
Окраска по Граму ликвора, плевральной, синовиальной и других жидкостей	Положительная
<b>Биохимия</b>	
Билирубин	>300 мкмоль/л (новорожденные)
Тропонин Т	>0,1 нг/мл
Кальций	<1,5 ммоль/л или >3,2 ммоль/л
Глюкоза	<2,2 ммоль/л или >28 ммоль/л
Фосфаты	<0,32 ммоль/л
Калий	<2,5 ммоль/л или >6,5 ммоль/л
Натрий	<120 ммоль/л или >160 ммоль/л
D-димер	>500 мкг/мл
<b>В артериальной или капиллярной крови</b>	
Парциальное давление кислорода (pO <sub>2</sub> )	<40 мм рт.ст.
Водородный показатель (pH)	<7,2 или >7,6
Парциальное давление углекислого газа (pCO <sub>2</sub> )	<20 мм рт.ст. или >70 мм рт.ст.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

СОП «Порядок хранения отработанных образцов крови» определяет правила хранения образцов в лаборатории. Хранение образцов оптимизирует работу лаборатории, позволяет проводить дополнительные исследования без повторного взятия крови, при выявлении ошибок исправлять их и определять причину их происхождения. Хранению в течение 1 нед подлежат отработанные образцы крови для гематологических, биохимических, иммуногематологических исследований с учетом сроков сохранности аналитов для возможного повторного или дополнительного исследования. Образцы коагулологических исследований хранятся в течение 2 дней для идентификации пробы в случае возникновения спорных результатов и претензий со стороны врачей-клиницистов. СОП определяет место и условия хранения образцов. Пробирки с плотно закрытыми крышками в штативах выставляются на маркированных полках в порядке возрастания индивидуальных номеров. Этот принцип позволяет быстро найти нужный образец и при необходимости провести повторное исследование.

Составление статистических отчетов имеет очень большое значение для управления клиническими лабораторными исследованиями. На основании статистического учета затрат времени на выполнение той или иной технологической операции, нагрузки на специалистов может быть изменена расстановка кадров лаборатории, определяться потребность в автоматизации технологической операции. Не меньшее значение имеет статистический анализ данных о выполненных исследованиях, проценте выявления патологии. Анализируются результаты исследований по отделениям стационара и поликлиники (частота исследований у данного пациента, процент выявления патологических результатов и др.). Особое внимание необходимо обращать на расхождение статистических показателей в работе однотипных отделений. Совместно с лечащим врачом обсуждается необходимость использования тех или иных лабораторных тестов для оказания качественной медицинской помощи пациентам. На основании анализа и обсуждения полученных результатов вносятся изменения в его организацию. Анализируют и учитывают расход реактивов, делают выводы о правильности их расходования и определяют мероприятия для сокращения их расхода. После этого данные о расходе реактивов передают в письменном виде для списания. На основании расхода реактивов составляют заявку на их приобретение. Если расход реактивов не контролируется, это может привести к ситуации, когда тесты назначены лечащими врачами, а выполнить их нечем.

Организация постаналитической внелабораторной стадии является важной задачей, повышающей качество работы лаборатории и входящей в зону ответственности ее персонала. Внелабораторная часть постаналитического этапа — это оценка лечащим врачом клинической значимости информации о состоянии пациента, полученной в результате лабораторного исследования. Клиницист интерпретирует полученную лабораторную информацию, сопоставляет ее с данными собственного наблюдения за пациентом, результатами других видов исследований и использует все это для оказания пациенту медицинской помощи. Условие эффективного использования лабораторной информации в КЛД — обоснованная интерпретация результатов исследований.

Внелабораторная часть постаналитического этапа — это прежде всего оценка лечащим врачом клинической значимости информации о состоянии пациента, полученной в результате лабораторного исследования. Клиницист интерпретирует полученную лабораторную информацию, сопоставляет ее с данными собственного наблюдения

за пациентом, результатами других видов исследований и использует все это для оказания пациенту медицинской помощи. На этом этапе очень важен конструктивный диалог врачей КЛД с врачами-клиницистами. Они совместно должны выработать общие подходы к ряду проблем, например:

- проблеме многообразия факторов, влияющих на результаты;
- проблеме биологической вариации аналитов;
- понятию «референсный интервал» и многообразию этих интервалов (пол, возраст, беременность и пр.);
- понятию о клинически значимых отклонениях лабораторных результатов;
- понятию о диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) лабораторных тестов.

Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

2.2.6. Управление рисками в медицинской лаборатории

Обеспечение высокого уровня качества работы медицинской лаборатории предусматривает своевременный анализ существующих проблем путем введения в практику системы управления рисками (риск-менеджмента) в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189-2024; ГОСТ Р 56395-2015; ГОСТ Р ИСО 22367-2022.

Начальный этап внедрения процедуры риск-менеджмента предполагает организацию объективной оценки качества работы лаборатории, включающую проверку соответствия лабораторного процесса требованиям ГОСТ, выявление, идентификацию, установление причинно-следственной связи имеющихся рисков, налаживание систематического мониторинга выявленных проблем. Важно учитывать, что при неточности лабораторных данных риск клинических затруднений достигает 26–30%, а риск неоправданных действий врача составляет 7–12%.

Современная КДЛ оснащена высокопроизводительным, высокоточным оборудованием, качественными реагентами, калибраторами, КМ, программами ВКК и ВОК. Высокоэффективные технологии позволяют достигать соблюдения требований, сформулированных в стандартах по аналитическому качеству клинических лабораторных исследований. Основная масса погрешностей лабораторного анализа происходит на преаналитическом и постаналитическом этапах, в которых задействован внелабораторный персонал, работающий под руководством врачей и руководителей медицинских учреждений (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Доля ошибок на этапах лабораторного исследования

Этапы	Наиболее частые источники ошибок	Доля ошибок, %
Препреаналитика (внелабораторная преаналитика)	<div><input type="checkbox"/> Недостаточно пробы.</div> <div><input type="checkbox"/> Качество пробы (гемолиз, сгустки, посторонние примеси и т.д.).</div> <div><input type="checkbox"/> Взятие/сбор пробы.</div> <div><input type="checkbox"/> Транспортировка.</div> <div><input type="checkbox"/> Идентификация.</div> <div><input type="checkbox"/> Взята не та проба</div>	46–68
Преаналитика (лабораторная преаналитика)	<div><input type="checkbox"/> Сортировка и распределение проб.</div> <div><input type="checkbox"/> Деление проб (алиquotирование, пипетирование, идентификация).</div> <div><input type="checkbox"/> Центрифугирование, время и/или скорость</div>	3–5
Аналитика	<div><input type="checkbox"/> Неисправность оборудования.</div> <div><input type="checkbox"/> Перенос пробы.</div> <div><input type="checkbox"/> Влияния</div>	7–13
Постаналитика (лабораторная постаналитика)	<div><input type="checkbox"/> Подтверждение результатов.</div> <div><input type="checkbox"/> Не указано, кому адресован отчет.</div> <div><input type="checkbox"/> Превышено время анализа.</div> <div><input type="checkbox"/> Ошибки/задержка сообщения о критических результатах</div>	12–20
Постаналитика (внелабораторная постаналитика)	<div><input type="checkbox"/> Задержка/неправильная реакция на результаты.</div> <div><input type="checkbox"/> Неверная интерпретация результатов.</div> <div><input type="checkbox"/> Ошибочный план действий.</div> <div><input type="checkbox"/> Заказ ненужной консультации</div>	25–45

**ИК** лабораторного процесса — инструмент управления рисками в КДЛ. Важное условие обеспечения качества — учет всех факторов, способных оказать влияние на получение и интерпретацию результата. Для мониторинга качества лабораторного процесса разработаны индикаторы, позволяющие отслеживать и предотвращать негативные аспекты, способные исказить результаты и вызвать неправильные действия врача.

ИК — это объективные и измеряемые количественные характеристики разных элементов качества процесса, которые устанавливаются в лаборатории; это критерии, позволяющие определить факт достижения целевого уровня качества. Версия ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности» содержит пункт «ИК», согласно которому «лаборатория должна установить ИК, чтобы отслеживать и оценивать качество выполнения преаналитического, аналитического и постаналитического процессов». Рабочая группа Международной федерации

клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) сформировала модель ИК для оценки преаналитического, аналитического и постаналитического этапов лабораторного процесса.  
Принципы создания модели ИК:

- ИК используются для поддержания качества результатов анализов и обеспечения безопасности пациента (пациентоориентированность);
- ИК распространяются на все этапы лабораторного процесса;
- ИК должны соответствовать требованиям ИСО 15189.

Для установления ИК в лаборатории подсчитывается общее количество учтенных нарушений за определенный период времени и определяется их доля в общем количестве доставленных образцов. Изменение показателя в сторону увеличения свидетельствует об ухудшении качества процесса, в сторону снижения — об улучшении. ИК должны иметь название (что измеряется), цель (для чего применяются), методологию (систему учета) и форму предоставления данных.

Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

На преаналитическом этапе проводится регистрация ошибок, допущенных в оформлении направления на исследование, при идентификации пациента и образца, во время процедуры флеботомии. Учитывается доля биологической непригодности образцов (гемолиз, сгустки, липемия, иктеричность, присутствие посторонних примесей).  
На аналитическом этапе осуществляется регистрация нарушений, допущенных при проведении ВКК, расхождений с результатами экспертной оценки ВОК, отсутствия динамической прослеживаемости.  
На постаналитическом этапе регистрируются нарушения сроков выдачи результатов плановых, экстренных анализов, количество ошибочных результатов, выданных в отделение, неправильная и несвоевременная выдача критических результатов.  
**ТАТ** — показатель продуктивности и эффективности работы персонала. ТАТ — самый популярный ИК управления лабораторным исследованием, но его невозможно измерять без современной ЛИС. Обычно измеряют «лабораторный» ТАТ — время выполнения исследования от момента поступления образца в лабораторию до момента выдачи результата.  
В табл. 2.5 представлены примеры ИК, системы учета сбора данных.

Таблица 2.5. Примеры индикаторов качества и система учета сбора данных

Лабораторный этап	ИК	Система учета (ИК = нарушение/количество событий × 100%)
Преаналитический	Ошибка идентификации	Доля заявок с ошибкой идентификации к общему числу заявок
	Ошибка маркировки	Доля образцов с ошибкой маркировки к общему числу доставленных образцов
	Гемолиз	Доля образцов с гемолизом к общему числу доставленных образцов
	Сгустки	Доля образцов со сгустками к общему числу доставленных образцов
	Нарушение соотношения	Доля образцов с нарушением соотношения крови/антикоагулянт к общему числу доставленных образцов
Аналитический	Расхождения результатов по данным ВКК	Доля результатов с превышением пределов допустимых диапазонов CV%, B% к общему числу контрольных измерений (аналитическая серия, месяц, квартал, год)
	Расхождения результатов по данным ВОК	Доля расхождений с экспертной оценкой к общему числу выполненных измерений (программа, метод)
	Нарушение динамической прослеживаемости результатов	Доля нарушения динамической прослеживаемости результатов к общему числу выполненных исследований (установленный временной интервал)
Постаналитический	Тесты с превышением ТАТ	Доля результатов исследований, выданных с нарушением установленных сроков, от общего количества отчетов
	Неправильные результаты, выданные в отделение	Доля неправильных результатов, выданных в отделение/пациенту, от общего количества отчетов
	Непереданные критические результаты	Доля непереданных критических результатов к общему числу событий

ИК используются для объективного сравнения лабораторий между собой. Основная ценность ИК — создание с их помощью инструмента, позволяющего оценить эффективность рабочего процесса. Модель ИК для лабораторий разного уровня будет разной, так как зависит от уровня автоматизации лаборатории, наличия МИС и ЛИС, степени стандартизации, квалификации персонала.

Руководство и врачи каждой конкретной лаборатории должны подобрать оптимальный набор ИК, позволяющий быстро оценить наличие/отсутствие проблем. ИК не только позволяют провести первичную оценку качества и эффективности работы лаборатории, но и выявляют те области, которые требуют особого внимания.

Существует два подхода к использованию ИК.

Первый подход подразумевает привязку ИК к этапам выполнения лабораторного исследования. В эту группу входит подсчет количества ошибок на разных этапах исследования. Наиболее популярные ИК представлены в табл. 2.5.

Проблема в лабораториях — настройка ЛИС и МИС для автоматического получения количественных значений.

Второй подход подразумевает деление ИК, он имеет лучшие перспективы внедрения.

- ИК управления лабораторным процессом, количество ошибок на всех этапах исследования.
- Аналитические ИК (долгосрочный CV, B, данные сигмметрии).
- Клинические ИК [ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic), ДЧ и ДС]. Эта разновидность ИК чрезвычайно информативна, так как может использоваться для систематического отслеживания и оценки вклада лаборатории в результат лечения пациента, но на практике труднореализуема (сложности контакта лаборатории с клиницистами, малая доступность клинической информации для врачей КЛД).

**Внутренний аудит** — эффективный инструмент управления рисками в медицинской лаборатории. На основании ГОСТ Р ИСО 9000-2015, ГОСТ Р ИСО 9001-2015, ГОСТ Р ИСО 15189-2024 и ГОСТ Р ИСО 19011-2021 для повышения качества лабораторного процесса, установления рисков выдачи неправильного результата, определения недостатков на рабочих местах и получения объективной оценки рабочего процесса в лаборатории рекомендуется проведение внутреннего аудита.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Внутренний аудит — систематический, независимый и документированный процесс проверок с целью установления степени выполнения согласованных критериев. Для введения процедуры внутреннего аудита в лаборатории необходимо утвердить ответственного сотрудника, назначить и обучить членов аудиторской группы.

Для проведения внутреннего аудита необходимо подготовить стандартную диагностическую процедуру «Внутренний аудит»:

- утвердить план проведения внутреннего аудита;
- определить перечень документов внутреннего аудита и формы их ведения;
- установить порядок оценки результатов внутреннего аудита;
- разработать отчетную документацию внутреннего аудита;
- подготовить процедуру определения причин выявленных несоответствий и разработать алгоритм их устранения.

В документе «Внутренний аудит» устанавливаются члены аудиторской группы, определяются их полномочия и ответственность, оформляются правила, методы и периодичность проведения внутреннего аудита. Все элементы управления процедурой внутреннего аудита согласовываются с администрацией лаборатории. Если область проведения внутреннего аудита затрагивает процедурные кабинеты клинических отделений, то необходимо согласование с администрацией МО.

Аудиторская группа состоит из главного аудитора, членов аудиторской группы и технических экспертов (сотрудников лаборатории, деятельность которых не связана с местом проведения аудита). Заведующий проверяемой лабораторией присутствует при проведении внутреннего аудита в качестве наблюдателя. Состав аудиторской группы утверждается администрацией лаборатории. Члены аудиторской группы проходят внутреннее обучение принципам и методам проведения внутреннего аудита, знакомятся с действующими нормативными документами и ГОСТами, необходимыми для проведения инспекций.

Заведующий лабораторией должен быть проинформирован о дате проведения аудита за 3–5 рабочих дней. Нельзя препятствовать проведению внутреннего аудита и получению аудиторами достоверной информации. В случае выявления критических несоответствий оперативно предпринимаются корректирующие действия.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.3. Принципы доказательной медицины в лабораторной диагностике

#### 2.3.1. Основные понятия и термины доказательной медицины

Доказательная медицина является одним из главных принципов системы управления качеством. Это технология сбора, анализа, обобщения и интерпретации медицинской информации, позволяющая принимать научно обоснованные решения по профилактике, диагностике, лечению заболеваний и по организации здравоохранения. Концепция предусматривает точное и осмысленное использование эффективных результатов клинических исследований для выбора путей лечения конкретного пациента. Этот подход позволяет снизить возможность врачебных ошибок, облегчить процесс принятия решения для практикующих врачей, администрации лечебных учреждений и юристов, а также уменьшить расходы на здравоохранение. Концепция доказательной медицины распространяется по трем основным направлениям.

- Разработка клинических рекомендаций, описывающих действия врачей в определенной клинической ситуации. При принятии клинического решения необходимо опираться на эти рекомендации с учетом индивидуальных

особенностей больного. Разработкой рекомендаций занимаются экспертные группы, сформированные главным образом профильными медицинскими научными обществами и ассоциациями. В России именно в клинических рекомендациях обоснован перечень и порядок назначения лабораторных исследований с указанием их достоверности и клинической информативности. Клинические рекомендации каждые 2–3 года пересматриваются, в них добавляются новейшие достижения и указания в области лабораторной медицины.

- Формирование базы данных систематических обзоров рандомизированных контролируемых исследований. Данное направление развивается в рамках Кокрейновского сообщества (Cochrane Collaboration). С помощью метаанализа ученые суммируют данные, полученные в ходе различных исследований, по одной проблеме. В результате такого синтеза информации удается на основе статистических выкладок оценить степень полезности лечебных, диагностических и профилактических действий.
- Издание специализированных обучающих и справочных бумажных и электронных журналов, руководств, книг и интернет-ресурсов.

Лабораторная доказательная медицина — это применение достоверных доказательств использования лабораторных тестов для принятия решений о медицинской помощи конкретным больным. Выбор лабораторных исследований в рамках доказательной лабораторной медицины основывается на аналитических и диагностических характеристиках — ДЧ, ДС, аналитическая чувствительность, коэффициент вариации, допустимое отклонение.

**Клиническая информативность** — это способность лабораторного теста на основании информации, полученной в результате исследования, характеризовать состояние внутренней среды организма у обследуемого лица и выявлять патологические отклонения. Клиническая (диагностическая) информативность лабораторных исследований тем выше, чем ближе к истинному полученное представление о наличии патологии у пациента и характере ее течения.

Применительно к целям назначения и выполнения клинических лабораторных исследований клиническая информативность является одной из основных характеристик их качества, то есть соответствия потребностям клинической диагностики и мониторинга результатов лечения.

Информативность клинических лабораторных тестов определяется степенью уменьшения неопределенности представления о физиологическом процессе, состоянии органа или организма в целом на основе результатов данных тестов. При использовании результатов лабораторных исследований следует иметь в виду, что их значения отражают содержание искомым компонентом с некоторой степенью неопределенности, то есть с дисперсией этих значений, обусловленной рядом вариаций. Поэтому при выявлении патологических отклонений они должны быть дифференцированы от колебаний результатов, вызванных другими причинами.

При интерпретации результатов лабораторных исследований полученные значения классифицируют как положительные, то есть подтверждающие наличие патологии, и как отрицательные, то есть не подтверждающие наличие патологии. Под влиянием факторов биологической и аналитической вариации может наблюдаться взаимное перекрытие значений результатов исследований между интервалами, свойственными группам больных и здоровых людей, что приводит к классификации части полученных значений как ложноположительных или ложноотрицательных (рис. 2.5).



**Рис. 2.5.** Гипотетическое распределение результатов теста среди здоровых и больных (а — точка отсечения положительных результатов; б — отсечная точка отрицательных результатов; в — точка порогового значения)

*Истинно положительный результат* подтверждает наличие действительно имеющейся патологии.

*Истинно отрицательный результат* исключает наличие патологии в условиях действительного ее отсутствия.

*Ложноотрицательный результат* исключает наличие болезни, тогда как она в действительности присутствует.

*Ложноположительный результат* утверждает присутствие патологии, несмотря на ее отсутствие в действительности.

Соотношение этих групп полученных значений используют при количественной оценке клинической информативности лабораторных тестов. Оценка основывается на расчетах вероятности той или иной категории значений при состоянии здоровья или болезни.

**Клиническая (диагностическая) специфичность** лабораторного теста характеризуется числом лиц, правильно классифицированных по результатам исследования, как не находящихся в определенном состоянии, деленное на число всех лиц, не находящихся в данном состоянии (табл. 2.6).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

**Таблица 2.6.** Критерии оценки диагностической ценности лабораторного теста

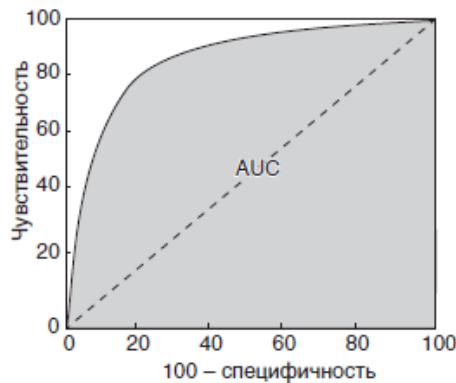
Критерии	Болезнь присутствует	Болезнь отсутствует
Результат положительный	<b>a</b> — истинно положительный	<b>b</b> — ложноположительный
Результат отрицательный	<b>c</b> — ложноотрицательный	<b>d</b> — истинно отрицательный
Клиническая чувствительность	$a/(a+c)$ = доля истинно положительных результатов в группе больных	
Клиническая специфичность	$d/(b+d)$ = доля истинно отрицательных результатов в группе здоровых	
Предсказательная ценность положительного результата	$a/(a+b)$ = доля истинно положительных результатов среди всех положительных результатов	
Предсказательная ценность отрицательного результата	$d/(c+d)$ = доля истинно отрицательных результатов среди всех отрицательных результатов	
Диагностическая эффективность теста	$(a+d)/(a+b+c+d)$ = доля истинных результатов среди всех результатов теста	

**Клиническая (диагностическая) чувствительность** лабораторного теста характеризуется числом лиц, точно классифицированных по результатам исследования как находящихся в определенном состоянии, деленное на число всех лиц в данном состоянии (см. табл. 2.6).

Оценка чувствительности и специфичности важна при выборе лабораторного теста для его применения в клинических целях. Чувствительность теста отражает вероятность его положительного результата при наличии патологии. Высокая чувствительность теста позволяет выявлять с его помощью больных в общей популяции. Специфичность теста отражает вероятность отрицательного результата при отсутствии патологии, что при высокой специфичности позволяет не включать здоровых лиц в популяцию с предполагаемой патологией.

**Диагностическая эффективность** теста определяется комбинацией клинической чувствительности и клинической специфичности теста. При интерпретации лабораторных тестов вероятность действительного наличия патологии при положительном результате или надежность исключения патологии при отрицательном результате оценивается на основе определения предсказательной ценности положительных или отрицательных результатов.

**ROC-кривая** — оперативная характеристика, используется для установления точки разделения с учетом последствий ложных решений, то есть кривая взаимной зависимости вероятностей ложноположительных и истинно положительных результатов (рис. 2.6). Она является графическим представлением полного спектра чувствительности и специфичности, поскольку на ней могут быть отображены все возможные пары «чувствительность–специфичность» для конкретного теста. Ось Y представляет собой чувствительность, или частоту истинно положительных результатов. По оси X отмечается частота ложноположительных тестов (единица минус специфичность или 100 минус специфичность). Иногда по оси X отмечают специфичность, а не единицу минус специфичность. ROC-кривая не зависит от распространенности заболевания. Для идеального теста график проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных тестов составляет 100%, или 1,0 (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных равна 0 (идеальная специфичность). Поэтому чем ближе кривая к верхнему левому углу, тем выше диагностическая эффективность (точность) теста. И наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к прямой, проходящей под углом 45°, тем меньше эффективность диагностического исследования. Точки на такой диагонали соответствуют отсутствию диагностической эффективности.



**Рис. 2.6.** ROC-кривая. Диагностическая эффективность лабораторного теста определяется тем, насколько высоко лежит ROC-кривая. Количественную интерпретацию ROC дает показатель AUC — площадь, ограниченная ROC-кривой. Чем больше AUC, тем выше диагностическая эффективность теста. AUC варьирует от 0,5 (отсутствие диагностической эффективности теста, соответствует штриховой линии) до 1,0 (максимальная эффективность теста)

**Метод оценки ROC-кривых** — оценка площади под кривыми (Area Under Curve — AUC). Данная оценка может быть получена непосредственно вычислением площади под многогранником, ограниченным справа и снизу осями координат и слева сверху — экспериментально полученными точками. Кривая, расположенная выше и левее, свидетельствует о большей диагностической эффективности лабораторного теста. Качество диагностической эффективности лабораторного теста, оцененное с помощью ROC-анализа, представлено в табл. 2.7. Идеальной модели, обладающей 100% чувствительностью и специфичностью, на практике добиться невозможно. Невозможно одновременно повысить и чувствительность, и специфичность модели. Компромисс находится с помощью порога отсечения.

**Таблица 2.7.** Диагностическое качество лабораторного исследования на основе результата ROC-анализа

Интервал AUC	Качество модели
--------------	-----------------

0,9–1,0	Отличное
0,8–0,9	Очень хорошее
0,7–0,8	Хорошее
0,6–0,7	Среднее
0,5–0,6	Неудовлетворительное

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

**Порог отсечения** на практике определяется с использованием ROC-анализа. В разных задачах присутствует своя оптимальная стратегия. Критериями выбора порога отсечения могут выступать следующие.

- Максимальная чувствительность желательна при использовании скринингового теста, максимальная специфичность — для подтверждающего теста. В результате формируется порядок из двух этапов лабораторного исследования — скрининг и подтверждение результата. Такая последовательность принята, в частности, при диагностике вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), COVID-19. При диагностике сифилиса сначала используются нетрепонемные тесты, а затем результат подтверждается с использованием трепонемных тестов.
- Требование максимальной суммарной чувствительности и специфичности модели. Эта задача возникает при подборе индексов, составленных на основе сочетания разных лабораторных или лабораторных и клинических (функциональных) тестов.
- Требование баланса между чувствительностью и специфичностью. Требование формируется для характеристики нового теста или новой группы исследуемых пациентов, чтобы оптимально разделить группы.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.3.2. Референсные величины лабораторных показателей

Оптимальное равновесие между организмом и окружающей средой называется состоянием здоровья или нормой. Однако нередко показатели у больных людей численно соответствуют тем, которые наблюдаются у здоровых, возникает «наложение» патологических результатов на «нормальные». При этом лабораторные показатели у здоровых людей подвержены отчетливым колебаниям, варьируют в определенных пределах. В связи с этим была введена концепция «референсных интервалов», полученных в результате исследований, проведенных в группах «референсных индивидов», отобранных по определенным критериям.

**Референсные индивиды** — лица, отобранные из здоровой популяции на основании критериев включения и исключения. Референсные значения, полученные в данной популяции, используют для сравнения с индивидом, страдающим специфическим заболеванием. Референсная популяция должна быть подобна по этническим, возрастным, половым признакам, насколько это возможно. Референсные пределы для беременных должны быть отнесены к различным триместрам беременности. У пациентов, постоянно принимающих препараты, регулирующие нарушенные функции, должны быть специально установленные референсные пределы содержания соответствующих аналитов с учетом присутствия постоянно принимаемых лекарственных препаратов.

**Референсный интервал** — ограниченный референсными пределами и статистически охарактеризованный диапазон значений результатов лабораторных исследований определенного аналита, полученных при обследовании референсной группы лиц. Обычно референсный интервал охватывает 95% референсных значений, полученных в референсной группе; при этом референсный интервал ограничивается двумя значениями, между которыми располагается 95% всех значений, а по 2,5% их с каждой стороны отбрасываются. Следовательно, значения референсного интервала расположены между уровнями 2,5 и 97,5% (перцентилями). Концепция референсных интервалов, несмотря на ее ограниченность, остается фундаментом лабораторной диагностики. Это породило безоговорочное доверие к ним как у клиницистов, так и у специалистов лабораторной диагностики. Однако рекомендуется обратить внимание на биологическую вариацию, которая дает возможность оценивать приемлемость популяционных референсных интервалов. Для этого следует учитывать индекс индивидуальности — отношение аналитической и биологической вариации показателя  $(S_{ан})^2 / (S_{биол})^2$ . Приемлемы для определения референсного интервала на основе статистической обработки результатов референтной группы тесты с индексом индивидуальности менее 0,4.

**Сравнение результатов** с данными предыдущих измерений (проверка дельты) полезно для лабораторных тестов с высокой индивидуальностью при мониторинге заболеваний. Этот подход будет, по-видимому, завоевывать все большую популярность в связи с введением интерактивного паспорта здоровья, в котором предполагается хранить результаты лабораторных исследований при каждом обследовании не только в стационаре, но при диспансерном наблюдении. В связи с внедрением цифровизации в лабораторную медицину появилась возможность оценивать данные лабораторных исследований, в известной мере абстрагируясь от традиционного понятия нормы, при этом значимые изменения могут быть выявлены, даже если значения параметра остаются в пределах референсных интервалов. Всего 16 из 339 показателей с установленной биологической вариацией, например водородный показатель (рН) и лактат в крови, имеют индекс индивидуальности более 1,4 (низкая индивидуальность показателя), для которых референсные интервалы можно достаточно успешно использовать в диагностике и скрининге заболеваний. По крайней мере две сотни показателей, используемых в лабораторной диагностике, имеют индекс индивидуальности менее 0,6 [включая такие популярные тесты, как гемоглобин (Hb), гематокрит (HCT), эритроциты



(red blood cells — RBC), креатинин в крови]. Концепция биологической вариации с определением динамики изменения показателя может значительно расширить возможности интерпретации результатов лабораторных исследований. При этом важно использовать технологии с минимальной аналитической вариацией в зоне принятия решения, так как высокий аналитический CV не позволит выявить значимую биологическую (патологическую) динамику. Очевидно, что два последовательных результата будут достоверно отличаться друг от друга лишь в том случае, когда разница между их численными значениями будет больше общей вариации обоих результатов. В нашей литературе эта величина часто называется критической разницей, но лучше называть ее RCV (Reference Change Value), следуя номенклатуре, принятой в международных рекомендациях. Использование RCV в ежедневной практике лаборатории возможно благодаря ЛИС, позволяющей автоматически отслеживать динамику, оценивать достоверность изменения лабораторных показателей. Информирование лечащих врачей не только о достоверных значениях лабораторного показателя (95%), но и о значимых изменениях результатов их пациентов позволит диагностировать заболевания на ранних стадиях и своевременно выявлять возможные осложнения при проведении терапии.

**Выбор референсных интервалов** лежит на специалистах КЛД. При этом подавляющая часть лабораторий не имеет возможности самостоятельно установить референсные пределы для исследуемых аналитов и обращается к сведениям, публикуемым в руководствах и справочниках. В большинстве стран основным и лучшим источником для референсных интервалов эксперты признают общепризнанные руководства по лабораторной медицине и публикации данных серьезных исследований. При использовании в исследованиях готовых наборов реагентов применяют референсные пределы, установленные производителем наборов. Рекомендуем, прежде чем ориентироваться на литературные или сообщаемые производителем набора реагентов референсные пределы, произвести сравнительную оценку характеристик правильности и воспроизводимости метода, использованного для установления референсных пределов, и метода, используемого в лаборатории. На основе такого сравнения значения референсных пределов могут быть откорректированы.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Возможны следующие способы оценки рекомендованных референсных пределов перед их использованием в лаборатории.

- Тщательный отбор и обследование небольшой референсной группы (порядка 20 человек). Если при этом не больше двух значений окажется за пределами референсного интервала, он может быть принят лабораторией.
- Если за пределами интервала окажется три и больше значений, надо подтвердить неадекватность проверяемых интервалов на выборке не менее 60 проб. Если более 5% измерений выходят за пределы проверяемых референсных интервалов, использовать их нельзя и следует приступить к определению собственного референсного интервала.
- Лучший способ разработки собственных референсных интервалов — собрать пробы у подтвержденных референсных индивидуумов; для каждой выделенной группы (возраст, пол) числом не менее 120 провести измерения, использовать для обработки непараметрические методы статистики.

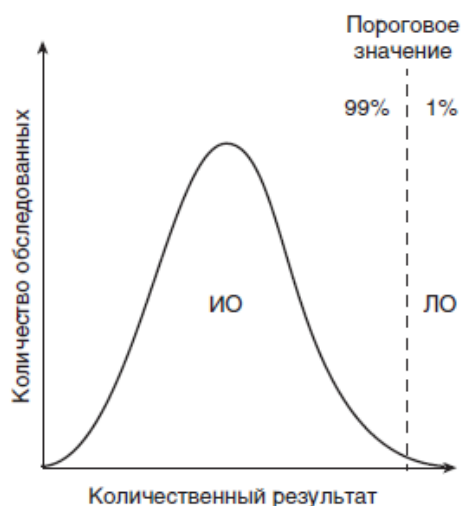
Использование референсных интервалов других лабораторий возможно при применении идентичных калибраторов. Референсные пределы, установленные в группе лиц, страдающих подтвержденным другими способами видом патологии, могут применяться для выявления соответствующей болезни.

При всей значимости крайне мало лабораторий и производителей аналитических систем проводят полноценные исследования по разработке референсных интервалов. В современной лабораторной медицине появилась обоснованная тенденция — заменять референсный интервал на уровень принятия решения, например для холестерина (ХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), неЛПВП, HbA<sub>1c</sub>, простатический специфический антиген (ПСА).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.3.3. Концепция «перцентиль» для принятия решения

Перцентиль — это значение, которое случайная величина не превышает с фиксированной вероятностью, заданной в процентах. Перцентиль — одна из числовых характеристик распределения вероятностей. Перцентиль определяется как значение  $p = j/100$  для  $j = 0, 1, 2, \dots, 99$ . Для вычисления перцентилей можно использовать таблицу Excel. Чтобы рассчитать значение 99-го перцентиля, перенесите данные своих измерений в Excel, используйте функцию «=ПЕРСЕНТИЛЬ» с аргументом k, равным 0,99 (рис. 2.7).



**Рис. 2.7.** Концепция принятия решения на уровне 99-го перцентиля. При этом подходе применяется непараметрическая статистика, а именно определение 99-го перцентиля. 99-й перцентиль — точка на ранжированном распределении значений, содержащая 99/100 всего множества значений

Как пример приведем применяемый на практике подход для определения уровня принятия решения при измерении концентрации тропонина высокочувствительным способом (hs-cTn). Появление аналитических систем для определения hs-cTn привело к тому, что его стало возможно определять у здоровой популяции. В этой связи эксперты предложили использовать 99-й перцентиль концентрации hs-cTn в крови здоровой популяции мужчин и женщин в качестве уровня принятия решения. То есть уровень принятия решения будет соответствовать значению, при котором у 1 из 100 здоровых человек такая тест-система выявит уровень кардиального тропонина (сTn) выше установленного. Тропонин — чрезвычайно чувствительный тест, при ОКС даже незначительное повышение уровней тропонинов указывает на необходимость агрессивного клинического вмешательства, так как эти, вроде бы незначительные, изменения, связаны с риском повторного ОКС, повторной госпитализации и летальности. При измерении hs-cTn с использованием тестов III поколения ( $CV < 10\%$  в нижнем пределе определения, 99-й перцентиль  $> 0,01$  мкг/л) при обследовании 3557 лиц общей популяции оказалось, что повышение  $hs-cTn \geq 0,01$  нг/л связано как с клинической вариабельностью, так и с повреждениями сердечной мышцы, обнаруживаемыми с помощью магнитно-резонансной томографии. Был сделан вывод, что «в общей популяции у лиц без сердечной недостаточности, гипертрофии левого желудочка, хронической болезни почек (ХБП) или СД даже минимально повышенный hs-cTn может говорить о субклиническом повреждении сердца и иметь важное клиническое применение». Технология использования перцентилей позволила выявить в общей популяции лиц с повышенным риском инфаркта миокарда (ИМ).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.4. Контроль качества лабораторных исследований

#### 2.4.1. Статистические характеристики, применяемые для количественных исследований

Статистические параметры для оценки качества измерения количественных аналитов, выполняемых в медицинской лаборатории, рассчитываются исходя из базы данных, полученных при регулярном исследовании КМ. Результаты анализа КМ на разных уровнях концентрации обрабатываются и оцениваются отдельно, так как установленные ПДЗ специфичны для каждого уровня и отражают стабильность работы аналитической системы в конкретном диапазоне.

**Аналитическая серия** — совокупность измерений лабораторного показателя, выполненных в одних и тех же условиях без перенастройки и калибровки аналитической системы, при которых характеристики аналитической системы остаются стабильными.

Статистическими характеристиками, используемыми для оценки качества результатов в медицинской лаборатории, являются: среднее арифметическое значение ( $\bar{X}$ ), стандартное отклонение SD (S), производный от SD коэффициент вариации CV, смещение B, общая аналитическая ошибка (TEa).

$\bar{X}$  позволяет оценить реальное содержание исследуемого аналита в КМ данного уровня. Формула для расчета  $\bar{X}$ :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

где  $\sum$  — знак суммирования,  $x_i$  — результат конкретного измерения,  $n$  — количество измерений.

**SD (S)** — статистическая характеристика, количественно определяющая разброс измеренных показателей вокруг  $\bar{X}$ . Оценка воспроизводимости, устойчивости работы аналитической системы. S рассчитывают по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}},$$

где  $\bar{X}$  — среднее арифметическое значение;  $x_i$  — результат  $i$ -го измерения из  $n$  выполненных измерений.

**CV** — параметр внутрилабораторной прецизионности, отражающий степень близости друг к другу независимых измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. CV — отношение  $S$  к  $\bar{X}$ , выраженное в процентах, определяют посредством многократного измерения КМ при ВКК с последующим вычислением по формуле:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

где  $S$  — стандартное отклонение,  $\bar{X}$  — среднее арифметическое значение.

CV на разных уровнях концентрации аналита различаются. На практике наиболее значимым является исследование КМ на уровнях концентраций, находящихся в зоне принятия клинического решения. При выборе КМ особое внимание необходимо обращать на соответствие предлагаемых концентраций аналитов диапазону принятия клинического решения. Нужно учитывать, что результаты повторного измерения одного и того же образца должны располагаться максимально близко друг к другу. Это особенно важно при мониторинге состояния пациентов при оценке эффективности терапии или течения заболевания.

**B** — определяется близостью  $\bar{X}$  серии измерений КМ к истинному значению/аттестованному (A3) измеряемой величины, может быть выражено в абсолютных или относительных величинах, рассчитывается по формуле:

$$B = \frac{\bar{X} - A3}{A3} \times 100\%$$

В полученном результате указывается знак числа (+/-).

**B** — величина относительная, зависящая от того, что принимается за истинное или опорное значение. Это может быть аттестованное значение, указанное в паспорте к КМ, может быть значение, полученное при проведении установочных серий, может быть значение экспертной оценки программ ВОК. Смещение характеризует правильность измерения аналита.

**TE<sub>a</sub>** Значение этого параметра можно рассчитать по формуле, используя данные лаборатории, полученные при ВКК:

$$TE_a = B_a + 1,96 \times CV_a$$

TE<sub>макс</sub> — максимально допустимая аналитическая ошибка, рассчитанная для каждого аналита на основе его биологической вариации. ПДЗ аналитической ошибки можно найти в литературных источниках, справочной литературе или на сайте [www.westgard.com](http://www.westgard.com). Этот параметр используется для расчета универсальной количественной характеристики аналитического качества — количества ó (методология «6 ó»).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

### 2.4.2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества

ВКК в медицинской лаборатории — это статистический процесс, используемый для наблюдения и оценки качества аналитического этапа лабораторного исследования и установления приемлемости результатов исследования проб пациентов. Процесс ВКК требует регулярного исследования КМ по всему спектру выполняемых лабораторией аналитов и своевременную проверку результатов измерения каждого аналита в каждой аналитической серии. Если тест стабилен менее 24 ч или появились факторы, способные повлиять на его стабильность, необходимо решить вопрос о более частом проведении контрольных измерений. Статистическая обработка результатов ВКК определяется величиной допустимой погрешности и зависит от количества измеренных образцов. Требования к аналитическому качеству, принятые в России, изложены в приказе МЗ РФ № 45 от 2000 г., в отраслевом стандарте 91500.13.0001-2003 (ОС 91500.13.0001, 2003) и в национальном стандарте РФ ГОСТ Р 53133.1-2008.

Основными характеристиками ВКК являются стабильность (stability), прецизионность (precision), воспроизводимость (repeatability), сходимость (reproducibility) и правильность (trueness). В качестве КМ используются образцы заводского приготовления на основе биоматериала человека или животных. Систематический ВКК позволяет сформировать базу данных, позволяющую определить приемлемость результатов пациентов путем сопоставления полученных результатов аналитов при исследовании КМ с установленными ПДЗ.

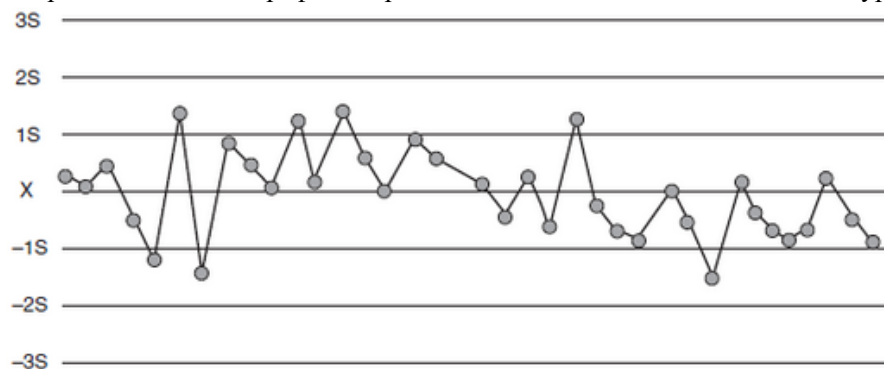
Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53133.1-2008 «Контроль качества клинических лабораторных исследований» для проведения ВКК лабораторных аналитов рекомендует использовать построение контрольных карт Шухарта или Леви–Дженингса с последующим их анализом (правила Вестгарда).

Правила имеют обозначение в виде основной цифры, отражающей число основных наблюдений и нижнего индекса статистического предела оценки результатов, выраженного через количество SD от  $X^-$ . В настоящее время эта технология принята в международном сообществе, применяется в современных анализаторах, на ее основе построен контрольный модуль в ЛИС медицинских лабораторий.

Порядок создания и оценки контрольных карт для каждой выполняемой в лаборатории количественной методики исследования состоит из нескольких последовательных стадий.

- Стадия I — оценка повторяемости результатов измерения; выполняется 10 измерений контрольного образца (по одному измерению в день) — установочная серия.
- Стадия II — оценка прецизионности и относительного B по результатам установочной серии измерений, построение контрольных карт; для каждого КМ рассчитываются значения ( $CV_{10}$ ) и ( $B_{10}$ ). Их следует сравнить с ПДЗ (ГОСТ Р 53133). Если полученные значения не превышают установленных норм, используют значения с 1S, 2S и 3S от  $X^-$  для построения контрольной карты. Если полученные значения ( $CV_{10}$  и  $B_{10}$ ) превышают допустимые, выявляют источники погрешностей и проводят работу по их устранению, затем измерения повторяют.

• Стадия III — окончательная оценка смещения и прецизионности измерений с дополнительным 10-кратным измерением КМ и определением  $B_{20}$  и  $CV_{20}$ . На основании полученных значений  $X^-$  и  $CV$  корректируют контрольную карту, которую затем используют для оценки результатов ВКК с использованием правил Вестгарда. На контрольную карту, построенную на основании установочной серии (**рис. 2.8**), ежедневно наносятся результаты измерения КМ. Такие графики строятся для каждого теста и для каждого уровня концентрации КМ.



**Рис. 2.8.** Контрольная карта Шухарта.  $X$  — среднее значение определяемого параметра;  $S$  — стандартное отклонение. Если аналитическая система работает удовлетворительно, то распределение повторных результатов исследования одного и того же КМ подчиняется законам нормального распределения с характерной Гауссовой куполообразной зависимостью. Для нормального распределения характерно, что примерно 68% результатов попадает в пределы  $1S$ , а 95,5% — в пределы  $2S$ . При удовлетворительной работе системы только 4,5% контрольных результатов выходят за пределы  $2S$ . Около 99,7% приемлемых результатов измерения КМ попадает в пределы  $3S$ .

Приемлемость результатов ВКК определяется по  $X^-$ , величинам  $B$  и  $S$  КМ. Превышение контрольных пределов является сигналом о возможном возникновении проблем при работе с конкретным аналитом. При установке критериев качества работы специалистам лаборатории необходимо учитывать также и клиническое значение каждого теста. Систематическая оценка результатов исследования КМ согласно ГОСТ Р 53133-2008 проводится с использованием правил Вестгарда.

Оценка контрольных карт проводится согласно правилам Вестгарда. Шесть основных правил Вестгарда представлены в **табл. 2.8**. Использование этих правил позволяет проверить работу аналитической системы и предупредить получение ошибочных результатов при исследовании проб пациентов.

**Таблица 2.8.** Правила Вестгарда для оценки результатов внутрилабораторного контроля качества с использованием контрольных карт Шухарта

Критерий и его описание		Тип ошибки
$1_{2S}$	Один результат в серии вышел за предел $X_{cp} \pm 2S$ . Сигнал для применения других критериев!	
$1_{3S}$	Один результат в серии вышел за предел $X_{cp} \pm 3S$	Случайная
$R_{4S}$	Два контрольных измерения в аналитической серии расположены по разные стороны от коридора $X^- \pm 2S$	Случайная
$2_{2S}$	Два последних контрольных измерения превышают предел ( $X^- + 2S$ ) или лежат ниже предела ( $X^- - 2S$ )	Систематическая
$4_{1S}$	Четыре последних контрольных измерения превышают ( $X^- + 1S$ ) или лежат ниже предела ( $X^- - 1S$ )	Систематическая
$10_X$	Десять последовательных измерений лежат по одну сторону от средней линии ( $X_{cp}$ ). Может применяться самостоятельно!	Систематическая

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Правила Вестгарда предназначены для определения типа ошибки.

**Случайная ошибка** — отклонение полученных результатов от установленного  $X^-$  или разброс измерений, проявляющийся в различии между собой результатов повторных измерений определяемого показателя в одной и той же пробе. Существуют приемлемая/ожидаемая и недопустимая случайная ошибки. Приемлемая случайная ошибка количественно определяется величиной  $SD$ . Недопустимая случайная ошибка — выход результата за ПДЗ (нарушение правила « $1_{3S}$ »).

**Систематическая ошибка** — разность между полученным средним значением в аналитической серии контрольных измерений и истинным/опорным значением. Это постоянная закономерно изменяющаяся погрешность при повторных измерениях одной и той же величины. Погрешность может проявляться постепенно (увеличение или снижение значений), что характеризует дрейф. Дрейф свидетельствует о постепенном снижении надежности работы аналитической системы. Дрейф обычно незаметен. Основные причины, вызывающие дрейф результатов измерения КМ:

- постепенный выход из строя источника света в приборе;

- постепенное загрязнение трубок;
- постепенное загрязнение поверхности электродов;
- «старение» реагентов;
- снижение качества КМ в процессе хранения;
- постепенное изменение температуры инкубации;
- неправильная настройка дозирующих устройств;
- постепенное разрушение оптических фильтров.

Погрешность может проявиться резко и неожиданно, что характеризует сдвиг и свидетельствует о нарушении в работе аналитической системы. Сдвиг может быть вызван следующими причинами:

- неожиданный выход из строя источника света;
- изменение состава реагентов;
- крупная поломка прибора;
- резкое изменение температуры инкубации (только для ферментов);
- существенное изменение температуры и влажности в рабочем помещении;
- выход из строя системы взятия образца;
- выход из строя системы дозирования реагентов.

### Основные правила Вестгарда

**Правило 1<sub>2S</sub>** — предупредительное правило, при нарушении — результат одного контрольного измерения вышел за пределы 2S. Нарушение этого правила предупреждает о возможном сбое в аналитической системе. При отсутствии аналитических ошибок у нормального гауссовского распределения около 4,5% контрольных результатов лежит в пределах между 2S и 3S. Для выяснения причин нарушения необходимо сравнить полученный результат с другими результатами в данной или предыдущих аналитических сериях. Если не выявляется никакой закономерности, считается, что нарушение правила вызвано случайной ошибкой. Результаты пациентов могут быть выданы.

**Правило 1<sub>3S</sub>** — контрольный результат вышел за пределы 3S. Это правило позволяет обнаружить недопустимую случайную ошибку или начало большой систематической ошибки (сдвиг). Результаты измерения проб пациентов выдаваться не могут.

**Правило 2<sub>2S</sub>** — указывает на систематическую ошибку. Правило нарушено, если два последовательных контрольных измерения оказываются по одну сторону от  $X^-$  за пределом 2S. Правило может применяться к результатам, полученным как в одной, так и в разных аналитических сериях. В первом случае рассматриваются результаты контрольных измерений, выполненные в одной аналитической серии. В другом случае, если результаты анализа КМ нормального и патологического уровня в данной серии лежат по одну сторону от среднего значения за пределом 2S, то, согласно правилу, аналитическая серия бракуется из-за наличия систематической ошибки.

**Правило R<sub>4S</sub>** позволяет выявить случайную ошибку и применяется в пределах одной аналитической серии. Если расстояние между результатами измерения КМ в данной аналитической серии составляет более 4S, правило считается нарушенным из-за случайной ошибки.

**Правило 4<sub>1S</sub>** считается нарушенным, если четыре последовательных результата контрольных измерений находятся по одну сторону от среднего значения за пределом 1S. Существуют два варианта применения правила: внутрисерийный вариант — для результатов измерения КМ одного уровня и межсерийный — для результатов анализа разных КМ. Нарушение первого варианта применения этого правила (один КМ) означает наличие систематической ошибки в узком интервале концентраций, а второго — в более широком диапазоне. При нарушении этого правила необязательно отменять полученные результаты и проводить повторные измерения. Обычно они выявляют небольшие систематические ошибки (смещение или дрейф), не всегда существенные для клинициста. Такие ошибки могут быть устранены при калибровке или техническом обслуживании прибора.

**Правило 10<sub>x</sub>** считается нарушенным, если 10 точек лежат по одну сторону от  $X^-$  независимо от контрольных пределов, в которых они находятся. Правило может применяться как для одного уровня КМ, так и для нескольких уровней.

Решение о приемлемости результатов измерения аналита в биологическом материале пациентов принимает сотрудник, отвечающий за качество исследований. Если результаты аналитической серии признаются неприемлемыми, делается соответствующая запись в журнале регистрации отбракованных результатов ВКК.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Порядок оценки контрольных карт может быть индивидуален для каждой конкретной лаборатории. Рациональный выбор контрольных правил является важным аспектом для экономической эффективности ВКК, так как бездумное применение всех этих правил может послужить основанием для ложных выбраковок хорошей аналитической серии. *Контроль качества полуколичественных тестов* основан на непараметрических моделях статистических методик. Оценка качественных методов может быть положительной (позитивной) или отрицательной (негативной). Для оценки качества полуколичественных тестов используются два контроля: «положительный» и «отрицательный», с указанием числовых значений. При оценке полуколичественных методов очень важно, чтобы четко была определена граница между отрицательным и положительным результатом. Качественные и полуколичественные методы часто применяются в отделениях «у постели» пациента и в поликлиниках для получения экспресс-результата. При оценке качества этих методов необходимо учитывать их аналитическую надежность и проводить корреляцию с результатами стационарной КДЛ.

Систематическое и грамотное выполнение процедур ВКК позволяет специалистам медицинской лаборатории выявить недопустимые погрешности в работе аналитической системы и провести мероприятия по их устранению.

Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

2.4.3. Показатели, характеризующие уровень аналитического качества

**Метрологическая прослеживаемость** — соответствие результата измерения величине референтного калибратора. Для диагностических реагентов установленное значение аналита в калибраторах и КМ должно соответствовать содержанию в референтном материале — национальном или международном. Значение концентрации аналита должно быть прослежено от международного (государственного) стандартного образца до рутинной процедуры в диагностической лаборатории. Если первичный калибратор или референтный метод недоступны (в том числе таковые не созданы), то технология характеризуется неполной прослеживаемостью. Такая неопределенность имеет место для многих гормонов, онкомаркеров, тестов гемостаза.

**Аналитическая чувствительность** — способность метода выявлять наименьшее различие между двумя концентрациями анализируемого компонента. Аналитическая чувствительность может быть количественно выражена наклоном точного калибровочного графика и отношением прироста значений измерения на единицу анализируемого компонента в диапазоне линейности калибровочного графика.

**Нижний предел чувствительности** метода характеризуется наименьшей концентрацией или активностью аналита в пробе, при которой исследуемая проба может быть дифференцирована с высокой степенью вероятности от холостой пробы.

**Диапазон измерения метода** — интервал аналитического метода, внутри которого тест-система обеспечивает качественный результат при определении образцов, содержащих исследуемый аналит.

**Линейность** — показатель прямой концентрации или активности аналита в пределах интервала, установленного для данного метода. Для оценки степени линейности определяют коэффициент корреляции между полученной в тесте калибровочной кривой и теоретически рассчитанными данными.

**Аналитическая специфичность** — способность метода обнаруживать только искомый компонент. Аналитическая специфичность по отношению к анализируемой величине (компоненту биоматериала) оценивается по степени влияния различных примесей или матрицы биоматериала на результат анализа. Для проверки специфичности метода используют примеси, которые могут служить источником аналитической погрешности. В области верхней и нижней калибровочных точек для исследуемого компонента проводится сравнение между должным и действительным значениями исследуемого компонента при различных концентрациях примесей. Специфичность конкретной тест-системы определяется как способность определять аналит в соответствии с заявленными производителем характеристиками чувствительности в присутствии других компонентов, которые могут ожидать в матрице нативного образца.

**Воспроизводимость** определяется как степень различия результатов измерений одного и того же образца в одной или разных аналитических сериях. По рекомендации IFCC воспроизводимость выражается в виде SD или производного от него CV. Воспроизводимость бывает внутрисерийная (сходимость) и межсерийная. Производители аналитических систем в инструкциях к реагентам и анализаторам публикуют данные внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости метода, которые могут использоваться как ориентировочные, так как рассчитаны в идеальных условиях работы аналитической системы.

**Достоверность** — близость получаемых результатов к истинному значению, оценивается по погрешности определения при сопоставлении данных тестирования с теоретически рассчитанным результатом. Для объективной оценки аналитических характеристик тест-системы для медицинских лабораторий существует международная практика проведения процедуры испытаний независимыми организациями или референсными лабораториями. Программа испытаний в России утверждается МЗ РФ. По результатам испытаний тест-систему допускают к использованию в диагностических лабораториях. Испытание каждой партии тест-систем в обязательном порядке осуществляет производитель.

**Аналитическая надежность** лабораторных методов характеризуется:

- для количественных методов:
  - точностью (правильностью и прецизионностью) измерений;
  - аналитической чувствительностью;
  - аналитической специфичностью;
- для качественных методов:
  - частотой совпадения обнаружения патологических отклонений, полученных при исследовании биоматериала, с наличием соответствующего заболевания.

Аналитическая надежность результатов лабораторных исследований позволяет достоверно разграничивать нормальные и патологические значения концентрации аналитов в составе биологического образца. Результаты анализа биоматериалов отражают содержание аналитов с некоторой степенью неопределенности, то есть с дисперсией численных значений. Поэтому аналитическая вариация должна быть дифференцирована от колебаний результатов, вызванных другими причинами (табл. 2.9).

Таблица 2.9. Вариации результатов лабораторных исследований, вызванные непатологическими факторами

Виды вариации	Причины и механизм возникновения колебаний
Аналитическая вариация	Колебания результатов измерений аналитов в биопробах, вызванные случайными и систематическими погрешностями

Биологическая внутрииндивидуальная вариация	Колебания проявлений физиологических функций вокруг гомеостатических точек у обследуемого
Биологическая межиндивидуальная (групповая) вариация	Интервалы колебаний гомеостатических точек у разных людей, составляющих популяцию
Преаналитическая вариация	Влияние условий взятия, хранения и транспортировки биопроб, взятых у пациентов
Ятрогенная вариация	Влияние диагностических и лечебных воздействий перед проведением исследования

Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Для выявления патологических отклонений все виды вариаций должны быть дифференцированы. Влияние аналитической вариации может быть сведено до допустимого уровня при выборе методов исследования компонентов с проверенной аналитической надежностью (точностью, чувствительностью, специфичностью), а также при соблюдении правил ВКК с применением установленных пределов погрешностей измерений.

*Биологическая вариация* — основной фактор неопределенности лабораторных результатов. Состав образцов биологического материала, отражающий жизнедеятельность организма, характеризуется сочетанием устойчивости в рамках постоянства внутренней среды (гомеостаза) и динамических колебаний вокруг точки гомеостаза. Внутрииндивидуальная биологическая вариация отражает колебания проявлений физиологических функций вокруг гомеостатических точек у обследуемого. Межиндивидуальная или групповая биологическая вариация, подчиняющаяся статистическим закономерностям, представляет собой интервалы колебаний гомеостатических точек групп людей, объединенных по определенному признаку (регион проживания, пол, возраст, этническая или профессиональная принадлежность).

*Преаналитическая вариация* — проявление биологической вариации, отражающее реакцию организма на условия подготовки обследуемого к лабораторному тесту, взятие образца биоматериала, а также влияния условий доставки и обработки биопроб перед исследованием.

*Ятрогенная вариация* отражает различного рода диагностические и лечебные воздействия на пациента перед проведением лабораторного теста.

Влияние преаналитических и ятрогенных факторов вариации может быть минимизировано или точно охарактеризовано с помощью стандартизованных правил ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований.

**Правильность** показывает разность между средним значением серии повторных измерений и истинным/опорным значением и выражается величиной В.

**Прецизионность** — степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. Прецизионность зависит от случайных погрешностей.

**Точность** — степень близости результата измерений к принятому установленному или опорному значению. Термин «точность», когда он относится к серии результатов измерений, включает сочетание случайных составляющих и общей В.

**Биологически обоснованные ПДЗ** погрешностей измерения аналитов были рассчитаны на основе данных о величинах коэффициентов внутри- и межиндивидуальной биологической вариации, а также характеристик точности, достигнутых большей частью КДЛ МО страны по данным системы ВОК клинических лабораторных исследований. Эти значения представлены в нормативных документах (ГОСТ Р 53133.1-2008) и могут быть использованы в качестве справочных для создания модели аналитического качества в конкретной лаборатории. В **табл. 2.10** представлены биологически обоснованные ПДЗ погрешностей для некоторых аналитов, которые могут быть использованы специалистами КДЛ для оценки качества определения лабораторных показателей.

**Таблица 2.10.** Биологически обоснованные предельные допустимые значения смещения и коэффициента общей аналитической вариации по 10 или 20 измерениям контрольных материалов

	±B <sub>10</sub> , %	CV <sub>10</sub> , %	±B <sub>20</sub> , %	CV <sub>20</sub> , %
<b>Сыворотка крови</b>				
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	±19,6	16,7	±17,4	15,3
Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	±9,1	8,2	±8	7,5
Билирубин общий	±17,9	17,6	±15,6	16,1
Глюкоза	±4,5	4,5	±3,9	4,1
Кальций	±1,4	1,3	±1,3	1,2
Белок общий	±2	1,9	±1,8	1,7
T <sub>4</sub>	±4,5	3,4	±4,1	3,1
T <sub>4</sub> свободный	±5,9	5,2	±5,3	4,8
<b>Моча</b>				
Калий	±17,3	18,6	±14,9	17,1
Креатинин	±16	16,5	±13,8	15,1



Гематологические исследования				
Hb	±2,7	1,9	±2,4	1,8
RBC	±2,7	2,2	±2,4	2

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Алгоритм действий при оценке качества результатов с использованием ПДЗ.

- Ежедневно в течение 10 дней определяют значения оцениваемого аналита в КМ и рассчитывают  $\pm B_{10}$ , %, и  $CV_{10}$ , %.
- При условии получения значений менее тех, что указаны в табл. 2.10, проводят еще 10 определений аналита и рассчитывают  $\pm B_{20}$ , %, и  $CV_{20}$ , %.
- В случаях получения результатов, значения которых ниже, чем приведенные в табл. 2.10, делается заключение, что используемый в КДЛ аналитический метод находится под контролем и удовлетворяет критериям достижения высокой точности.
- В случае получения результатов, значения которых выходят за пределы ПДЗ погрешностей, специалистам КЛД необходимо проводить мероприятия по улучшению качества (обновление аппаратуры, замену реагентов, обучение персонала).

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

2.4.4. Системы внешней оценки качества. Контроль правильности выполнения исследований ВОК, или межлабораторное сравнение (External Quality Assessment, EQA) результатов лабораторных исследований, выполняемых в КДЛ, — важнейший элемент системы обеспечения качества КЛД. Это объективная проверка результатов лаборатории, осуществляемая внешней организацией путем сравнения результатов лаборатории с интервалом результатов других лабораторий, преимущественно с целью оценки их правильности или выявления систематической погрешности. Ценность ВОК заключается в том, что каждая лаборатория имеет возможность определить свою позицию в группе сравнения и может иметь представление о состоянии дел во всех лабораториях, участвующих в данной программе. Это не только стимулирует повышение качества лабораторных исследований, но и совершенствует систему обеспечения качества в лабораторной службе.

ВОК прежде всего направлена на обеспечение правильности, сопоставимости результатов, получаемых в разных лабораториях, и служит объективным инструментом оценки соответствия лабораторных результатов установленным нормативам качества.

Согласно действующим нормативным документам (приказ МЗ РФ № 45 от 2000 г., отраслевой стандарт 91500.13.0001, 2003, РФ ГОСТ Р 53133.1-2008), правильность измерений для ВКК на стадии установочных серий оценивают с помощью аттестованного значения, которое было установлено при его аттестации и указано в паспорте к КМ. Тем не менее рекомендовано рассматривать эту величину как ориентировочную, так как условия работы КДЛ могут отличаться от условий в экспертных лабораториях. Поэтому правильность следует оценивать с использованием результатов ВОК.

ВКК и ВОК являются взаимодополняющими компонентами единой системы управления аналитическим качеством. Участие КДЛ в программах ВОК позволяет обеспечить сопоставимость результатов, полученных при анализе одной и той же пробы в разных лабораториях. Регулярно проводимая ВОК и повседневно проводимый ВКК дополняют, но не заменяют друг друга: ВОК направлена на выявление систематических ошибок лабораторных методов и обеспечение единства измерений на всей территории страны, а ВКК предназначен для поддержания стабильности лабораторной аналитической системы, выявления и устранения недопустимых случайных и систематических погрешностей.

В России программы ВОК лабораторной службы широко представлены: функционируют федеральная, региональные, коммерческие программы. У каждой из них имеются достоинства и ограничения, поэтому медицинским лабораториям для объективной оценки работы по разным направлениям рекомендуется участвовать в нескольких программах ВОК. Внешняя оценка качества на уровне системы здравоохранения России и субъектов Российской Федерации осуществляется ФСВОК.

**ФСВОК** была создана в РФ в 1994–1995 гг., является частью лабораторной службы страны, позволяющей выявлять ошибки и оказывать помощь в устранении их источников. В ФСВОК соблюдается конфиденциальность результатов оценки качества исследований конкретной лаборатории. Ответственность за использование результатов ВОК и за принятие по ним решений несет заведующий КДЛ. Участие в мероприятиях ФСВОК является обязательным для лабораторий медицинских учреждений всех форм собственности и учитывается при их аккредитации и лицензировании. Допускается и приветствуется участие лабораторий в альтернативных программах ВОК (международных, коммерческих и региональных).

В центральном офисе ФСВОК (Центр ВКК) результаты обрабатывают с использованием метода «выбраковки» и расчетом статистических параметров средних значений, SD и CV. В качестве критерия для сравнения и оценки правильности результатов используют средние величины показателей, полученных от всех лабораторий. Оценка результатов контроля качества представляется лабораториям на графиках (гистограммах) и в таблицах.

По выявленным результатам делают вывод о качестве исследований в той или иной клинической лаборатории и, соответственно, о необходимости проведения корректирующих мероприятий. Центр ВКК выполняет важную



консолидирующую функцию: проводит регулярное обсуждение результатов сличительных исследований на российских и региональных конференциях, распространяет специализированную литературу, проводит повышение квалификации специалистов в области обеспечения качества лабораторных исследований, участвует в создании законодательной базы лабораторной службы страны, работает со странами ближнего зарубежья в поддержании единого лабораторного пространства для обеспечения преемственности лабораторных услуг в этих странах.

**Региональные системы контроля качества** предусматривают регулярное проведение циклов ВОК лабораторных исследований. Территориальная система межлабораторного контроля качества позволяет оперативно оценить состояние лабораторной службы, показывает, какие исследования на территориальном уровне необходимо улучшать, на что обратить особое внимание и как реально повлиять на ситуацию в регионе.

**Коммерческие системы контроля качества** организуются фирмами-производителями реагентов и оборудования. Преимущество таких систем заключается в применении однородных групп, так как они проводятся на однотипном оборудовании или однотипных реактивах. В таких системах результаты обрабатываются достаточно быстро и эффективно, процесс гармонизации результатов лабораторных исследований осуществляется с помощью различных методологий.

## Глава 2. Управление лабораторными исследованиями

Крупная общенациональная система ВОК позволяет привлечь к ее осуществлению ведущих специалистов страны, что очень важно для достижения ее высокого научного и методического уровня. Контроль качества лабораторных исследований составляет специальную область знаний, включающую оценку методических аспектов лабораторной медицины, основы теории ошибок, метрологию и математическую статистику.

Корректная аттестация контрольных образцов, получение достоверных референтных значений, специфичных для каждого отдельного метода лабораторного анализа и отдельной серии контрольных образцов, возможны только при наличии в системе большого числа клинических лабораторий. Для получения достоверных референтных результатов необходимо минимум 30, желательно более 70 участников в метод-специфичных группах. Участие в системе ВОК большого количества лабораторий, использующих идентичные аналитические системы, позволяет получать статистически достоверные результаты по сравнительной характеристике качества разных наборов реактивов, калибраторов, измерительных устройств.

Системы ВОК с большим количеством лабораторий-участниц позволяют получать информацию, которая может быть эффективно использована на разных уровнях принятия управленческих решений. Наличие большого объема данных по используемым в лабораториях методам, наборам реагентов и средствам измерения позволяет оценивать состояние материально-технической и методической базы лабораторной службы, определять наиболее актуальные проблемы ее улучшения. Сравнение показателей качества исследований, выполняемых в группах лабораторий, использующих одни и те же методы, наборы реагентов и средства измерения, позволяет выделять аналиты, требующие целенаправленной проверки качества. Получаемые при этом данные могут быть использованы соответствующими надзорными органами.

Важным аспектом является возможность снижения себестоимости ВОК в расчете на одну участвующую лабораторию: при большом числе участников стоимость КМ существенно ниже при их изготовлении или закупке большими партиями. Это же обстоятельство определяет наличие в крупной системе возможности закупать контрольные образцы, специально приготовленные для системы «на заказ» и отвечающие целям конкретного цикла ВОК.

### Рекомендуемая литература

1. Вумек Дж., Джонс Д. Бережливое производство. Как избавиться от потерь и добиться процветания вашей компании. М.: Альпина Паблишер, 2020.
2. ГОСТ Р 56404 «Бережливое производство. Требования к системам менеджмента».
3. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности».
4. ГОСТ Р 53079-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».
5. ГОСТ Р 53133-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований».
6. ГОСТ Р ИСО 19011-2021 «Национальный стандарт РФ. Оценка соответствия. Руководящие указания по проведению аудита систем менеджмента/ISO 19011:2018 Guidelines for auditing management systems».
7. ГОСТ Р ИСО 22367-2022 «Применение менеджмента рисков в медицинских лабораториях/ISO 22367:2020».
8. ГОСТ Р ИСО 9000-2015 «Системы менеджмента качества». URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200124393>.
9. Долгов В.В., Годков М.А., Зенина Л.П. и др. Качество лабораторных исследований для эффективной диагностики. М. Гэотар-Медиа, 2023, 128 с.
10. Пинчук В. Процессный подход в сфере государственного управления // Бюджет.ру. URL: <http://bujet.ru/article/401003.php>.
11. Планирование аналитического качества количественных лабораторных исследований с использованием коммерческих контрольных материалов. Методические рекомендации / И.А. Арефьева, М.М. Федорова, А.В. Мошкин. М.–Тверь: Триада, 2013. 64 с.
12. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.07.2020 № 785н «Об утверждении Требований к организации и проведению внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности».
13. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований».
14. Смирнова О. Контуры трансформации стратегического планирования в России: от документов к стратегическому управлению // МИР (Модернизация. Инновации. Развитие). 2020. Т. 11. № 2. С. 148–161.

15. Царенко А.С., Гусельникова О.Ю. Проекты «Бережливый регион», «Бережливая поликлиника», «Бережливый город» как шаги на пути создания «Бережливого Правительства»: оценка реализации лин-инициатив в государственном секторе РФ // Государственное управление. Электронный вестник. 2019. Выпуск № 73. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/proekty-berezhlivyy-region-berezhlivaya-poliklinika-berezhlivyy-gorodkak-shagi-na-puti-k-sozdaniyu-berezhlivogo-pravitelstva-otsenka/view>.
16. Этика и «цифра»: этические проблемы цифровых технологий. М.: РАНХиГС, 2020. URL: <https://ethics.cdto.center/>.
17. Parks and Recreation Permitting Process // LEAN Six Sigma. URL: <https://texasleansixsigma.com/city-of-el-paso-parksand-recreation/>.
18. Project Lean. City of Detroit. URL: <https://detroitmi.gov/sites/detroitmi.localhost/files/2018-11/New%20Tenant%20Application%20Process.pdf>.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.1. Исследование мочи

#### 3.1.1. Правила сбора мочи для общего анализа

Для получения результатов, достоверно отражающих состояние мочевой системы, взятие проб мочи и способы их сохранения до исследования должны быть стандартизированы. Мочу следует собирать в одноразовый контейнер — универсальный нестерильный или стерильный, в зависимости от назначенного исследования. Контейнер может непосредственно доставляться в лабораторию или служить промежуточной емкостью, из которой моча переносится в транспортную пробирку. Транспортные пробирки могут содержать наполнители, стабилизирующие те или иные компоненты мочи. Универсального консерванта, обеспечивающего сохранность химических соединений, клеток и неклеточных образований мочи, не существует. В связи с этим необходимо использовать соответствующие назначению транспортные пробирки. В **табл. 3.1** приведены варианты транспортных пробирок.

Мочу у лежачих пациентов и младенцев собирают в специальные одноразовые мочеприемники. Переливать мочу в контейнер из судна, утки, горшка нельзя, так как в них могут содержаться моющие и дезинфицирующие средства. Не рекомендуется собирать мочу для планового исследования во время менструации. Если клиническая ситуация требует исследования мочи в этот период, то необходимо предварительно произвести тампонирование влагалища во избежание попадания посторонних примесей. После проведения цистоскопии анализ можно назначать не ранее чем через 5–7 сут.

Перед сбором мочи должен быть проведен гигиенический туалет наружных половых органов теплой водой без использования моющих и дезинфицирующих средств. Применяют три варианта сбора мочи: утренняя порция, случайные пробы (разовая проба мочи), за определенный промежуток времени (или суточная моча).

Первую утреннюю порцию мочи, которая в течение ночи накапливается в мочевом пузыре, предпочтительно использовать для общего анализа. Собирают в контейнер *среднюю порцию (часть) мочи*.

Случайные пробы мочи можно собирать в любое время. Их используют для общеклинического исследования мочи и пробы Нечипоренко.

**Таблица 3.1.** Варианты транспортных пробирок и их предназначение

	Химический анализ на «полосках»	Исследование осадка мочи	Биохимический анализ (белок/глюкоза)	Микробиологический анализ
«Сухая» круглодонная или коническая	+	–/+	–/+	+*
С борной кислотой/ формиатом натрия/боратом натрия	—	—	—	+
Со стабилизатором осадка (хлоргексидин/ Stabilar)	—	+	—	—

\* Время транспортировки пробы не должно превышать 2 ч с момента получения.

Суточную мочу собирают на фоне обычного питьевого режима всю полностью. Первую утреннюю мочу не берут (нулевое время), собирают в *мерный контейнер* все последующие, причем последняя берется в то же время, когда накануне был начат сбор. Большой контейнер в лабораторию не отправляют, а измеряют количество мочи, тщательно перемешивают и отливают для лабораторного исследования в одноразовый стаканчик около 50–100 мл, указав объем суточного диуреза.

При проведении пробы Зимницкого и исследовании глюкозурического профиля используется сбор мочи за определенный промежуток времени — каждая порция в отдельный контейнер. Когда для анализа требуется собрать мочу за 10–12 ч, ее собирают каждые 2–3 ч, указывая время мочеиспускания. При необходимости произвести двух- или трехстаканную пробу мочу собирают полностью всю, наполняя во время мочеиспускания последовательно два или три контейнера.

Катетер или пункция мочевого пузыря могут быть использованы только в исключительных случаях — у новорожденных, грудных детей, пациентов с заболеваниями простаты, иногда — для микробиологических исследований. Из длительно стоящего катетера мочу для общеклинического анализа и исследования по Нечипоренко брать не рекомендуется.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.1.2. Физические свойства мочи

*Количество мочи* у человека зависит от многих факторов: возраста, пола, массы тела, диеты, питьевого режима, наличия патологии почек (**табл. 3.2**).

*Цвет мочи* у взрослых и детей старшего возраста колеблется от янтарно-желтого до соломенно-желтого.

*Гиперхромия* — концентрированная и кислая моча обычно окрашена интенсивнее, выделяется в меньшем количестве и обладает высокой относительной плотностью, встречается при токсикозах, рвоте, лихорадке.

*Гипохромия* — бледноокрашенная моча имеет низкую относительную плотность, слабокислую или нейтральную реакцию, выделяется в большом количестве при СД и несахарном диабете (диабет — мочеизнурение). *Красный, бурый, красновато-желтый* цвет — гемоглобинурия или гематурия (кровотечение из почек, мочевыводящих путей). *Розово-красный* цвет — порфиринурия. *Молочно-белый* цвет — пиурия при цистите, липурия при липоидном нефрозе или хилурия при разрыве крупного лимфатического протока.

*Прозрачность мочи.* Моча в норме прозрачна. Помутнение мочи может вызываться солями, клеточными элементами, бактериями, слизью, жирами (хилурия, липурия). Причину помутнения определяют при микроскопии мочи или с помощью химического анализа.

**Таблица 3.2.** Количество мочи у взрослых и детей при патологии

Количество мочи	Патология
Полиурия — увеличение суточного количества мочи до 3 л и более	Рассасывание отеков, выпотов; прием мочегонных препаратов; снижение или отсутствие секреции антидиуретического гормона (несахарный диабет), острый канальцевый некроз; системные заболевания (миелома, амилоидоз), синдром Шегрена; осмотический диурез при СД, ХБП
Олигурия	Гидролабильность у детей, лихорадочные состояния, острая болезнь почек (ОБП), нефросклероз
Анурия	ОБП, тяжелые нефриты, закупорка мочевых путей опухолью или камнем (ретенционная анурия), отравления, перитонит
Ишурия (странгурия) — отсутствие мочи из-за невозможности опорожнить мочевой пузырь	Аденома и рак предстательной железы, обструкция нижних отделов мочевыводящих путей (уролитиаз, склероз шейки мочевого пузыря, стриктура мочеиспускательного канала, инородное тело), травмы уретры, парапроктит, острый цистит, поражение ЦНС (рефлекторный характер)
Поллакиурия — учащенное мочеиспускание	Воспаление мочевыводящих путей и мочевого пузыря, пиелонефрит (типичный симптом), мочекаменная болезнь, простатит
Анишурия — недержание мочи	Следствие органических поражений ЦНС, спинного мозга (нейрогенная дисфункция мочевого пузыря), пороков развития мочевыводящих путей, при воспалении мочевых путей, судорогах, тяжелых лихорадочных состояниях, функциональных нарушениях у детей невротического склада
Недержание мочи при императивном позыве	Острый цистит, аденома, рак простаты, опухоли шейки мочевого пузыря

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.1.3. Показатели мочи, определяемые тестовыми полосками

Анализ мочи с помощью тест-полосок является стандартным скрининговым исследованием, и, несмотря на известные ограничения, обусловленные невысокой чувствительностью и специфичностью части тестовых зон, получением только качественных и полуколичественных значений, лаборатории во всем мире уже на протяжении нескольких десятилетий используют именно данную технологию. Альтернативы данной технологии пока нет, так как она реализует основное требование для очень часто назначаемого скринингового исследования — получение результатов по 10–12 параметрам химического состава мочи в течение 60 с. Для стандартизации считывания результатов используются отражательные фотометры, которые экспортируют данные непосредственно в ЛИС и МИС.

Алгоритм, при котором дальнейшее микроскопическое исследование мочи проводится, только когда получен хотя бы один положительный результат из шести основных (лейкоциты, эритроциты, нитриты, белок, билирубин, уробилин), не является оптимальным, в особенности при исследовании мочи в педиатрической практике и у пациентов с подозрением на патологию мочевой системы, так как данные «сухой химии» не позволяют оценить наличие таких специфических элементов осадка мочи, как цилиндры, эпителиальные клетки и выявить микроэритроцит- и микролейкоцитурию.

**Относительная плотность (удельный вес)** мочи в норме определяется в основном количеством экскретируемых электролитов и мочевины; повышается, если экскретируется глюкоза, белок или экзогенные вещества, например контрастные вещества.

В присутствии катионов комплексообразователя высвобождает протоны, которые меняют цвет индикатора — бромтимолового синего. Возможно занижение и завышение истинных значений, так как реакционная зона малочувствительна к неионизированным молекулам.

Относительная плотность отдельной разовой порции мочи не может быть использована как диагностический критерий патологии почек. Данные теста нужны для интерпретации результатов микроскопического исследования мочи — сохранности и морфологических особенностей клеток. Для оценки концентрационной способности почек необходимо

относительную плотность мочи измерять в течение 10–12 ч (проба Зимницкого), используя точные методы измерения — урометр или рефрактометр.

Относительная плотность мочи взрослого человека в течение суток может колебаться от 1,003 до 1,040 г/мл. Высокая относительная плотность мочи наблюдается при дегидратации, адреналовой недостаточности, наличии обширных отеков, при асците. После стандартной водной нагрузки плотность мочи у здоровых людей достигает значения 1,003 г/мл, что говорит о сохранной способности почек к разведению.

*Паренхиматозные заболевания почек* (хронический гломерулонефрит, пиелонефрит, нефросклероз) сопровождаются снижением способности почек к разведению и концентрации мочи. Относительная плотность 1,023 г/мл рассматривается как минимальная верхняя граница, меньший уровень говорит о снижении концентрационной способности почек. Чем ближе относительная плотность мочи к 1,010 г/мл, тем нарушение более значительное. Относительная плотность мочи в течение суток в диапазоне 1,007–1,015 г/мл расценивается как *гипостенурия* — стойкое нарушение функции почек.

В терминальной стадии заболевания почки полностью утрачивают способность концентрировать мочу, формируется *изостенурия*: выделяемая в течение суток моча характеризуется практически одинаковыми цифрами относительной плотности.

При *СД* на фоне массивной глюкозурии относительная плотность мочи увеличивается до 1,040–1,050 г/мл.

Развивающаяся диабетическая нефропатия при нарушении обратной реабсорбции воды в канальцах сопровождается полиурией, выделяется моча плотностью 1,001–1,004 г/мл.

Подобные гипоизостенурические состояния с постоянной относительной плотностью мочи в пределах 1,005–1,008 г/мл характерны для *ХБП и тубулоинтерстициальных нефропатий*.

**pH (реакция) мочи.** Почки участвуют в поддержании кислотно-основного состояния путем реабсорбции иона бикарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) и выведения  $\text{H}^+$  с мочой. Реабсорбция  $\text{HCO}_3^-$  происходит главным образом в проксимальном отделе нефрона. В просвете канальца акцепторами  $\text{H}^+$  являются аммиак и фосфаты. В организме примерно  $\text{H}^+$  в количестве 1 ммоль/кг в день образуется в виде нелетучих кислот, таких как  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4$ . pH мочи здорового взрослого человека и ребенка старшего возраста колеблется в пределах 5,5–7,0 (чаще 6,0–6,5), а при патологии — в пределах 5,0–9,0.

На диагностической полоске охватывается диапазон pH от 5,0 до 9,0. При использовании этого метода значительные отклонения от истинного значения pH наблюдаются при значениях менее 5,5 и более 7,5.

*Ацидурия* — состояние, при котором pH мочи постоянно составляет 4,6–5,0 единиц. При преобладании в рационе мясной пищи возникает *алиментарная ацидурия*. Резко кислая моча образуется при всех состояниях, приводящих к метаболическому или дыхательному ацидозу, так как почки корректируют или компенсируют сдвиги кислотно-основного состояния (мочекислый диатез, подагра, лейкозы, цитостатическая и лучевая терапия). Сочетание ацидоза и кетонурии встречается при голодании и дефиците углеводов в пище. Сочетание ацидурии, кетонурии и глюкозурии свидетельствует о диабетическом кетоацидозе. Гиперурикемический синдром (включая подагру), сопровождающийся ацидурией, может привести к кристаллизации в канальцах почек мочевой кислоты с последующим образованием конкрементов в мочевыводящих путях (лоханках и мочевом пузыре) и в канальцах, что может привести к анурии. Резко кислая реакция мочи характерна для туберкулеза почек, ОБП и ХБП.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Алкалурия* — состояние, при котором pH мочи постоянно выше 7,0. Алиментарная алкалурия наблюдается при молочно-овощной диете или введении щелочных растворов. На фоне инфекции мочевыводящих путей и при выраженной бактериальной контаминации пробы *in vitro* pH достигает 8,5–10,0 единиц. Указывать на инфекцию мочевых путей будут другие параметры «сухой химии»: положительная реакция на нитриты, лейкоцитарные эстеразы, иногда — положительная реакция на белок, наличие в осадке мочи лейкоцитов и бактерий.

Как дыхательный, так и метаболический ацидоз в первое время приводит к алкалурии, но постепенно при истощении запасов калия или развитии гиперальдостеронизма моча становится кислой.

Интерпретация результатов pH мочи приобретает клиническое значение только в том случае, если можно провести корреляцию с другой информацией, полученной при обследовании пациента.

**Белок мочи.** В результате фильтрации плазмы крови через гломерулярный фильтр в первичную мочу попадают низкомолекулярные белки, тогда как альбумин практически не фильтруется, а глобулины полностью остаются в системе циркуляции. Прошедшие через гломерулярный фильтр низкомолекулярные белки подвергаются почти полной реабсорбции в извитом проксимальном отделе канальцев. Суммарное количество белков, которые фильтруются и секретируются эпителием канальцев (макроглобулин Тамма–Хорсфалла), в норме не превышает 100–150 мг/сут. В тест-полосках определение белка в моче основано на принципе ошибки индикатора: присутствие белка вызывает изменение pH, пропорциональное концентрации белка, в результате меняется цвет тест-зоны. Индикатор бромфеноловый синий избирательно чувствителен к альбумину (предел обнаружения ~0,25 г/л). Метод нечувствителен к канальцевым белкам и легким цепям иммуноглобулинов (Ig), не может использоваться для динамического наблюдения за уровнем протеинурии у больных. Для определения степени протеинурии и точного измерения концентрации белка в моче необходимо использовать методы турбидиметрии и фотометрии.

### **Клинико-диагностическое значение**

*Транзиторные протеинурии* развиваются на фоне лихорадочных состояний и интоксикации любого генеза, в результате приема ряда лекарственных препаратов, при гемодинамических нарушениях, избыточных физических нагрузках, перегревании и переохлаждении, дегидратации, стрессовых состояниях. Уровень белка в моче может быть достаточно высоким, достигая 3–5 г/л. При транзиторной протеинурии в осадке мочи редко отмечается увеличенное

количество лейкоцитов, эритроцитов, цилиндров, клеток переходного и почечного эпителия, а сама протеинурия купируется при устранении причины, ее вызвавшей.

*Преренальная протеинурия* связана с низкомолекулярными белками, которые синтезируются опухолевыми клетками или появляются при распаде тканей.

Парапротеины обычно структурно однородны (белок Бенс-Джонса), молекула состоит из тяжелых или легких цепей одного типа. Их появление в моче характерно для множественной миеломы (ММ), плазмобластного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), болезни тяжелых цепей, лимфомы с парапротеинемией. Для подтверждения диагноза эти специфические белки в моче определяют иммунохимическим методом или иммуноэлектрофорезом.

Преренальная протеинурия наблюдается при внутрисосудистом гемолизе за счет фильтрации свободного Нв плазмы; при миодистрофиях, краш-синдроме, электротравме — за счет фильтрации миоглобина (МГ).

*Клубочковая (гломерулярная) протеинурия* характерна для всех заболеваний почек с поражением коркового вещества: острый и хронический гломерулонефрит, диабетическая нефропатия, нефропатия беременных, нефрозы, опухоль почки, поражение почек при гипертонической болезни, подагра. Протеинурия в этих случаях связана с нарушением селективности в почечных клубочках.

*Селективная гломерулярная протеинурия* развивается при нарушении фильтрации вследствие изменения поверхностного заряда сиалогликопротеинов на гломерулярной мембране. Типичным примером такого эффекта является гликирование альбумина (фруктозамин) и поверхностных белков гломерулярного фильтра при СД. В результате на ранних стадиях диабетической нефропатии развивается микроальбуминурия, а затем, по мере прогрессирования заболевания, — протеинурия. При селективной гломерулярной протеинурии гломерулярный фильтр не пропускает высокомолекулярные глобулины. Это характерно для компенсированной стадии хронического гломерулонефрита.

*Микроальбуминурия* развивается на ранних стадиях диабетической нефропатии. При СД происходит гликирование как плазменных белков, включая альбумин (фруктозамин), так и поверхностных белков гломерулярного фильтра.

В результате теряется электростатическое отталкивание альбумина, он, как «шар в лузу», проходит через фильтр в клубочках почек. Альбумин, попавший в первичную мочу, практически не реабсорбируется в проксимальном отделе канальцев, так как не может войти внутрь микроворсинок канальца — развивается селективная микроальбуминурия. Маркерными белками селективной протеинурии являются в моче альбумин и трансферрин. Прогрессирование диабетической нефропатии будет сопровождаться формированием уже неселективной протеинурии.

В норме экскреция альбумина с мочой не достигает 20 мкг/мин. Микроальбуминурия определяется как постоянная экскреция альбумина с мочой от 20 до 200 мкг/мл, что соответствует экскреции от 30 до 300 мг/сут или содержанию альбумина от 20 до 200 мг/л в утренней моче (**табл. 3.3**).

**Таблица 3.3.** Классификация альбуминурии

Уровень альбуминурии	Экскреция альбумина с мочой		Концентрация альбумина в моче
	в утренней порции	за сутки	
Нормоальбуминурия	<20 мкг/мин	<30 мг	<20 мг/л
Микроальбуминурия	20–200 мкг/мин	30–300 мг	20–200 мг/л
Макроальбуминурия	>200 мкг/мин	>300 мг	>200 мг/л

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Неселективная (низкоселективная) гломерулярная протеинурия* возникает, если почечный фильтр разрушен и пропускает плазменные белки разной молекулярной массы более 100 кДа (IgA, IgG). Эта форма протеинурии характерна для нефротического синдрома.

*Тубулярная протеинурия* проявляется нарушением реабсорбции белков в проксимальном отделе нефрона или усиленной продукцией белка Тамма–Хорсфалла клетками почечного эпителия дистального отдела нефрона. Характерным является выведение с мочой белков низкомолекулярной массы (менее 40 кДа), таких как  $\alpha$ -2-микроглобулин, ретинолсвязывающий белок или лизоцим и уропротеин Тамма–Хорсфалла. Эта форма протеинурии встречается при тубулярной нефропатии, развивающейся при отравлениях солями тяжелых металлов (ртуть, свинец, кадмий), токсическими веществами (этиленгликоль, четыреххлористый углерод), нефротоксичными препаратами (аминогликозиды, фенацитин<sup>69</sup>). Тубулярная протеинурия развивается при тяжелой системной гипоксии, вследствие острого тубулярного некроза, как осложнение трансплантации почек, при интерстициальном нефрите, тяжелых ожогах, синдроме Фанкони, врожденном почечном ацидозе, врожденном дефекте почечных канальцев.

*Смешанная (гломерулярно-тубулярная) протеинурия* является признаком нескольких типов почечной недостаточности: нарушения фильтрации в клубочках и нарушения реабсорбции в канальцах. Это, как правило, манифестная стадия всех нефропатий, при которой в моче могут быть обнаружены практически все белки плазмы крови (низкоселективная протеинурия). За сутки с мочой может теряться до 1 г белка.

*Постренальная протеинурия* сопровождается кровотечениями из мочевыводящих путей, инфекции мочевыводящих путей, полипоз и рак мочевого пузыря. Часто при постренальной протеинурии моча бывает мутной из-за примеси лейкоцитов и большого количества слизи.

*Глюкоза* фильтруется в клубочках почек, затем практически полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. Величина канальцевой реабсорбции относительно постоянна, но с возрастом отмечается тенденция к ее снижению. Если содержание глюкозы в крови и, соответственно, количество фильтрующейся в клубочках превышает количество, которое может быть реабсорбировано в канальцах, глюкоза появляется в моче. При превышении в крови уровня 8–9 ммоль/л глюкоза выделяется с мочой — *почечный порог*.

Метод, реализуемый в диагностической зоне тест-полосок, — глюкозооксидазный. Тест обладает достаточно высокой чувствительностью: от 0,5 до 20 г/л, но, как и другие тестовые зоны, дает полуколичественный результат. Если требуется более точное количественное определение глюкозы в моче, необходимо использовать ферментативные биохимические методы, например гексокиназный. Ложноотрицательные и ложноположительные результаты возможны в присутствии в пробе мочи сильных восстановителей и окислителей.

Определение глюкозы в моче следует выполнить не позднее 2–3 ч после получения. Для исследования степени суточной глюкозурии в контейнер для сбора суточной мочи необходимо добавить в качестве стабилизатора 0,5 г азида натрия.

*Почечные глюкозурии* развиваются вследствие нарушения реабсорбции глюкозы почечным эпителием в проксимальном отделе нефрона. Почечная глюкозурия, в отличие от диабетической, возникает при нормогликемии, нормальном значении  $HbA_{1c}$  в крови. Вторичные ренальные глюкозурии развиваются при органическом поражении почек и снижении реабсорбционной функции (хронический гломерулонефрит, липоидный нефроз, токсические поражения почечной ткани). Вследствие поражения клеток почечного эпителия или их полной или частичной десквамации нарушается реабсорбция глюкозы в канальцах. В крови этих больных содержание глюкозы остается в пределах нормы, а в моче появляется глюкоза. Снижение почечной функции на 30% нормального значения может привести к развитию симптоматической глюкозурии.

*Глюкозурия при беременности* связана со снижением почечного порога, что происходит, как правило, после 3 мес беременности. Экскреция глюкозы с мочой максимальна в последнем триместре. Каждый случай глюкозурии у беременных следует тщательно анализировать, так как беременность может быть провоцирующим фактором для развития СД.

**Кетоны мочи** определяются тест-полосками по реакции нитропруссид с ацетоацетатом и ацетоном. С мочой выделяются три наиболее диагностически важных кетонных тела: ацетоуксусная кислота (ацетоацетат),  $\alpha$ -гидрооксимасляная кислота ( $\alpha$ -гидроксибутират) и ацетон. У здоровых людей кетоны активно потребляются как энергетические субстраты сердцем, ЦНС и другими органами. При незначительном кетозе основным компонентом кетонов является ацетоуксусная кислота. Так как ацетон в значительном количестве выводится из организма дыхательной системой, его уровень среди трех компонентов кетонов в моче является наименьшим. Кетоны выделяются с мочой примерно в следующем соотношении:  $\alpha$ -оксимасляная кислота — 60–70%, ацетоуксусная кислота — 27–36%, ацетон — 3–4%.

*Транзиторная кетонурия* возникает в результате диеты с преобладанием богатой кетогенными веществами продуктов, на фоне голодания, профузных поносов и рвоты.

*Вторичная кетонурия* возникает при многих заболеваниях, является непостоянным признаком и не имеет диагностического значения.

*Кетоацидоз при СД* позволяет диагностировать метаболическую декомпенсацию у больных СД. Кома и прекоматозные состояния почти всегда сопровождаются кетозом и кетонурией. При этом гиперосмолярная кома является исключением, она не сопровождается образованием кетонов. Кетоацидотическая кома — наиболее серьезное осложнение диабета. Больной СД в течение суток может выделить с мочой от 10 до 50 г кетонов. Комбинация кетонурии с глюкозурией служит доказательством СД; отсутствие глюкозурии при кетонурии позволяет с уверенностью исключить такой диагноз. Кетонурия у больного СД 1-го типа должна быть ликвидирована быстро, в течение 1–2 сут.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Кетоацидоз алкогольный.* При запое и отказе от пищи в течение 2–3 сут возможно развитие состояния с дефицитом инсулина и стимуляцией липолиза, что приводит к увеличению синтеза кетонных тел. При алкогольном кетоацидозе кетонные тела в моче обнаруживаются в 90% случаев.

*Кетонурия при панкреатите.* При остром панкреатите в сыворотке крови накапливается липаза, которая приводит к мобилизации жирных кислот из жировой ткани. В результате увеличивается кетогенез в печени и возникают кетонемия и кетонурия.

**Билирубин мочи.** Реакционная зона тест-полоски содержит соли диазония, которые вступают в реакцию азосочетания с билирубином в кислой среде, в результате появляется окраска тестовой зоны, интенсивность которой зависит от концентрации билирубина. Нижний предел чувствительности составляет 20 мкмоль/л. Результат теста носит качественный характер.

Билирубин в моче здорового человека присутствует в ничтожных количествах и подавляющим большинством лабораторных методов не обнаруживается.

При патологии элиминация прямого билирубина с мочой значительно варьирует в зависимости от характера заболевания.

*Обтурационная желтуха* обусловлена вне- или внутрипеченочной обструкцией желчных путей, что сопровождается частичным или полным прекращением оттока желчи. Желчные пигменты поступают в кровь, уровень конъюгированного билирубина в плазме крови нарастает, а затем превышает почечный порог, развивается билирубинурия. Билирубинурия при обтурационных желтухах — явление постоянное. Снижение содержания билирубина в моче или его полное исчезновение указывает на частичное или полное восстановление проходимости желчных путей.

*Паренхиматозная желтуха* сопровождается повышением в крови уровня конъюгированного и неконъюгированного билирубина. Первопричиной этого состояния может быть нарушение клиренса неконъюгированного билирубина из крови, нарушение выделения конъюгированного билирубина из печеночных клеток в желчные капилляры и последующее проникновение конъюгированного билирубина из печеночных капилляров, переполненных желчью,

в кровеносные капилляры. Гепатоцеллюлярная желтуха характерна для острого вирусного гепатита в токсической фазе и других инфекционных заболеваний. Повышенная концентрация конъюгированного билирубина в сыворотке крови больных инфекционным гепатитом сопровождается увеличенной экскрецией билирубина с мочой. При этой патологии интенсивность билирубинурии усиливается параллельно с тяжестью заболевания, достигая максимальных значений в разгар болезни. В начале заболевания билирубин в моче практически не обнаруживается, а его высокая концентрация (моча цвета «темного пива») на фоне выраженной желтухи и бесцветных каловых масс служит признаком разгара заболевания (внутрипеченочного застоя желчи).

*Гемолитическая желтуха* характеризуется чрезмерным образованием неконъюгированного билирубина. В моче же реакция на билирубин отрицательная, так как связанный с альбумином билирубин не проходит через неповрежденный почечный фильтр. Непрямой (неконъюгированный) билирубин может попасть в мочу только при нарушении проницаемости гломерулярного фильтра. С диагностической точки зрения билирубинурию можно расценивать следующим образом.

- Положительная реакция на билирубин в моче свидетельствует об увеличении конъюгированного билирубина в плазме крови и превышении почечного порога билирубина, что характерно для нарушения поступления желчи в двенадцатиперстную кишку (вне- или внутрипеченочная желтуха). Почечный порог билирубина составляет 30–34 мкмоль/л.
- Одновременное повышение уровня билирубина и уробилиногена в моче считается признаком паренхиматозной желтухи на 7–12-е сутки заболевания.

*Уробилиноген* в диагностической зоне тест-полоски определяется в результате реакции i-уробилиногена и стеркобилиногена с солью диазония в кислой среде с образованием комплекса красного цвета. Количество уробилиногенов, образующихся в организме, пропорционально концентрации билирубина, экскретируемого печенью вместе с желчью в кишечник. Уробилиногеновые тела являются нормальными продуктами катаболизма, которые в физиологических условиях постоянно экскретируются с калом и в небольших количествах с мочой. Нижний предел чувствительности составляет 17 мкмоль/л, что соответствует минимальной нормальной физиологической концентрации уробилиногена в моче (17–34 мкмоль/л).

*Гемолитические анемии* сопровождаются выделением с мочой главным образом стеркобилиногена.

*Паренхиматозные гепатиты*, первичные и метастатические опухоли печени проявляются экскрецией с мочой главным образом i-уробилиногена.

У детей на фоне продолжительных запоров и усиления гнилостных процессов (гнилостный колит) повышение концентрации уробилиногенов в моче связано с усиленной реабсорбцией стеркобилиногена в толстой кишке. Уробилиноген (стеркобилиноген) не определяется в моче новорожденного, находящегося на грудном вскармливании, так как в кишечнике не происходит восстановления билирубина в стеркобилиноген из-за отсутствия кишечной флоры. Это можно считать нормой примерно до 3-месячного возраста новорожденных. Отсутствие уробилиногена в моче наблюдается у взрослых при тяжелом дисбактериозе, который часто развивается в результате длительной и массивной терапии антибиотиками и цитостатическими препаратами: происходит угнетение и элиминация нормальной бактериальной флоры кишечника, как следствие, нарушается метаболизм билирубина желчи и не происходит образование стеркобилиногена.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Кровь (RBC, Hb) в моче.** Работа диагностической зоны основана на псевдопероксидазной активности гемового фрагмента Hb, который катализирует реакцию пероксидации хромогена с образованием окрашенного продукта. Присутствие Hb приводит к образованию однородного диффузного окрашивания; отдельные зеленые пятна — признак присутствия целостных эритроцитов в реакционной зоне. Hb в моче может быть результатом выраженной эритроцитурии (гематурии), присутствием в моче свободного Hb из лизированных эритроцитов, что часто происходит *in vitro* в резко кислой моче с низкой относительной плотностью, а также в присутствии свободного Hb и дериватов Hb при внутрисосудистом гемолизе.

Нижний предел чувствительности диагностической зоны соответствует 5–10 эритроцитам в 1 мкл нецентрифугированной мочи.

В моче здоровых людей эритроциты присутствуют в крайне малом количестве. При применении камеры Горяева при исследовании осадка мочи обнаруживают максимум 1 эритроцит в 1 мкл нецентрифугированной мочи. Это норма для детей и взрослых.

Чувствительность диагностической зоны не позволяет обнаруживать как физиологическое количество эритроцитов (1 эритроцит в 1 мкл), так и микроэритроцитурцию, когда в моче содержится до 10 эритроцитов в 1 мкл.

*Микрогематурия* — цвет мочи неизменен, эритроциты обнаруживаются только при микроскопии осадка мочи ориентировочным методом (1–2 эритроцита в поле зрения). При исследовании мочи камерными методами обнаруживают до 5000–10 000 эритроцитов в 1 мл мочи.

*Макрогематурия* проявляется изменением цвета мочи, который в зависимости от количества эритроцитов может быть сероватым, розовым, красным, бурым (цвет «мясных помоев»). Цвет мочи меняется, когда в 1 л мочи содержится более 1 мл крови (более 10 000 эритроцитов в 1 мкл мочи).

*Гематурии* делятся на почечные и внепочечные. Почечные гематурии, в свою очередь, разделяют на функциональные и органические.

*Функциональные ренальные гематурии* в раннем детском возрасте встречаются из-за увеличенной проницаемости почечного фильтра. Почки грудного ребенка реагируют на малейшее раздражение: удар, неосторожную пальпацию поясничной или брюшной области. У взрослых микрогематурия возникает при переохлаждении и перегревании.

Микрогематурия отмечается после тяжелой физической нагрузки и при длительных пеших переходах (маршевая гематурия) и сочетается с альбинурией.

*Органические гематурии* наблюдаются при поражении почечной паренхимы, нарушении гемодинамики в сосудах почек: острый и хронический гломерулонефрит, нефрозы, ОБП, коллагенозы, инфаркт почки, туберкулез и опухоль почки, сепсис, тяжелые вирусные и бактериальные инфекции, нефротоксический эффект лекарственных препаратов, пиелонефриты. *Застойная гематурия* развивается при заболеваниях сердца, инфаркте, обусловлена циркуляторными нарушениями, приводящими ко вторичной патологии почек.

*Пострентальные гематурии* возникают при воспалении и механическом повреждении эпителиальной стенки мочевыводящих путей, при доброкачественных (полипоз) и злокачественных новообразованиях мочевого пузыря, сопровождаются лейкоцитурией и бактериурией.

*Камни в почках и мочевом пузыре*, по разным оценкам, обнаруживаются у 1–3% взрослого населения. При длительно протекающей мочекаменной болезни гематурия наблюдается примерно у 20% больных и часто сочетается с лейкоцитурией как признаком присоединившейся инфекции. Микрогематурия или макрогематурия на фоне сильных болей в области поясницы является характерным признаком мочекаменной болезни.

*Гемоглобинурии* возникают в результате внутрисосудистого гемолиза и гемоглобинемии, когда концентрация свободного Hb в плазме крови превышает 60 мкмоль/л (10 г/л) и исчерпывается гаптоглобинсвязывающая способность плазмы крови.

*Первичными гемоглобинуриями* являются холодовая, маршевая или спортивная, при ПНГ.

*Вторичные гемоглобинурии* развиваются при переливании несовместимой крови, отравлении сульфаниламидами, анилиновыми красками, грибами, хлороформом, стрихнином, при инфекционных заболеваниях (сепсисе, тифе, скарлатине, малярии), при гемолитических анемиях.

В связи с многообразием клинических ситуаций и недостаточной чувствительностью реакционной зоны на кровь для диагностики микрогематурии ограничиваться только химической реакцией на кровь нельзя.

**Лейкоциты в моче** определяются тест-полоской по реакции индоксила, высвобождаемого из нейтрофилов и макрофагов, с солью диазония с образованием цветного комплекса. Реакция высокоспецифична для лейкоцитарных эстераз нейтрофилов и позволяет выявлять воспалительный компонент даже при разрушении лейкоцитов в результате длительного хранения мочи, в резко щелочной, с низкой относительной плотностью моче. Существенным ограничением является невозможность обнаруживать в моче лимфоциты, так как они не содержат эстераз. Лейкоциты присутствуют в моче здорового человека в крайне малом количестве. При ориентировочном микроскопическом исследовании осадка мочи их количество не превышает 0–3 в поле зрения. Камерный метод Нечипоренко определяет верхнюю границу нормы как 2000 в 1 мл мочи.

Нижний предел чувствительности диагностической зоны соответствует 20–25 лейкоцитам в 1 мкл мочи, что превышает верхнюю границу количества лейкоцитов в моче здорового человека (до 2 лейкоцитов в 1 мкл) в 10 раз. Лейкоцитурия и пиурия — важнейшие признаки воспаления почек и мочевыводящих путей.

*Лейкоцитурия* — моча прозрачная, а повышенное количество лейкоцитов обнаруживается по слабоположительной реакции на лейкоцитарные эстеразы; если она отрицательная — по увеличению количества лейкоцитов при микроскопии осадка мочи. Лейкоцитурия у женщин наблюдается значительно чаще, чем у мужчин. Это связано с частой контаминацией лейкоцитами из влагалищных выделений при нарушении сбора пробы и большей распространенностью инфекций мочевыводящих путей у женщин.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Пиурия* — моча мутная, бело-зеленоватых оттенков, реакция на лейкоциты резко положительная, при микроскопии лейкоциты густо покрывают все поля зрения, подсчитать их невозможно. Особенно велико значение пиурии в раннем детском возрасте, когда часто встречаются первичные бактериальные пиурии (цистопиелиты). У детей 70–80% пиурий возникают в первые 2 года жизни, бо́льшая часть относится к первым 3 мес жизни ребенка.

Восходящие инфекции мочевыводящей системы, особенно у грудных детей, могут протекать без лейкоцитурии. Недостаточно однократного исследования мочи, чтобы исключить воспаление у маленьких детей. Иногда в раннем детстве пиурии протекают даже без температуры, поэтому исследовать мочу необходимо у каждого больного ребенка. Диагностировать скрытую лейкоцитурцию помогает подсчет лейкоцитов в камере (метод Нечипоренко).

**Нитриты в моче (бактериурия)** на тестовых полосках определяются реактивом Грисса, который в присутствии нитритов принимает розовую окраску. Восстанавливать нитраты мочи до нитритов благодаря активности нитратредуктазы может большинство грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*), вызывающих инфекцию мочевых путей. Бактериальное поражение такими видами, как *Pseudomonas*, *Staphylococcus albus*, *Enterococcus*, *M. tuberculosis*, не обладающими данной способностью, выявить с помощью данного теста невозможно. У детей грудного возраста моча не содержит нитриты, поэтому применять для диагностики бактериурии тест-полоску нельзя.

На интенсивность реакции влияет концентрация нитратов в моче, в связи с чем пациент перед исследованием должен употреблять в пищу достаточное количество овощей и фруктов.

Появление бактерий в моче в количестве, превышающем  $1 \times 10^5$ /мл (бактериурия), свидетельствует об инфицировании почек и/или мочевыводящих путей. Грамотрицательная микрофлора попадает в мочевыводящие пути гематогенным путем или в результате восходящей инфекции. В мочевом пузыре бактерии быстро размножаются, так как моча является хорошей питательной средой. Положительный результат на тест-полосках следует подтверждать культуральными исследованиями.

Хронический пиелонефрит — одно из наиболее распространенных заболеваний мочевой системы. Пиелонефрит чаще диагностируется у молодых женщин и детей, больных СД и мужчин старше 45 лет. У беременных бактериурия



выявляется в 5 раз чаще, чем у небеременных. В группу риска развития пиелонефрита входят больные уретритом, хроническим циститом, пиелостазом, мочекаменной болезнью, гипертонической болезнью, а также пациенты, подвергавшиеся инструментальному обследованию мочевыводящих путей, лежащие больные. Химическая реакция на нитриты позволяет выявить до 70% случаев бактериурий, в том числе бессимптомных.

Диагностические тест-полоски при относительно высокой чувствительности характеризуются относительно низкой специфичностью (принцип: главное — не пропустить патологию). Причины ложных результатов показаны в **табл. 3.4**.

**Таблица 3.4.** Причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов в тестовых зонах диагностических полосок

Параметр тест-полоски	Ложноотрицательные результаты	Ложноположительные результаты
Лейкоциты (лейкоцитарные эстеразы)	Витамин С (прием в сутки от 1 г), протеинурия >5 г/л, обильная слизь, цефалоспорины, нитрофураны, соли ртути, 1% борная кислота	Детергенты-окислители, формальдегид (0,4 г/л), азид натрия, насыщенно окрашенная моча
Нитриты (бактериурия)	Отсутствие овощей в диете, витамин С, грамположительная флора, короткое время пребывания мочи в мочевом пузыре	Насыщенно окрашенная моча, присутствие красящих пигментов, контаминация пробы при длительном хранении пробы
Кровь (RBC/Hb)	Высокая концентрация нитритов, формальдегид (0,5 г/л), длительное хранение пробы	Бактериальная пероксидаза в моче, детергенты-окислители, соляная кислота
Альбумин (белок)	Глобулины, легкие цепи Ig, насыщенно окрашенная моча	Щелочная моча (pH 9), хлоргексидин, лекарственные препараты на основе поливинилпирролидона, детергенты моющих, дезинфицирующих, спермацидных средств
Глюкоза	Витамин С, бактериурия	Детергенты-окислители, соляная кислота
Кетоны	Неправильное хранение пробы, изолированное присутствие $\alpha$ -гидроксibuтирата	Свободные сульфгидрильные группы лекарств (каптоприл), насыщенно окрашенная моча
Относительная плотность (удельный вес)	Ложно занижена в присутствии глюкозы, мочевины, в щелочной моче	Ложно завышена при концентрации белка >1 г/л, кетоацидозе
Уробилиноген	Формальдегид (2 г/л), хранение пробы на свету	Сульфонамиды, порфобилиноген
Билирубин	Витамин С, высокая концентрация нитритов, хранение пробы на свету	Насыщенно окрашенная моча, метаболиты нейрорептиков группы фенотиазина

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.1.4. Исследование осадка мочи

Микроскопия является неотъемлемой частью анализа мочи. При микроскопии оценивают характер и количество форменных (организованных) и кристаллических (неорганизованных) элементов осадка. Данный этап исследования является обязательным, если пациент находится в группе риска по развитию инфекционного и неинфекционного поражения мочевой системы, если диагноз заболевания мочевой системы установлен и проводится динамическое наблюдение, у детей раннего возраста, при патологическом течении беременности, у лежачих пациентов, пациентов реанимации. *Ориентировочный метод* позволяет обнаружить патологию мочевой системы даже при бессимптомном или малосимптоматичном течении. Информативность микроскопического исследования в немалой степени зависит от правильной подготовки пробы. Для концентрации элементов мочи перемешанный образец центрифугируют при скорости 1500–2000 об/мин в течение 10–15 мин. Осадок тщательно перемешивают, каплю помещают на предметное стекло и покрывают покровным. Вначале проводится обзорный просмотр препарата на малом увеличении ( $\times 100$ ), затем при увеличении  $\times 400$  оценивают характер и количество элементов, просматривая 10–20 полей зрения в зависимости от насыщенности элементами препарата. Результат исследования выдают в полуколичественном виде для эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров — диапазон от минимального до максимального количества в условном усредненном поле зрения, например: лейкоциты — 10–15 в поле зрения. Если клеточных элементов много и подсчитать их в поле зрения не удастся, отмечают в бланке, что лейкоциты (эритроциты) густо покрывают все поля зрения. При скудном содержании в препарате цилиндров, когда они обнаруживаются только при обзорном просмотре на малом увеличении, указывают их количество в препарате, например: «два гиалиновых цилиндра в препарате».

Количество остальных элементов организованного осадка и кристаллов оценивают качественно — «скудно», «умеренно», «много» — на основании просмотренных полей зрения на малом и большом увеличении, например: «переходный эпителий в умеренном количестве» или «кристаллы оксалатов в скудном количестве».

В щелочной моче с низкой относительной плотностью (<1,010) эритроциты и лейкоциты часто лизированы, в то время как химические реакции по данным параметрам могут иметь высокие положительные значения. Резко кислая моча

влияет на форму и насыщенность эритроцитов Нб. Информация об уровне pH мочи необходима для правильной идентификации кристаллов.

Одним из способов упростить узнавание элементов в нативных препаратах и тем самым улучшить и стандартизировать качество микроскопического исследования является суправитальное окрашивание осадка модифицированным красителем Штернгеймера. Данный способ рекомендуется Европейской конфедерацией лабораторной медицины (European Confederation of Laboratory Medicine — ECLM). Краситель дифференцированно окрашивает ядра и цитоплазму в клетках, почечные цилиндры, эритроциты, споры гриба, овоидные оксалаты осадка. Для стандартизации микроскопического исследования осадка мочи используют специальные слайд-планшеты, призванные заменить предметные и покровные стекла разной площади и помочь избежать проблемы дозирования пробы при приготовлении нативного препарата.

*Количественные методы* исследования осадка мочи в счетных камерах уточняют результаты ориентировочного исследования, нацелены на выявление скрытой лейкоцитурии, эритроцитурии и цилиндрурии.

Метод Каковского—Аддиса — определение количества эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров, выделяемых с мочой в течение суток, — практически перестал использоваться в клинической практике, так как происходит разрушение значительного количества клеточных элементов.

Метод Нечипоренко предназначен для определения эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров в разовой порции мочи, которая может быть получена от пациента в любое время. Как правило, исследование по Нечипоренко проводится в первой или второй утренней пробе мочи. Из доставленной в лабораторию средней порции мочи в мерную коническую пробирку отливают 10 мл и центрифугируют (10 мин при 2000 об/мин). Осадок аккуратно перемешивают пипеткой и заполняют им счетную камеру Горяева. Подсчет элементов по группам производится во всей сетке камеры, после чего количество эритроцитов, лейкоцитов и гиалиновых цилиндров пересчитывают на 1 мл нецентрифугированной мочи по формуле:

$$N_{\text{эле}} = \frac{X \times 1000}{V} \text{ или } N_{\text{эле}} = \frac{X \times 500}{V},$$

где X — количество элементов в счетной камере Горяева, 1000 или 500 — объем осадка после удаления надосадочной мочи, V — объем мочи, взятый для центрифугирования. Методика позволяет работать с любым объемом мочи.

Камерный метод исследования мочи по Нечипоренко входит в большое количество клинических рекомендаций. Референсные значения не имеют ни возрастных, ни половых различий и составляют: эритроциты — до 1000/мл, лейкоциты — до 2000/мл, гиалиновые цилиндры — до 20/мл.

*Автоматизированное исследование* на анализаторах мочи организованных и неорганизованных элементов позволяет уменьшить количество рутинной микроскопии и стандартизировать исследование. Автоматические анализаторы мочи можно распределить по основному принципу анализа — цифровой анализ изображения или проточная цитофлуориметрия.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

В проточных цитофлуориметрах элементы нецентрифугированной пробы дифференцируются и подсчитываются импедансным методом, детекцией рассеянного под разными углами света и индуцированной лазером флуоресценции (используются два селективных флуорохрома для нуклеиновых кислот и клеточных мембран). Элементы распределяются на скатерограммах по группам на основании их размера, формы, характера рассеивания света и характера свечения.

В анализаторах цифрового анализа изображения проводится фотографирование объектов стробоскопической цифровой камерой в непрерывном планарном потоке нецентрифугированной мочи или в специальной одноразовой кювете, в которой содержатся осажденные центрифугированием элементы. Компьютерная программа прибора распределяет элементы по группам на основании их размера, формы, контрастности и текстуры. Число групп идентифицируемых объектов в автоматических анализаторах может быть разным. У проточных цитофлуориметров в отчете присутствуют лейкоциты, эритроциты, бактерии, клетки плоского эпителия, «малые круглые клетки», гиалиновые цилиндры, патологические цилиндры, сперматозоиды, слизь, кристаллы, дрожжевые клетки. Цифровой анализ изображения выделяет дополнительно мелкие эпителиальные клетки (неплоский эпителий) и может дифференцировать кристаллы по их форме. При этом все микрофотографии автоматически рассортированного архива по каждой пробе мочи доступны для просмотра, и результат можно корректировать, перемещая элементы из группы в группу. Подобный способ валидации позволяет достаточно быстро выдавать готовые результаты и выбирать пробы, которые нуждаются в более тщательном исследовании под микроскопом.

Несмотря на то что автоматические мочевые анализаторы обладают высокой производительностью и выполняют исследование в строго стандартных условиях, ДС и ДЧ распознавания элементов не всегда идеально высокие, а для некоторых элементов могут быть в районе 50%, что обусловлено выраженным полиморфизмом ряда элементов, сильным влиянием физико-химических свойств мочи на морфологию клеток, невозможностью сфокусировать камеру на отдельном объекте при обильном осадке, сходность формы и размера у принципиально разных элементов. Поэтому результаты автоматической микроскопии, которые приборы выдают в форме единиц на миллилитр, нельзя воспринимать как точное количественное измерение, которое может заменить камерные методы. В КДЛ следует выводить свои референсные диапазоны для всех показателей, получаемых с помощью анализатора, с учетом контингента обследуемых. Использовать готовые референсные значения из руководства пользователя к прибору неверно. Автоматизация общеклинического анализа не отменяет активного участия в выполнении этого исследования врачами КЛД и не заменяет собой уточняющих количественных биохимических и морфологических методов исследования мочи.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.1.5. Диагностическое значение элементов мочевого осадка

**Эритроциты** у здорового взрослого и ребенка в моче при ориентировочном исследовании осадка не обнаруживаются. Норма эритроцитов при подсчете в камере по Нечипоренко — до 1000/мл.

**Неизменные (изоморфные) эритроциты** — безъядерные клетки зеленовато-желтого цвета за счет содержащегося в них Нб, имеют форму двояковогнутого диска. При длительном хранении *in vitro* в пробе с высокой относительной плотностью эритроциты сморщиваются, становятся похожими на плоды дурмана. В моче с низкой плотностью клетки становятся сферической формы, в моче с резко кислой рН теряют Нб, выглядят бесцветными кольцами. Эти изменения диагностического значения не имеют.

Неизменные эритроциты более характерны для пострениальной гематурии и чаще всего обнаруживаются в моче больных с урологической патологией: при воспалительном поражении мочевыводящих путей, при мочекаменной болезни, травме органов мочевого тракта, при опухолях мочевого пузыря. Однако при рениальной макрогематурии в осадке также преобладают неизменные эритроциты. При *остром диффузном гломерулонефрите* гематурия является одним из ведущих симптомов. Моча цвета «мясных помоев» появляется в первые дни заболевания. Эритроциты через разрушенную воспалительным процессом стенку гломерулярных капилляров массивно проникают в первичную мочу вместе с плазменными белками. При микроскопии такой мочи неизменные эритроциты сплошь покрывают поля зрения и не поддаются подсчету.

**Измененные (дисморфные) эритроциты** дегемоглобинизированы, бесцветные или сероватые, размер их меньше обычного, мембрана имеет неровные контуры в виде хаотично расположенных выбуханий и вдавлений, иногда почкообразных, придающих клетке «помятый» вид. Появление дисморфных эритроцитов в моче объясняют поражением клубочка: через поврежденную воспалительным процессом базальную мембрану происходит проникновение эритроцитов из капилляров в просвет боуменовской капсулы, где в гипертонической и резко кислой первичной моче они быстро теряют Нб, дальнейшие изменения размера и формы происходят уже при движении их в гипотонической моче в канальцах. Данный вид эритроцитов указывает на высокую вероятность начинающейся очаговой, подострой или хронической гломерулярной патологии, характерен для микрогематурии.

При *остром очаговом гломерулонефрите* цвет мочи не изменен, а при микроскопическом исследовании осадка мочи обнаруживаются единичные в поле зрения изоморфные и дисморфные эритроциты (микрогематурия).

При прогрессировании заболевания у больных развивается протеинурия и гипертония диастолического типа. В период выздоровления эритроциты обычно исчезают из осадка мочи быстрее, чем купируется протеинурия. Если в период клинического улучшения в осадке мочи постоянно обнаруживаются эритроциты, это прямой признак не стихающего гломерулита. При исподволь развивающейся злокачественной *опухоли почки* длительная микрогематурия с изоморфными эритроцитами часто является первым выявляемым маркером патологического процесса, поэтому при любой микрогематурии неясной этиологии необходимо исключать опухолевое поражение почки.

**Гематурия на фоне инфекционного процесса** (сепсис, грипп, скарлатина, инфекционный мононуклеоз, свинка, краснуха, бронхопневмония, ангина, дизентерия) свидетельствует о вовлечении в процесс почек и является ранним признаком осложнения, особенно у детей.

**Лейкоциты.** При ориентировочном исследовании осадка мочи здоровых взрослых и детей обнаруживают 0–2/0–3 лейкоцита в поле зрения. При подсчете методом Нечипоренко количество лейкоцитов не должно превышать 2000/мл. Лейкоциты, которые в подавляющем большинстве клинических ситуаций являются нейтрофилами, выглядят как неяркие сероватые клетки круглой формы в 1,5–2,0 раза больше неизменного эритроцита с обильной пылевидной зернистостью и сегментированным ядром. В *щелочной моче* с низкой относительной плотностью (1,002–1,008 г/мл) нейтрофилы увеличиваются в размерах, разбухают, в них видно броуновское движение гранул. При длительном нахождении в такой моче нейтрофилы разрушаются. В патологической моче, помимо нейтрофилов, могут быть обнаружены эозинофилы, лимфоциты, моноциты и макрофаги.

**Эозинофилы** — такого же размера, как нейтрофилы, но с более крупной сферической зернистостью, одинакового размера, желтоватого или зеленоватого цвета, резко преломляющей свет.

**Лимфоциты** характеризуются мелким размером, сходным с неизменными эритроцитами, это сферические клетки, в которых можно с трудом рассмотреть очень узкую цитоплазму, окружающую ядро.

**Моноциты и макрофаги (гистиоциты)** — крупные клетки (больше эритроцита в 3–4 раза). Чаще встречаются макрофаги — почти идеально круглые клетки с небольшим ядром, заполненные полиморфными включениями. Чтобы правильно дифференцировать лейкоциты по виду, необходимо исследование окрашенного азур-эозином мазка, приготовленного из осадка мочи, — «лейкоцитарной формулы мочи». К осадку мочи добавляют 1–2 капли сыворотки, чтобы обеспечить хорошую адгезию клеток на стекле. Каплю осадка наносят на предметное стекло и делают тонкий мазок. После высушивания на воздухе мазок фиксируется и окрашивается так же, как окрашивают мазки крови. Подсчитывают 100–200 лейкоцитов и выдают ответ в виде процентного распределения так же, как при исследовании мазков крови.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

Моча при лейкоцитурии и пиурии обычно имеет нейтральные или щелочные значения рН. Стойкая лейкоцитурия при рН 5–5,5 подозрительна на туберкулез почек. Лейкоцитурия наблюдается при тяжело протекающих вирусных инфекционных заболеваниях, в частности при инфекционном гепатите. Встречается *асептическая* абактериальная лейкоцитурия, она характерна для волчаночного нефрита, подострого хронического гломерулонефрита, проявляется сочетанием нейтрофилов и лимфоцитов, количество последних достигает 20% и более в лейкоцитарной формуле мочи. Отсутствие инфекционного компонента при асептической лейкоцитурии доказывают отрицательные результаты

бактериологических посевов. Лимфоцитурия указывает на реакцию *отторжения аллотрансплантата* почки. Значительное количество (до 100% клеток) лимфоцитов в молочнокислой моче, на поверхности которой при стоянии образуются капли жира, свидетельствует о *хилурии*. Хилурия может быть результатом травмы органов мочевой системы, прорастания опухоли в лимфатический проток, врожденной анатомической аномалии развития лимфатических протоков.

У больных атопической формой нефрита и лекарственным интерстициальным нефритом в моче появляются эозинофилы. Эозинофилы в моче могут указывать на паразитарное поражение почек при мочеполюсовом шистосомозе, цистицеркозе, токсокарозе и других ларвальных формах гельминтозов. Обнаружение макрофагов на фоне умеренной и незначительной лейкоцитурии указывает на длительность воспалительного процесса мочевыводящих путей. Чаще всего макрофаги обнаруживаются в моче больных хроническим циститом.

О локализации воспалительного процесса можно судить по результатам трехстаканной пробы, когда последовательно исследуют осадок мочи разных порций. Если в осадках из всех трех порций содержатся лейкоциты в одинаковом количестве, то источник лейкоцитов — почка или мочеточники; если выражено преобладают в первой порции — поражена уретра, если значительная часть в последней, третьей — мочевой пузырь.

**Цилиндры** — это слепки, образующиеся в просвете канальцев почки, имеют белковое, клеточное или смешанное белково-клеточное происхождение. Различают гиалиновые, зернистые, восковидные, пигментные, эпителиальные, эритроцитарные, лейкоцитарные, жировые и пигментные цилиндры.

**Гиалиновые цилиндры** — полупрозрачные, нежные, гомогенной структуры с закругленными концами, разных размеров, образуются в просвете извитой, наиболее узкой части дистального канальца, в кислой среде (рН 4,5–5,3).

У здорового человека в моче методом Нечипоренко удастся обнаружить не более 1 гиалинового цилиндра в пяти последовательно просмотренных камерах Горяева (не более 20/мл). Эти гиалиновые цилиндры формируются в основном из уропротина Тамма–Хорсфалла — крупных белковых молекул, синтезируемых канальцевым эпителием, с включением в состав небольшого количества альбумина и мелких белков. При увеличении концентрации белка Тамма–Хорсфалла в сочетании с увеличением концентрации электролитов и ионов водорода в первичной моче происходят агрегация белка и образование геля, из которого и образуются гиалиновые цилиндры. Если проницаемость гломерулярного барьера для альбумина увеличивается (транзиторная протеинурия), то количество образующихся гиалиновых цилиндров может увеличиваться значительно. Подобные транзиторные протеинурии в сочетании с цилиндрурией в виде гиалиновых цилиндров наблюдаются при большом количестве патологических состояний, сопровождающихся лихорадкой, интоксикацией, нарушением гемодинамики, обезвоживанием, но при интактных нефронах. Образованию цилиндров способствует замедление почечного кровотока, увеличение содержания в первичной моче плазменных белков, электролитов, желчных кислот, повреждение клеток почечного эпителия, спазм или дилатация канальцев. Гиалиновые цилиндры характерны для всех заболеваний почек, на органическое поражение нефрона указывает сочетание их с дисморфными эритроцитами и большим количеством клеток почечного эпителия, часть из которых находится в состоянии жировой дистрофии, присутствие других видов цилиндров — зернистых, восковидных, лейкоцитарных, эритроцитарных и жировых. Количество гиалиновых цилиндров не коррелирует с тяжестью процесса. На поверхности их могут откладываться клеточный детрит, капли жира, аморфные кристаллы, лейкоциты, эритроциты, бактерии, клетки почечного эпителия, но всегда остается видна полупрозрачная нежная белковая структура самого цилиндра.

**Восковидные цилиндры** образуются из гиалиновых, длительное время находящихся в дистальных канальцах и собирательных трубках на фоне постоянной протеинурии. Это плотные, гомогенные, напоминающие обломки восковых свечей, четко контурированные образования цилиндрической формы. Они обычно шире гиалиновых, но могут быть очень узкими, часто окрашены мочевыми пигментами в желтый цвет. При длительной почечной гематурии окрашиваются Нб и продуктами его распада. Восковидные цилиндры имеют плотную и жесткую структуру, на их поверхности можно видеть трещины, бухтообразные вдавления, пустоты, напоминающие вакуоли. Концы восковидных цилиндров часто обломаны. На поверхности восковидных цилиндров часто присутствуют клетки почечного эпителия и их фрагменты, дисморфные эритроциты, зернистые массы.

Широкие цилиндры с плотным контуром называют застойными, появление их в моче свидетельствует о тяжелом поражении почек. Присутствие в осадке мочи терминальных цилиндров характерно для ХБП.

**Зернистые цилиндры** — непрозрачные *грубозернистые*, с неровным шероховатым контуром за счет образующих его объемных гранул из белковых цилиндров и продуктов деградации клеток почечного эпителия. Мелкозернистые цилиндры образуются из разрушенных в просвете канальцев лейкоцитов и основы — гиалиновых цилиндров.

Широкие зернистые цилиндры образуются в собирательных трубках, рассматриваются как терминальные.

Зернистые цилиндры никогда не обнаруживаются в моче здоровых людей и при транзиторной цилиндрурии, но обнаруживаются при нефротическом синдроме, выраженном тубулоинтерстициальном компоненте, гломерулонефрите, пиелонефрите, туберкулезе и раке почек, нефропатиях, системной красной волчанке (СКВ), нефрозах.

**Пигментные цилиндры** имеют зернистую или гомогенную структуру и окрашены в насыщенный красно-коричневый или бурый цвет. Они формируются с участием продуктов деградации Нб или МГ, характерны для длительной и массивной ренальной гематурии, хронической преренальной гематурии и миоглобинурии.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Эпителиальные цилиндры** состоят из клеток почечного эпителия, всегда окрашены мочевыми пигментами.

В препаратах с эпителиальными цилиндрами всегда присутствуют свободно лежащие клетки почечного эпителия в большем или меньшем количестве. Обнаруживаются в моче при ОБП, у пациентов с остаточным диурезом при терминальной ХБП, при тубулярном некрозе, остром и хроническом гломерулонефрите.

**Жировые цилиндры** образуются из липоидов в почечных канальцах при жировой дистрофии клеток почечного эпителия. Располагаются на фоне жироперерожденного почечного эпителия, иногда в этих препаратах можно обнаружить кристаллы ХС и иглы жирных кислот. Капли липоидов в поляризационном микроскопе двояко преломляют свет, образуя фигуру черного креста внутри яркой белой капли, в отличие от капель нейтрального жира, который этим эффектом не обладает. Встречаются жировые цилиндры при хроническом гломерулонефрите, пиелонефрите, при липоидном нефрозе и диабетической нефропатии.

**Лейкоцитарные цилиндры** — слабоокрашенные, состоят из лейкоцитов и располагаются на их фоне. Образуются в просвете канальцев при остром пиелонефрите, обострении хронического пиелонефрита, абсцессе почки.

**Эритроцитарные цилиндры** — розовато-желтые и красновато-коричневые, состоят из склеенных в сгустки эритроцитов или эритроцитов, плотно покрывающих поверхность белковых цилиндров. Образуются в канальцах при почечной гематурии, кровоизлиянии в паренхиму почек при инфаркте почки, эмболии почечной артерии, остром гломерулонефрите. Сочетаются с макро- и микрогематурией.

**Солевые цилиндры** образуются *in vitro* из кристаллов оксалата кальция, мочевой кислоты, кислого мочекислового аммония и других в результате кристаллизации солей на поверхности гиалиновых цилиндров, но чаще — на тяжах слизи. При подогревании нативного препарата или при добавлении к нему капли 10% щелочи (моча кислая) или 30% уксусной кислоты (моча щелочная) происходит растворение аморфных солевых масс. Этот способ помогает избежать ложноположительных результатов.

**Слизь** всегда присутствует в моче, но количество ее скудное. При раздражении эпителиальной стенки мочевыводящих путей количество слизи может увеличиваться значительно. Иногда рыхлые нити слизи складываются в образования, напоминающие гиалиновые цилиндры, — **цилиндриды**. Цилиндриды отличают от гиалиновых цилиндров по лентовидной форме, продольной тяжистости, бахромчатым или заостренным концам.

**Эпителий.** В осадке мочи встречаются эпителиальные клетки трех основных видов: многослойный плоский (ороговевающий и неороговевающий), переходный (уротелий) и почечный (тубулярный). В мужской моче при уретритах может обнаруживаться цилиндрический эпителий.

**Многослойный плоский эпителий** — это очень крупные клетки (40–80 мкм и более), бесцветные, полигональные или овальные, с мелкими, центрально расположенными ядрами. Эти клетки поверхностного слоя кожи, дистального отдела уретры, а у женщин — влагалища, в большом количестве попадают в мочу во время мочеиспускания при несоблюдении правил сбора мочи или при контаминации мочи влагалищными выделениями. Диагностического значения они не имеют, но указывают на характер преаналитического этапа, что нужно учитывать при трактовке результатов анализа.

**Переходный эпителий (уротелий)** выстилает лоханки почек, мочеточники, мочевой пузырь, крупные протоки предстательной железы и проксимальный отдел мочеиспускательного канала. Уротелий крайне полиморфен по размеру и форме: отторгнутые клетки переходного эпителия уловатые (полиэдральные), округлые, цилиндрические, в 3–10 раз больше лейкоцита, их цитоплазма зернистая, ядра небольшие, от 1 в небольших клетках до 4 в крупных; клетки всегда окрашены мочевыми пигментами.

Единичные клетки переходного эпителия могут встречаться при обзорном просмотре препарата у здоровых людей. Увеличение количества клеток уротелия свойственно для состояний, сопровождающихся интоксикацией, у лихорадящих больных, после операций и инструментальных манипуляций на органах мочевой системы, при непереносимости наркоза и лекарственных препаратов, при желтухах разной этиологии, почечно-каменной болезни, хроническом цистите и пиелоцистите, полипозе и раке мочевого пузыря в сочетании с клетками злокачественного новообразования.

**Почечный (тубулярный) эпителий** — клетки неправильной округлой, угловатой, кубической формы, в 1,5–2,0 раза больше лейкоцита, окрашены мочевыми пигментами в бледно-желтый, а при гиперуробилинурии и билирубинурии — в желто-коричневый и насыщенный желто-оранжевый цвет. Цитоплазма клеток содержит большое количество мелких гранул, при жировой дистрофии заполняется каплями липоидов.

В моче здоровых людей клетки почечного эпителия не встречаются. При дегенеративных поражениях канальцев клетки почечного эпителия могут располагаться в нативных препаратах разрозненно, пластами или группами, накладываясь на цилиндры, при усиленном отторжении — образовывать эпителиальные цилиндры. Почечный эпителий обычной морфологии обнаруживается при длительных лихорадочных состояниях, тяжелом течении заболеваний печени, тяжело протекающих инфекциях.

В период олигурической стадии ОБП и в терминальной стадии ХБП клетки почечного эпителия находятся в состоянии резко выраженной пролиферации, увеличиваются в размерах (в 3–5 раз больше лейкоцитов) за счет крупных вакуолей, оттесняющих большое ядро к краю, часто располагаются в препаратах в виде шаровидных железистоподобных структур. В состоянии жировой дистрофии клетки принимают круглую или овальную форму, могут в 2–4 раза увеличиваться в диаметре. Жироперерожденный почечный эпителий характерен для нефротического синдрома и липоидного нефроза.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Неорганизованный осадок мочи** — это выкристаллизовавшиеся компоненты мочи. Процессы кристаллизации могут происходить как *in vivo*, так и *in vitro*, однако подавляющее большинство обнаруженных кристаллов — продукт *in vitro*. На основании кислотности кристаллизации неорганизованный осадок мочи разделяют на кристаллы кислой мочи, кристаллы кислой, нейтральной и щелочной мочи, кристаллы нейтральной и щелочной мочи, кристаллы щелочной мочи. Независимо от pH выделяют кристаллы аминокислот, кристаллы из дериватов Hb и пигментов, кристаллы жиров и кристаллы ЛС. Многие из кристаллов могут обнаруживаться в моче у здоровых, некоторые являются строго патогномоничными для конкретных патологических состояний.

Исследование неорганизованного осадка происходит при ориентировочном микроскопическом исследовании. Для более легкой идентификации кристаллического осадка необходимо знать pH мочи, а при необычной и незнакомой форме кристаллов — уметь определять их с помощью микрохимических реакций (**табл. 3.5**).

**Таблица 3.5.** Физико-химические свойства и клиническое значение часто встречающихся кристаллических осадков

Группа кристаллов по характеру мочи	Название кристаллов	Клинические ситуации, при которых обнаруживают кристаллы. Химические свойства кристаллов
Кристаллы кислой мочи, pH 5,0–5,5	Мочевая кислота	Здоровые лица на мясной пище, дегидратация, обширный тканевой и клеточный распад, гиперлейкемическая форма лейкоза, обострение системного воспаления, нарушения гемодинамики, мочекишный диатез, мочекаменная болезнь. Растворяется в 10% гидроксиде натрия (NaOH), 10% гидроксиде калия (KOH) и при нагревании
	Ураты	То же, что характерно и для мочевой кислоты. Растворяются при нагревании, в 10% NaOH, в реактиве Селена
	Сернокислый кальций	Клинического значения не имеет. Растворяется в 10% NaOH и 10% KOH
	Гиппуровая кислота	Избыточное употребление в пищу брусники, груш, сливы, прием бензойной или салициловой кислоты. Растворяется в спирте, бензине и в эфире
Кристаллы кислой, нейтральной и щелочной мочи, pH 5–10	Кислый мочекишный аммоний	Выпадает в осадок при длительном стоянии. У детей в резко кислой моче встречается при мочекишном диатезе, у взрослых — при мочекаменной болезни. Растворяется при нагревании, при охлаждении вновь выпадает в осадок. Растворяется в 10% KOH с образованием пузырьков аммиака
	Оксалаты кальция	Результат избыточного употребления продуктов, содержащих щавелевую кислоту. Встречаются на фоне диабета, тяжелых инфекций — транзиторная оксалурия. Первичная оксалурия — наследственный дефицит $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса ( $\alpha$ -КГГК) — у младенцев. У взрослых — на фоне дефицита витаминов B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> . Медленно растворяется в концентрированной соляной (HCl), азотной (HNO <sub>3</sub> ), серной (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) кислотах
Кристаллы слабокислой, нейтральной и щелочной мочи, pH 6,5–10	Трипельфосфаты	Защелачивание мочи при длительном хранении и размножении бактерий. Растворяются в 30% уксусной кислоте и в других кислотах
	Нейтральная фосфорно-кислая известь	Артриты, артрозы, железодефицитная анемия (ЖДА), а также у здоровых лиц, входит в состав фосфатных камней мочевого пузыря. Растворяются в 30% уксусной кислоте
Кристаллы щелочной мочи, pH 7,5–10	Фосфаты аморфные	Защелачивание мочи при длительном хранении и размножении бактерий. Растворяются в 30% уксусной кислоте и других кислотах
	Кальций углекислый	
	Магний фосфорно-кислый	

**Аминоацидурия** — кристаллы аминокислот лейцина, тирозина, ксантина, цистина выделяются с мочой в достаточных для их кристаллизации количествах только при патологических состояниях, сопровождающихся нарушением обмена аминокислот. Это наследственные болезни: первичная цистинурия, первичная ксантинурия и болезнь «мочи кленового сиропа». Приобретенные аминоацидурии могут быть обусловлены нарушением метаболизма аминокислот в результате тяжелого поражения печени — вторичная цистинурия, лейцин-, тирозинурия — и массивного тканевого и клеточного распада — вторичная лейцин- и тирозинурия.

Кристаллы гемосидерина в осадке мочи обнаруживают у больных с внутрисосудистым гемолизом. Гемосидерин является дериватом гемоглобина, реабсорбированного тубулярным эпителием. При микроскопическом исследовании в клетках почечного эпителия обнаруживают аморфные желто-коричневые кристаллы, сходные с аморфными уратами. Для идентификации кристаллов гемосидерина необходимо проводить микрохимическую реакцию с 3% желтой кровяной солью и 3% HCl. Кристаллы ХС обнаруживаются в моче очень редко на фоне липурии у больных ХБП, с нефротическим синдромом на фоне олигурии (хроническая почечная недостаточность), амилоидно-липидным нефрозом.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

Кристаллы лекарственных препаратов могут появляться в моче при передозировке и длительном употреблении препаратов, выводимых с мочой. Это сульфониламидные и нитрофурановые уросептики, антибиотики, цитостатики, противовирусные препараты и ряд других средств.

Особенности осадка мочи при заболеваниях мочевой системы суммированы в **табл. 3.6**.

**Таблица 3.6.** Отличительные особенности осадка мочи при патологических состояниях мочевой системы

Клиническое состояние	Особенности осадка мочи
Нефротический синдром	Липидурия, жироперерожденный почечный эпителий, кристаллы ХС
	Выраженная цилиндрурия, эпителиальные и жировые цилиндры
	Микрогематурия, дисморфные эритроциты
Нефритический синдром	Гематурия от умеренной до выраженной, дисморфные эритроциты, эритроцитарные и пигментные гемоглобиновые цилиндры, умеренная лейкоцитурия, почечный эпителий и эпителиальные цилиндры, застойные восковидные цилиндры
Острый тубулярный некроз	Почечный эпителий в большом количестве, пласты почечного эпителия, эпителиальные цилиндры, пигментные цилиндры. В зависимости от причины некротических процессов: <input type="checkbox"/> макрогематурия, эритроцитарные цилиндры при пролиферативном/некротизирующем гломерулонефрите; <input type="checkbox"/> только пигментные миоглобиновые цилиндры при рабдомиолизе; <input type="checkbox"/> кристаллы мочевой кислоты при острой мочекислотной нефропатии; <input type="checkbox"/> кристаллы оксалата кальция при отравлении этиленгликолем
Инфекция мочевыводящих путей	Лейкоцитурия, переходный эпителий
	Бактериурия, кристаллы трипельфосфатов
	Лейкоцитарные цилиндры при развитии пиелонефрита
Урологическая патология	Гематурия — неизмененные эритроциты, клетки переходного эпителия
	Лейкоцитурия

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.2. Копрологическое исследование

Анализ кала — метод, позволяющий установить характер нарушения пищеварения в желудке и тонкой кишке, оценить характер патологических процессов в толстой кишке, отследить течение хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и результаты лечения. Копрограмма — это комплексное макроскопическое, химическое и микроскопическое исследование кала, нацеленное на получение информации о функциональном состоянии всех отделов ЖКТ. Полноценный комплексный анализ позволяет формировать заключение в форме «копрологических синдромов». Помимо комплексного копрологического исследования, существуют отдельные специальные тесты, предназначенные для определения конкретных метаболитов, антигенов, специфических белков у пациентов, находящихся в группах риска по развитию определенной патологии или с уже установленными заболеваниями.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.2.1. Правила сбора кала

Для копрологического исследования подготовка пациента заключается в соблюдении диеты с полноценной пищевой нагрузкой белками, жирами и углеводами, соблюдаемой в течение 3–4 дней перед исследованием (общий стол № 15). Запрещены к употреблению трудноперевариваемые копчености, сало, орехи, семечки, авокадо. За сутки перед сбором материала должны быть исключены препараты, влияющие на пищеварение. Дефекация должна быть самостоятельной, без стимуляции; производится в специальное приспособление, чтобы избежать примеси к калу мочи, откуда небольшая часть в объеме 20–30 г переносится в одноразовый пластиковый контейнер-стаканчик. Нельзя собирать кал с подгузников или пеленок, из горшка, судна.

В лабораторию кал должен быть доставлен не позднее 10–12 ч после дефекации при условии хранения пробы в холодильнике при +4–5 °С.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.2.2. Копрограмма

**Макроскопическое исследование** оценивает форму, консистенцию, цвет, запах каловых масс и наличие видимой примеси непереваренной пищи, слизи, крови, гноя. В норме кал оформленный, умеренно мягкой консистенции. **Форма** кала в норме цилиндрическая, меняется, если в дистальном отделе толстой кишки изменяется моторика или возникает механическая преграда: «овечий кал» — при спастическом колите и нейрогенном спазме кишечника, лентовидная — при спазме ректального сфинктера, опухоли, геморрое. **Консистенция.** При нарушении всасывания воды в толстой кишке на фоне воспаления кал имеет жидкую консистенцию, в присутствии большого количества невосаженного в тонкой кишке жира — мазевидную, при запорах кал плотный, а при обилии непереваренной растительной клетчатки — рыхлый. **Цвет** кала зависит от наличия стеркобилина — в норме кал имеет оттенки коричневого. При обтурации холедоха кал становится бесцветным, почти белым; при значительном содержании жира — серо-желтым. Понять причину изменения цвета без химического и микроскопического исследования нельзя.



*Запах* кала также дает важную информацию: кислый запах характерен для бродильных процессов, а гнилостный может указывать на гнилостный дисбиоз или выраженную экссудацию в толстой кишке.

*Химическое исследование* имеет большое значение в копрологическом анализе, так как характерная для отдельных копрологических синдромов картина формируется на основании сочетания химических реакций с микроскопической картиной. Химическое исследование включает качественное определение в кале с использованием тест-полосок pH, стеркобилина, билирубина, воспалительного белка, крови.

Кал здорового человека имеет нейтральную или слабощелочную pH (7,0–7,5) и резко положительную реакцию на стеркобилин, обусловленные жизнедеятельностью нормальной микрофлоры толстой кишки, отрицательными реакциями на билирубин, кровь, воспалительный белок (альбумин) и лейкоцитарные эстеразы. Снижение и отсутствие стеркобилина и положительная реакция на билирубин могут указывать на нарушение микрофлоры или быть обусловлены диареей, положительная реакция на альбумин указывает на экссудацию в толстой кишке, положительные белок и лейкоцитарные эстеразы указывают на воспаление, отрицательные билирубин и стеркобилин подтверждают подозрение на ахолию. ДЧ и ДС у диагностических зон тест-полоски при исследовании кала разные: зоны на стеркобилин, билирубин, белок, лейкоцитарные эстеразы имеют хорошую специфичность; псевдопероксидазная реакция на кровь часто ложноположительная из-за присутствия в кале продуктов деградации мясной пищи и бактериальной пероксидазы.

*Кровь в кале.* При наличии макроскопически определяемой крови в кале никаких уточняющих лабораторных тестов делать не нужно. Но скрытое кровотечение без лабораторного исследования установить невозможно.

Для выявления скрытых кровотечений необходимо проводить иммунохроматографический тест на человеческий Hb, ДЧ и ДС которого превышает 90%, что позволяет исследовать кал в любой момент и без предварительной подготовки пациента. При подозрении на кровотечение в дистальных отделах толстой кишки используют моно-тест на Hb. Если подозревается кровотечение из верхних отделов пищеварительного тракта, то целесообразно использовать тесты на устойчивые к бактериальным и пищеварительным ферментам комплексы «Hb–трансферрин» или «Hb–гаптоглобин». Данный экспресс-метод внесен в клинические рекомендации обследования пациентов профилей гастроэнтерологии, колопроктологии, кардиологии, лучевой и химиотерапии как наиболее целесообразный. На основе этого теста проводится наблюдение пациентов группы риска по развитию колоректального рака.

*Маркеры воспаления.* При выявлении рутинным общеклиническим исследованием кала признаков воспаления целесообразно проведение более точных и специфичных тестов: это фекальный кальпротектин (КП), лактоферрин или эозинофильный нейротоксин. Высокие ДЧ и ДС иммунохроматографических и ИФА-экспресс-тестов дают возможность быстро получать количественные или полуколичественные результаты, позволяют своевременно выявлять обострение у пациентов с такими тяжелыми заболеваниями, как неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, определять признаки эозинофильной инфильтрации слизистой, характерной для паразитарных инвазий, аллергических колитов, пищевой аллергии, коллагенозного колита.

*Пищеварительные ферменты в кале.* Панкреатическая эластаза, экскретируемая поджелудочной железой (ПЖ) вместе с другими ферментами, связывается с солями желчных кислот, поэтому практически не подвергается деградации и выделяется с калом в концентрациях, в несколько раз превышающих ее уровень в панкреатическом соке (более 200 мкг/г кала). Снижение концентрации эластазы-1 в кале свидетельствует об экскреторной недостаточности ПЖ, что характерно для хронического панкреатита, муковисцидоза, механической блокады ПЖ.

*Экспресс-тесты на инфекционные агенты.* Диагностика инфицирования *Helicobacter pylori* с помощью иммунохроматографии и ИФА в образцах кала являются тестами первой линии диагностики (ДС и ДЧ — 99%), позволяющими без инвазивного вмешательства определить пациентов группы риска, а также контролировать эффективность терапии.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Микроскопическое исследование* кала состоит из последовательного исследования четырех препаратов, приготовленных из каловой эмульсии.

*Нативный препарат* предназначен для изучения морфологического состава по следующим основным параметрам: мышечные волокна с исчерченностью и без таковой, эластическая ткань, растительная перевариваемая клетчатка, капли жира, игольчатый детрит и глыбки, слизь, эритроциты, лейкоциты, цилиндрический эпителий, кристаллы.

При обнаружении игольчатого детрита препарат подогревают для уточнения физических свойств игл-кристаллов; при подогревании расплавляются иглы-кристаллы жирных кислот. Если обнаружены цисты простейших и яиц гельминтов, обязательно определяется их видовая принадлежность в препарате с реактивом Люголя.

*Препарат с реактивом Люголя* предназначен для описания расположения крахмала (внутриклеточный или внеклеточный), описания йодофильной флоры (нормальная или патологическая), в этом же препарате изучают строение цист простейших для их видовой идентификации.

*Препарат с 0,5% раствором метиленового синего* необходим для определения характера капель жира: окрашиваются капли жирных кислот, не окрашивается нейтральный жир.

*Препарат с 30% уксусной кислотой* нужен для изучения свойств игольчатого и глыбчатого детрита: при кипячении с уксусной кислотой происходит растворение кристаллов солей жирных кислот с образованием капель. Если в каловых массах макроскопически присутствуют тяжи слизи с гноем, кровью или белесые тканевые клочки, из них делают мазки — пятый препарат — и окрашивают для цитологического исследования.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.2.3. Копрологические синдромы



Копрологический синдром — это комплекс химико-микроскопических признаков и макроскопических особенностей кала, свойственных для нарушения пищеварения на том или ином уровне пищеварительной системы.

Изолированные копрологические синдромы в реальной практике встречаются редко: выраженное нарушение пищеварения в проксимальных отделах пищеварительного тракта неминуемо сказывается на состоянии дистальных отделов кишечника.

**Синдромы мальдигестии** — нарушение просветного пищеварения — развивается в результате: изменения pH среды полого органа, что снижает активность ферментов или приводит к гиперсекреции; дефицита поступающей в кишечник желчи, липазы и других ферментов; избыточного роста бактериальной флоры тонкой кишки; нарушения всасывания натрия; нарушения моторики; конкурентного потребления необходимых для пищеварения веществ простейшими, гельминтами и патологической флорой; последствий оперативного вмешательства (резекция органа, анастомозы между органами); эндокринных нарушений; воспалительных процессов.

1. *Недостаточность пищеварения в желудке по типу ахилии/ахлоргидрии* характерна для хронических атрофических гастритов (*Helicobacter*-ассоциированный и аутоиммунный генез), инфильтративного и диффузно-инфильтративного рака желудка, химического или лучевого воздействия, выраженного отека слизистой на фоне острого воспаления.

2. *Гиперхлоргидрия* является следствием гиперацидного гастрита (часто *Helicobacter*-ассоциированного), ассоциирована с язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, может развиваться при стрессе — гиперреактивный гиперацидный гастрит.

3. *Гипохлоргидрия и/или быстрая эвакуация пищи из желудка*. У детей до 7-летнего возраста этот тип пищеварения является вариантом нормы, поэтому описывается как физиологическая гипохлоргидрия. У взрослых подобная картина указывает на нарушение моторной функции желудка или гипоацидное состояние. Гипоацидные гастриты характеризуются хроническим рецидивирующим течением и обусловлены инфицированием *H. pylori* и формирующейся воспалительной реакцией, употреблением жирной пищи и газированных напитков, длительным приемом нестероидных противовоспалительных препаратов, курением, алкоголем. Гипосекреторный гастрит может быть следствием генетически обусловленных дефектов формирования слизистой, эндокринной патологии, аутоиммунных заболеваний, метаболических нарушений. Со временем на фоне гипоацидного состояния развивается нарушение моторной функции желудка.

4. *Экзокринная недостаточность ПЖ* в результате острого или хронического панкреатита, панкреонекроза, опухоли ПЖ, механической обтурации главного панкреатического (вирсунгова) протока, муковисцидоза. Выраженность копрологической картины зависит от степени нарушения экзокринной функции: при полной блокаде стеаторея представлена только нейтральным жиром, при частичной нейтральный жир сочетается с жирными кислотами. Целесообразно проведение уточняющего исследования — определение активности панкреатической эластазы-1 в кале. На результат исследования не влияет прием ферментативных препаратов. Уровень активности эластазы-1 менее 200 мкг/г свидетельствует о наличии слабовыраженной, менее 100 мкг/г — тяжелой экзокринной недостаточности ПЖ. Уровень эластазы в кале 200–500 мкг/г интерпретируется как «серая» зона, свыше 500 мкг/г — как норма.

5. *Нарушение желчеотделения (ахолия)* сопровождается печеночную и подпеченочную желтуху. Стеаторея при ахолии обусловлена отсутствием желчных кислот, необходимых для образования при взаимодействии с жирными кислотами водорастворимых комплексов-мицелл.

**Синдром мальабсорбции** — нарушение всасывания в тонкой кишке, где происходят сложные процессы: внутрисполостное расщепление пищевых веществ, гидролитическое расщепление олигомеров на поверхности щеточной каймы энтероцитов (мембранное или пристеночное пищеварение) и поступление мономеров внутрь энтероцитов — всасывание. Синдром мальабсорбции является основным клиническим проявлением патологии тонкой кишки, сопровождается серьезными, часто необратимыми метаболическими нарушениями. Различают врожденные, первичные и вторичные нарушения всасывания. Врожденные аномалии связаны с изолированными дефектами трансмембранного транспорта аминокислот, моносахаридов и жирных кислот, витаминов и минеральных веществ. К первичным относят генетически детерминированные заболевания: целиакию, дисахаридазную недостаточность, мальабсорбцию фолатов. Вторичные обусловлены острыми и хроническими энтеритами, ишемической и экссудативной энтеропатией, нарушениями строения стенки тонкой кишки (амилоидоз, фиброзное замещение слизистой и подслизистого слоя), последствиями оперативного вмешательства (синдром слепой кишки, резекция кишки) и дивертикулезом, при которых избыточная бактериальная колонизация проксимального отдела тонкой кишки приводит к нарушению деконъюгации желчных кислот; паразитарными инвазиями (лямблиоз, аскаридоз, стронгилоидоз) и другими причинами.

**Синдромы поражения толстой кишки.** В толстой кишке под воздействием бактериальной флоры и пищеварительных ферментов тонкой кишки происходит окончательная деградация пищевых продуктов. При нарушениях пищеварения в желудке и тонкой кишке накапливается большое количество непереваренных или полупереваренных продуктов в толстой кишке, что формирует такие симптомы диспепсии, как вздутие живота, газообразование, боли в животе, поносы, перемежающиеся с запорами. Такая симптоматика сопровождает как алиментарные и функциональные нарушения, так и органические поражения толстой кишки.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Бродильные диспепсии** развиваются при передозировке углеводистой пищи. При анацидных состояниях и ускоренной эвакуации химуса из желудка непереваренная растительная пища в значительном количестве оказывается в просвете толстой кишки, в результате чего начинается активное размножение нормальной бродильной (йодофильной) бактериальной флоры. Выделяющаяся углекислота и органические кислоты раздражают слизистую кишечника, развивается устойчивый воспалительный процесс слизистой на фоне усиленных процессов брожения — *бродильный*

*колит*. Со временем в просвете толстой кишки формируется устойчивая кислая среда с pH 5,5–6,0, в которой обычные представители нормального микробиома кишечника пролиферируют плохо, но создаются благоприятные условия для колонизации патогенной бактериальной флорой, формируется *бродильный дисбиоз (дисбактериоз)*.

**Гнилостные диспепсии.** Гнилостные процессы усиливаются при поступлении в толстую кишку большого количества непереваренного пищевого белка (алиментарный фактор) или воспалительного экссудата. Образуется значительное количество продуктов гниения (аммиак, меркаптан, индол, скатол), негативно влияющих на состояние слизистой кишки, что приводит к нарушению всасывания воды и электролитов через отечную слизистую, а устойчивый сдвиг pH в резко щелочные значения способствует нарушению бактериального равновесия. Таким образом, вначале формируется *гнилостный колит* с водянистым калом, затем — *гнилостный дисбиоз*, при котором нормальная бродильная флора исчезает, замещаясь чужеродными бактериальными агентами. Гнилостные дисбиозы являются благоприятным фоном для активного размножения условно-патогенного представителя царства простейших *Blastocystis spp.*, что вносит дополнительный негативный вклад, усугубляя клинические проявления.

**Длительная антибиотикотерапия** приводит к развитию колита с тяжелым дисбактериозом и кандидамикозом слизистой оболочки.

Во всех случаях подозрения на серьезные дисбиотические состояния гипотеза о наличии патогена должна подтверждаться микробиологическими исследованиями — посевами или ПЦР-анализом.

**Аллергический (эозинофильный) колит** возникает при пищевой аллергии, аллергии на некоторые лекарственные препараты, при гельминтных и протозойных инвазиях, гиперэозинофильном синдроме. При микроскопии нативных препаратов кала патогномичным для эозинофильного колита является обнаружение кристаллов Шарко–Ляйдена. Лейкоциты в слизи в нативном препарате идентифицировать как эозинофилы довольно затруднительно, поэтому при подозрении на эозинофильный колит целесообразно делать мазки из участков слизи, смешанной с калом, фиксировать и окрашивать их азур-эозином. В таких препаратах с легкостью можно увидеть клеточный состав, характерный для эозинофильной реакции.

**Язвенный колит** — копрологический синдром, при котором в каловых массах, часто неоформленных, жидких, иногда с примесью гноя в обильной слизи, присутствует видимая невооруженным глазом кровь. При микроскопическом исследовании в слизи, помимо эритроцитов, обнаруживают лейкоциты, цилиндрический эпителий. А иногда в свежeweделенных теплых слизисто-гнойно-кровянистых массах среди слизи, содержащей нейтрофилы, эритроциты и цилиндрический эпителий, можно обнаружить вегетативные формы патогенных простейших *Entamoeba histolytica* или *Balantidium coli*, если колит имеет протозойную этиологию.

**Спастический колит** включает характерный для спастического кишечника внешний вид каловых масс — «овечий кал». Слизь на поверхности такого фрагментированного кала чаще всего не является патологическим продуктом воспалительного характера толстой кишки, а присоединяется к каловым массам в ректальном отделе.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3. Исследование мокроты

Мокрота — продукт патологического процесса дыхательной системы, выделяемый при кашлевом толчке.

Исследование мокроты считается лучшим скрининговым лабораторным методом в диагностике патологии дыхательной системы. Получение биоматериала неинвазивное и не имеет противопоказаний для пациента, есть возможность многократных повторных исследований, в мокроте присутствуют элементы из всех отделов легкого.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.1. Правила сбора мокроты

Перед сбором мокроты пациент должен санировать полость рта, сделать несколько умеренно глубоких вдохов и путем кашлевых толчков собрать отделяемое в чистую, плотно закрывающуюся емкость (одноразовый пластиковый контейнер). Следует избегать загрязнения мокроты слюной. Если предполагается культуральное исследование, для сбора мокроты следует использовать стерильные пластиковые контейнеры. Продолжительное хранение мокроты при комнатной температуре не должна превышать 2 ч. При невозможности доставки в указанный срок образец может храниться в холодильнике при 4–8 °C до 12 ч. Однако при хранении в холодильнике часть диагностически важных элементов также может быть утрачена в результате действия ферментов слюны. Если предполагается исследование мокроты только для выявления микобактерий туберкулеза, мокрота в контейнерах может однократно замораживаться.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.2. Макроскопическое исследование мокроты

Изучение макроскопических свойств мокроты и подготовка микропрепаратов производится в отдельном кабинете с вытяжным шкафом. Из транспортного контейнера мокроту помещают в чашку Петри и описывают биоматериал, оценивая количество, запах, цвет и характер мокроты.

**Количество мокроты.** При остром бронхите, на начальной стадии пневмонии, во время бронхоспазма выделяется в течение суток скудное количество мокроты — до 1–2 мл. При хроническом бронхите, хронической обструктивной болезни легких, туберкулезе легких выделяется до 25–100 мл мокроты. При бронхоэктатической болезни, вскрытии крупных очагов деструкции, гангрене легкого количество мокроты может достигать 2 л/сут.

**Запах** у обычной мокроты отсутствует; гнилостный неприятный запах свидетельствует о процессах распада легочной ткани.

**Цвет.** Слизистая мокрота бесцветна, примесь гноя делает мокроту мутной, белесоватой; кровь и ее дериваты окрашивают мокроту в красные и коричневые оттенки.

**Характер** мокроты оценивают по наличествующим в ней компонентам.

**Слизистая** мокрота — результат повышенной секреции слизи эпителием дыхательных путей под влиянием различных раздражителей. Эта мокрота бесцветная, вязкой консистенции и содержит небольшое количество клеточных элементов. Выделяется при хроническом воспалении верхних дыхательных путей, у курильщиков, при астматических приступах, коклюше и остром бронхите. При инфильтративной и очаговой форме туберкулеза легких мокрота может быть только слизистой.

**Слизисто-гнойная** мокрота — однородная мутная и вязкая масса, слизь и гной перемешаны, характерна для заболеваний бронхов и паренхимы легких.

**Гнойно-слизистая** мокрота неоднородна. Она состоит из слизи, в которой располагаются гнойные комочки округлой формы. Характерна для заболеваний верхних дыхательных путей. На фоне слизи могут определяться беловато-серые или кровянистые прожилки, что встречается при раке легкого.

**Гнойная** мокрота — полужидкая или жидкая, в большом количестве характерна для фиброзно-кавернозной формы туберкулеза. Большое количество гнойной, зеленоватой мокроты с гнилостным запахом выделяется при абсцессе легкого.

**Кровавая** мокрота наблюдается при деструкции кровеносных сосудов в очагах в результате распада или расплавления тканей. Алый цвет мокроты может быть при туберкулезе легких, актиномикозе, гангрене легкого, бронхоэктазах, новообразованиях, ранениях легкого. Ржавый цвет мокроты свидетельствует о длительном диапедезе эритроцитов, характерна для крупозной пневмонии.

**Слизисто-кровянистая** мокрота встречается при инфаркте легкого в стадии обратного развития, при воспалении верхних дыхательных путей.

**Слизисто-гнойно-кровянистая** мокрота выделяется при туберкулезе, тяжелых застойных воспалительных процессах дыхательных путей, злокачественных новообразованиях, актиномикозе, парагонимозе (дистоматозе), бронхоэктазах. Примесь крови в слизисто-гнойной мокроте может быть представлена в виде мелких прожилок и тяжей.

**Пенистая** мокрота похожа на слюну, характерна для аденоматоза легких.

**Серозная** мокрота чаще бесцветная, пенистая, жидкая, невязкая, но клейкая и довольно прозрачная. Отличительный признак серозной мокроты — большое содержание белка. Такая мокрота характерна для отека легких.

В процессе оценки характера мокроты лаборант выбирает из доставленной мокроты отдельные небольшие фрагменты, помещает их на предметное стекло и закрывает покровным. Поскольку клеточные и неклеточные элементы в мокроте всегда распределяются неравномерно, необходимо исследовать несколько (не менее двух) нативных комплексных препаратов, приготовленных из всех составных частей биоматериала. Если приготовление комплексных нативных препаратов вызывает трудности, следует приготовить нативные препараты из каждой составной части мокроты. Из нативного препарата готовят препарат для окраски азур-эозином и по Цилю–Нильсену.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.3. Микроскопическое исследование мокроты

#### **Клеточные элементы мокроты**

**Альвеолярные макрофаги** — клетки, всегда присутствующие в отделяемом дыхательных путей, их наличие указывает на адекватность сбора мокроты. Альвеолярные макрофаги — это тканевые клетки (гистиоциты), выполняющие фагоцитарную, секреторную, антигенпредставляющую функции. Они располагаются в слизи разрозненно или небольшими группами и скоплениями, характеризуются полиморфизмом величины, формы клеток и количеством ядер. Диаметр клеток колеблется от 18 до 40 мкм, количество ядер — от 1 до 4 и более. Ядра всегда небольшие, в то время как цитоплазма клеток обильная. Форма альвеолярных макрофагов в слизистой мокроте обусловлена плотностью слизи, в жидкой серозной мокроте они имеют круглую форму.

**Клетки курильщика, или пылевые клетки,** — альвеолярные макрофаги, фагоцитирующие пыль, сажу, краску и др. Включения видны в цитоплазме в нативном препарате в виде цветных гранул разных размеров.

**Альвеолярные макрофаги с миелином** располагаются в нативных препаратах на фоне дорожек из миелина, имеют белую окраску, а цитоплазма их плотно заполнена слабо поблескивающими каплями миелина. Характерны для хронических бронхитов.

**Липофаги** — альвеолярные макрофаги с каплями жира или **ксантомные** клетки из очага жировой дегенерации ткани легкого. Цитоплазма заполнена каплями жира, их обозначают как жировые, или зернистые, шары, характерны для хронического воспаления или злокачественного новообразования.

**Альвеолярные макрофаги с гемосидерином, сидерофаги, или клетки «сердечных пороков»,** содержат в цитоплазме аморфные кристаллы гемосидерина золотисто-желтого или коричневатого цвета. В окрашенных азур-эозином препаратах кристаллы гемосидерина имеют черный или черно-синий цвет. Гемосидерин образуется из Нб-фагоцитированных макрофагами эритроцитов. Сидерофаги характерны для застоя в малом круге кровообращения, инфаркта легкого, легочных кровотечений.

**Нейтрофилы** всегда содержатся в мокроте в большем или меньшем количестве. Чем больше гноя в мокроте, тем больше нейтрофилов. При воспалительных неспецифических процессах нейтрофилы в густом по консистенции гное выглядят как бесцветные, мелкозернистые, четко контурированные объемные клетки с некоторым блеском. В жидкой серозной мокроте нейтрофилы — крупные клетки (в 2,5 раза больше эритроцита) с хорошо определяемыми фрагментированными ядрами.

**Эозинофилы** — клетки размером 10–12 мкм. Ядро обычно состоит из двух сегментов. При большом увеличении в их цитоплазме видна желтоватая равномерная сферическая зернистость. Идентифицировать эозинофилы и другие

лейкоциты можно в препаратах, окрашенных азур-эозином.

Эозинофилы обнаруживаются в мокроте при аллергическом компоненте воспалительной реакции, при эозинофильных альвеолитах, лекарственных пневмонитах, грибковых поражениях легких (аллергический бронхолегочный аспергиллез), поражениях легких простейшими и гельминтами, при злокачественных новообразованиях легких, ингаляции токсинов.

*Лимфоциты* в большом количестве появляются при иммунологической реактивности организма при туберкулезе, саркоидозе, экзогенном аллергическом альвеолите, парагонимозе, аскаридозе, амёбной пневмонии.

*Тучные клетки*, или тканевые базофилы, — клетки размером 10–15 мкм. Ядро занимает бо́льшую часть клетки и практически неразлично под полиморфной зернистостью темно-фиолетового цвета. Базофилы участвуют в аллергических реакциях, их количество резко увеличивается в мокроте и в бронхолегочном лаваже (БАЛ) у больных аллергическим альвеолитом.

*Моноциты* — клетки с диаметром 14–20 мкм, ядром бобовидной формы или многолопастной и относительно обильной серо-голубой цитоплазмой с пылевидной азурофильной зернистостью и вакуолями. Моноцит, попав в ткань легких, в зависимости от микроокружения трансформируется в макрофаг с преобладанием той или иной функциональной активности.

*Цилиндрический реснитчатый эпителий* выстилает слизистую оболочку носовых путей, гортани, трахеи, бронхов и бронхиол. Клетки цилиндрического реснитчатого эпителия обнаруживаются в препаратах мокроты, приготовленных из белесоватых тяжей, нитей и пленок, лежащих на фоне слизи и представляющих собой отторгнутые при кашлевых толчках участки воспаленной гипертрофированной слизистой оболочки дыхательных путей. Клетки цилиндрического реснитчатого эпителия располагаются в мокроте неравномерно, группами, в виде скоплений разных размеров. Иногда пласты цилиндрического эпителия образуют при движении по бронхам плотные клеточные структуры округлой формы с четкими контурами, по краям которых видны реснички, — тельца Креола.

*Альвеолярный эпителий* в мокроте не обнаруживается. Этот эпителий может быть обнаружен только в материале БАЛ. Усиленное отторжение альвеоцитов характерно для идиопатического легочного фиброза.

#### **Неклеточные элементы мокроты**

*Эластические волокна* — это фрагменты соединительной ткани подслизистого слоя, являющейся составной частью паренхимы легких. Разрушение этого слоя происходит в результате длительного альтеративного воспаления, часто — специфического характера, при туберкулезе, абсцессах, гангрене, абсцедирующей пневмонии, актиномикозе, раке.

### **Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов**

*Неизменные эластические волокна* имеют вид извитых тонких блестящих волокон равномерной толщины, напоминают тонкие ветки дерева, складываются в пучки, при выраженном распаде сохраняют строение альвеол. Располагаются на фоне полуразрушенных лейкоцитов или детрита. Эластические волокна идентифицируются в препаратах из плотных гнойных частиц или белесоватых крупинок на фоне гноя, представляющих собой некротические массы.

*Коралловидные волокна* — резко преломляющие свет ветвящиеся образования, состоящие из эластических волокон с наслоениями кристаллов жирных кислот и солей жирных кислот, которые образуются из разрушающихся клеток в отграниченном от здоровой ткани очаге хронического специфического воспаления (гранулема), в очаге распада, в туберкулезной каверне.

*Обызвествленные эластические волокна* — грубые, хрупкие, пропитаны солями извести, состоящие из резко преломляющих свет палочек. Обнаруживаются в нативных препаратах мокроты при распаде первичного туберкулезного очага Гона, при абсцессе и гангрене легкого, злокачественных новообразованиях легких. Элементы распада петрифицированного очага называются тетрадой Эрлиха: обызвествленные эластические волокна, обызвествленный детрит, кристаллы ХС, микобактерии туберкулеза.

*Спирали Куршмана* — плотная слизь в виде осевого цилиндра, окруженная рыхлой слизью, называемой мантией. Центральная часть — осевой цилиндр — резко преломляет свет, напоминает объемную нить или спираль. Спираль Куршмана формируется при кашле, во время движения осевого цилиндра по бронхиальному дереву, когда он окутывается рыхлой слизью (мантией). Спирали Куршмана, образовавшиеся в крупных бронхах, могут иметь очень большие размеры, на малом увеличении занимать несколько полей зрения. Очень маленькие, короткие спирали Куршмана, представленные только осевыми цилиндрами, образуются в мелких бронхиолах. Спирали Куршмана встречаются при бронхиальной астме, туберкулезе, злокачественных новообразованиях легких, при воспалительных процессах.

*Кристаллы Шарко–Лейдена* имеют вид вытянутых в длину ромбов различных размеров. Они образуются из содержимого гранул разрушенных эозинофилов — белка галектина-10. Обнаруживаются в препаратах мокроты, приготовленных из плотных комочков, цилиндрических или ветвящихся, объемных образований из мелких бронхов. *Кристаллы гематоидина* образуются в глубине гематом и обширных кровоизлияний, очагах распада злокачественных новообразований, некротизированной ткани легкого, имеют форму вытянутого ромба или игл, лежащих разрозненно или небольшими пучками.

*Кристаллы ХС* — бесцветные тонкие пластинки четырехугольной формы с «обломанным» в виде ступени углом, образуются в полостях, возникших при распаде легочной ткани, в очагах жировой дегенерации легочной ткани, при злокачественных новообразованиях, абсцессе легкого.

*Пробки Дитриха* располагаются в нижнем гнойном слое мокроты, образовавшейся в полостях при абсцессе легкого и бронхоэктатической болезни, представляют собой детрит, нафаршированный макрофагами, содержащий жирные кислоты в виде игл или капель.

**Миелин** — часто обнаруживаемый в мокроте конечный продукт аутолиза клеток и слизи, состоящий из фосфолипидов. Миелин, как и альвеолярные макрофаги, — неотъемлемая часть слизистой мокроты. Миелиновые образования в слизистой мокроте или слизистой части гнойно-слизистой мокроты располагаются свободно или являются фоном для альвеолярных макрофагов, которые их фагоцитируют. Миелиновые образования имеют нежный контур, иногда концентрическую исчерченность, овальную, круглую, каплевидную или почкообразную форму и различные размеры.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.4. Простейшие в мокроте

*Trichomonas tenax* или *buccalis* обнаруживаются в теплой гнойной мокроте или в смывах из бронхов при хронических необструктивных бронхитах с аллергическими реакциями. Простейшее имеет размер 4–13 мкм в длину и 2–9 мкм в ширину, колонизирует тонзиллярные крипты, вызывая хронический тонзиллит. Аспирация трихомонад может привести к развитию инфекции бронхов и/или легочной ткани. Заболевание протекает как хроническая рецидивирующая или абсцедирующая эозинофильная пневмония. Мокрота обычно гнойно-слизистая, вязкая. При микроскопическом исследовании в нативных препаратах содержится большое количество эозинофилов, кристаллов Шарко–Лейдена, спиралей Куршмана, на фоне которых обнаруживаются активно подвижные трофозоиты. *Entamoeba histolytica* — трофозоит, имеет размер 25–60 мкм, обнаруживается в теплой кровянистой мокроте при амебиазе легких. Это крупные тканевые амебы, попадают в легкие гематогенным путем из кишечника больного амебиазом. В нативном препарате можно обнаружить эритрофаг — активно подвижную, бесцветную, слегка преломляющую свет амебу. Внутренний слой цитоплазмы зернистый, содержит эритроциты и одно ядро. Наружный слой плотный, однородный, хорошо заметен при образовании псевдоподий. *Pneumocystis carinii* — пневмоцисты, которые повреждают интерстициальную выстилку легких механически, затем развивается инфильтрация стенок альвеол моноцитами, а интерстициальной ткани — плазматическими клетками (ПК). Это увеличивает толщину альвеол в 5–20 раз. *P. carinii* повреждают сурфактант, что приводит к ослаблению растяжимости альвеол при дыхании. Почти полностью исчезают фосфолипиды сурфактанта, увеличивается содержание белков, что приводит к тяжелой гипоксии и нарастающей дыхательной недостаточности. Мокрота у больных пневмоцистной пневмонией может быть пенная, вязко-слизистая, гнойно-слизистая. Пневмоцисты в нативных препаратах мокроты обнаружить невозможно, поэтому исследование окрашенных азур-эозином препаратов мокроты имеет большое значение при диагностике специфических интерстициальных пневмоний у иммунокомпрометированных пациентов.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.5. Грибковые заболевания легких

Грибковые заболевания легких часто связаны с применением лучевой, иммунодепрессантной химиотерапии. Многие возбудители грибковых заболеваний хорошо различимы в нативных и в окрашенных азур-эозином препаратах, что позволяет по их морфологическим особенностям верифицировать диагноз.

**Актиномикоз легких** протекает с характерным образованием гнойных инфильтратов, извитых свищевых ходов, вскрывающихся наружу. Отделяемое вскрывшихся инфильтратов имеет гнойно-кровянистый характер с примесью мелких желтоватых крупинок (друз). В препаратах, приготовленных из друз, можно обнаружить сплетение тонких, ветвящихся, несептированных нитей мицелия длиной 200–300 мкм, расположенных на фоне лейкоцитов, альвеолярных макрофагов, ксантомных клеток и небольшого количества эритроцитов. На радиально расположенных концах мицелия находятся колонии колбообразных вздутий. Решающее значение в диагностике актиномикоза принадлежит микробиологическому анализу.

**Аспергиллез.** *Aspergillus fumigatus* часто поражает легкие. Прорастание конидиев (спор) *Aspergillus* в нижних дыхательных путях у лиц с atopической предрасположенностью к развитию аллергических реакций, у больных с иммунодефицитом или с выраженной нейтропенией может привести к колонизации слизистой, к ограниченной или обширной инвазии, тяжелым деструктивным процессам. У больных с хронической обструктивной легочной болезнью и у курильщиков бронхолегочная колонизация проявляется кашлем с выделением мокроты со слизистыми пробками, содержащими конидии и мицелий гриба. В мокроте или материале, полученном при бронхоскопии, обнаруживают характерные сплетения толстых, до 5 мкм, равномерно септированных гифов, ветвящихся под углом 45°, иногда шаровидную щеткообразную корону из коротких цилиндрических клеток стеригм (конидиеносцев), на которых располагаются цепочки ярко пигментированных звездчатых округлых конидий-спор. При аспергиллезе часто развивается плоскоклеточная метаплазия цилиндрического эпителия с признаками тяжелой атипии, что требует дифференциации с плоскоклеточным раком легкого. Для диагностики аспергиллеза применяется ПЦР.

**Кандидоз.** *Candida albicans* в большинстве случаев выступает в роли сапрофита, но у тяжелых больных с резко сниженным иммунитетом может вызвать абсцедирующую пневмонию. В нативных и окрашенных азур-эозином препаратах мокроты обнаруживаются двухконтурные мелкие округлой и овально-удлиненной формы почкующиеся клетки размером 2–4 мкм. Нити псевдомицелия одноконтурные и лишены перегородок.

**Криптококкоз** вызывает *Cryptococcus neoformans*, он может поражать людей без иммунодефицита. Заражение происходит при вдыхании пыли с мелкими спорами гриба, лишенными капсулы; проявляется слабостью, недомоганием, потливостью, кашлем со слизистой мокротой. При микроскопии в окрашенных азур-эозином препаратах мокроты обнаруживаются круглые, дрожжевидные почкующиеся клетки размером 4–8 мкм с толстыми бесцветными стенками — это полисахаридная капсула. Для *Cryptococcus* характерно наличие полисахаридной капсулы и отсутствие мицелия. Тяжелые диссеминированные формы криптококкоза встречаются у больных с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), у больных, получающих лечение глюкокортикоидами и цитостатиками.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.3.6. Бактериальные заболевания легких

**Пневмонии** разделяют на внебольничные, внутрибольничные (госпитальные), аспирационные и пневмонии у больных с синдромом иммунодефицита. Внебольничные пневмонии обычно вызывают пневмококки, реже — гемофильная палочка (*Haemophilus influenzae*), микоплазма (*Mycoplasma pneumoniae*), хламидии. Внутрибольничные (госпитальные) пневмонии вызываются палочкой Фридлендера (*Klebsiella pneumoniae*), пневмококками (диплококк Френкеля), золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*), синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*). Роль точной идентификации возбудителя пневмонии принадлежит микробиологическим исследованиям и ПЦР, но уже на начальных этапах диагностики заболевания исследование окрашенных азур-эозином и по Граму препаратов мокроты позволяет сузить диапазон диагностического поиска, опираясь на характерную морфологию микроорганизмов.

Грамположительный пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*, или *Pneumococcus*, или диплококк Френкеля) — диплококк ланцетовидной формы, возбудитель очаговой и крупозной пневмонии. Он состоит из двух кокков, обращенных друг к другу тупыми концами. Их свободные концы заострены или вытянуты. Могут встречаться диплококки, состоящие из двух овальных или круглых кокков. Каждую пару кокков окружает бесцветная капсула. Пневмония, вызванная грамотрицательной палочкой Фридлендера (*Klebsiella pneumoniae*), возникает у ослабленных больных, протекает тяжело, с образованием абсцесса и/или гнойного плеврита, плохо поддается антибактериальной терапии. Мокрота при этой пневмонии обычно слизисто-гнойная, иногда с примесью крови. Внутри плотных червеобразных фрагментов слизи в бесцветных полисахаридных капсулах видны короткие прямые толстые палочки с округлыми и слегка утолщенными концами, располагающиеся поодиночке или парами.

Всем госпитализированным пациентам, выделяющим мокроту, рекомендуются бактериоскопия и культуральное исследование мокроты. Выявление большого количества грамположительных или грамотрицательных микроорганизмов с типичной морфологией (ланцетовидных грамположительных диплококков — *S. pneumoniae*; слабоокрашенных грамотрицательных коккобацилл — *H. influenzae* и т.п.) может служить ориентиром для антибактериальной терапии.

Особое место занимает диагностика микобактериальной инфекции. Любая мокрота, полученная от пациента стационара, должна исследоваться на наличие кислотоустойчивых микобактерий. При подозрении на туберкулез, даже если рентгенологические изменения не выявлены, такое исследование должно быть трехкратным.

**Туберкулез.** *Mycobacterium tuberculosis* — возбудитель туберкулеза характеризуется длинным циклом деления (18–24 ч), что обуславливает его медленный рост на питательных средах. Бактерии не образуют спор и капсул, не выделяют экзотоксинов, неподвижны, обладают чрезвычайной устойчивостью к внешним воздействиям, благодаря гидрофобной клеточной стене с фрагментами миколовых кислот — кислотоустойчивостью. Эта особенность используется практически при всех методах выявления и идентификации, в частности при окраске по Цилю–Нильсену. Микобактерии туберкулеза, или кислотоустойчивые микобактерии, в препаратах, окрашенных по Цилю–Нильсену, — ярко-малиновые или красные, тонкие, слегка изогнутые, с утолщениями на концах, зернистые бациллы. Характерной особенностью возбудителя является резко выраженный полиморфизм. Метод бактериоскопии кислотоустойчивых микобактерий обладает относительно невысокой чувствительностью (не более 50% впервые выявленных пациентов с туберкулезом легких), он не позволяет дифференцировать *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулезных микобактерий, в связи с чем в качестве основных подтверждающих диагностических методов используются микробиологические и ПЦР-методы. Бактериоскопический метод сохраняет актуальность ввиду простоты, скорости и дешевизны исследования. Эти методы рекомендуются для использования в общей лечебной сети, так как с их помощью выявляют бактериовыделителей.

При исследовании нативных препаратов необходимо обращать внимание на наличие плотных фрагментов мокроты с полуразрушенными нейтрофилами, эластических волокон и детрита. При их обнаружении надо готовить препараты для окраски по Цилю–Нильсену именно из тех участков мокроты, откуда были получены эти патогномичные для распада элементы. Приоритетным исследованием у пациентов с установленным диагнозом туберкулеза является определение мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, методом ПЦР.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.4. Исследование спинномозговой жидкости

Ликвор обеспечивает механическую защиту, регулирует внутричерепное давление, поддерживает осмотическое давление в клетках мозга и оболочках, выполняет транспортную и респираторную функции. Головной мозг не имеет лимфатической системы, продукты его метаболизма удаляются двумя путями: через капиллярный кровоток и через спинномозговую жидкость (СМЖ), из которой продукты обмена выводятся через сосудистые сплетения и арахноидальные ворсинки. СМЖ образуется преимущественно ультрафильтрацией плазмы крови и секреции некоторых компонентов в сосудистых сплетениях головного мозга. Ограниченная проницаемость сосудистых сплетений и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) поддерживает нормальный гомеостаз и состав ликвора. Основными функциональными и анатомическими элементами ГЭБ являются эндотелиоциты капилляров головного мозга, астроциты, нейроны и перicytes, представляющие собой *нейроваскулярную единицу*, которая обеспечивает двунаправленный селективный обмен различных молекул между кровью, ликвором и мозгом.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.4.1. Правила получения спинномозговой жидкости

Для получения СМЖ применяют люмбальную пункцию, в исключительных ситуациях — субокципитальную пункцию. Первые 3–5 капель СМЖ сбрасываются, что позволяет освободиться от примеси «путевой» крови, после чего собирают по 2–3 мл ликвора в две или три пробирки в зависимости от количества назначаемых исследований. Направление к биоматериалу должно содержать информацию о времени пункции, клиническом диагнозе и перечень необходимых исследований. С помощью люмбальной пункции у взрослого человека можно без осложнений получить 8–10 мл СМЖ, у детей, включая детей младшего возраста, — 5–7 мл, у грудных детей — 2–3 мл. СМЖ доставляют в КДЛ немедленно.

Клинико-биохимическое исследование СМЖ (физические свойства, белок, глюкоза, ликворограмма) должно выполняться в режиме *cito!* Оптимально исследовать ликвор в течение первых 30 мин и не позднее 60 мин после получения, так как клетки СМЖ *in vitro* быстро разрушаются. Минимальный стандартный комплекс анализа СМЖ включает определение физических свойств (цвет, прозрачность), уровня общего белка и глюкозы, цитоza и клеточного состава.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.4.2. Физико-биохимические характеристики ликвора

**Прозрачность и цвет.** Нормальная СМЖ прозрачна и бесцветна, как дистиллированная вода. Помутнение СМЖ зависит от существенного увеличения количества клеточных элементов, бактериальной или грибковой флоры и редко — от значительного уровня белка. Помутнение, вызванное клетками и грибами, уменьшается или исчезает после центрифугирования. Помутнение, обусловленное бактериями, после центрифугирования сохраняется. При повышении содержания фибриногена возникает легкая опалесценция. Изменение цвета может быть связано с присутствием элементов крови, дериватов Hb и лекарственных веществ, вводимых интратекально.

**Эритроцитария.** Присутствие крови в СМЖ можно обнаружить макро- и микроскопически. Различают «путевую» эритроцитарию (артефактную) и истинную эритроцитарию. Сбор СМЖ в три пробирки в большинстве случаев позволяет выявить артефактную эритроцитарию по уменьшению интенсивности окраски ликвора от первой к третьей пробирке (табл. 3.7). При субарахноидальном кровоизлиянии все три пробирки СМЖ будут окрашены кровью с одинаковой интенсивностью. Истинная эритроцитария возникает при кровоизлияниях в ликворные пространства, при геморрагическом инсульте, разрыве аневризмы, опухолях головного мозга, черепно-мозговых травмах (ЧМТ), геморрагическом энцефалите. Субарахноидальное кровоизлияние может быть без повреждения кровеносных сосудов в результате диапедеза эритроцитов.

**Таблица 3.7.** Критерии отличия истинной эритроцитарии от «путевой»

Истинная эритроцитария	«Путевая» эритроцитария
Все три порции ликвора при сборе в три пробирки окрашены кровью одинаково	Первая порция ликвора кровавая, остальные окрашены менее интенсивно
Эритроциты в кровянистом ликворе оседают медленно (после 2 ч)	Эритроциты в ликворе, окрашенном кровью, оседают в течение 15–20 мин
После центрифугирования кровянистого ликвора надосадочный ликвор розовый, оранжевый или желтый (ксантохромия)	После центрифугирования надосадочный ликвор бесцветный
Реакция супернатанта после центрифугирования на кровь и билирубин положительная (используются тест-полоски «сухая химия»)	Реакция супернатанта на кровь (Hb) положительная, а на билирубин — отрицательная (используются тест-полоски «сухая химия»)
Ликворная формула соответствует патологии ЦНС: <input type="checkbox"/> при субарахноидальном кровоизлиянии — нейтрофильный плеоцитоз и активация мононуклеолярной фагоцитарной системы; <input type="checkbox"/> при нейрорлейкемии — бласты	Ликворная формула при подсчете в камере с реактивом Самсона и в препаратах, окрашенных азу-эозином, соответствует лейкоцитарной формуле периферической крови

В динамике независимо от этиологии и степени кровоизлияния на 2-е сутки из ликвора удаляется 25–50%, на 3–4-е сутки — 52–97% эритроцитов по отношению к количеству, обнаруженному в первый день заболевания. Оставшаяся часть крови в ликворных пространствах удаляется в разные сроки. Эритроциты исчезают из ликвора при легкой ЧМТ и исключении кровотечения на 5–10-е сутки, при геморрагическом инсульте и ЧМТ — на 10–20-е сутки, при разрыве аневризмы сосуда мозга — через 40–80 дней, что связано с последующим диапедезом эритроцитов из измененных сосудов мозга. Элиминация эритроцитов происходит двумя путями: миграцией их в субдуральное пространство, а затем непосредственно в кровоток и за счет фагоцитоза эритроцитов клетками арахноэндотелия и макрофагами (гистиоцитами). Эритроциты, захваченные клетками арахноэндотелия и макрофагами, разрушаются, и под воздействием гемоксидазы происходит внутриклеточное образование билирубина, который вновь поступает в ликвор, придавая ему различные оттенки желтого цвета.

**Ксантохромия** — розовая, оранжевая, желтая или бурая окраска ликвора, обусловленная Hb и билирубином.

**Гемоглобинария** — розовая окраска, билирубинария — желтая окраска. В результате попадания эритроцитов ликвор вначале окрашен в розовые оттенки, затем окраска последовательно меняется на оранжевую и желтую: происходит образование билирубина из Hb лизированных эритроцитов. Билирубин в сочетании с Hb определяется в ликворе уже через 2 ч от момента кровоизлияния у 70% больных, через 6 ч — у 90% больных и через 12 ч — у 100% больных. Через 12 ч от момента кровоизлияния в ликворе будет преобладать билирубин, реакция на Hb слабopоложительная.

Помимо билирубина в большом количестве, могут образовываться другие дериваты Hb — метгемоглобин и метальбумин, придающие ликвору темно-коричневую или желто-коричневую окраску. Такой цвет СМЖ часто наблюдается при инкапсулированных гематомах и геморрагиях.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

При геморрагическом инсульте, разрыве аневризмы сосуда мозга или ЧМТ с массивным кровоизлиянием билирубинария появляется в первые сутки, при субарахноидальном кровоизлиянии ее интенсивность нарастает обычно на 2–4-е сутки. Снижение интенсивности билирубинарии и ее исчезновение находятся в прямой зависимости от этиологии кровоизлияния.

*Застойная ксантохромия* встречается при васкуляризованных опухолях ЦНС, непосредственно сообщающихся с ликворными пространствами, при блокаде субарахноидального пространства, компрессии, менингитах (главным образом при туберкулезном) и арахноидитах. Нарушение гемодинамики приводит к увеличению проницаемости стенок сосудов и поступлению окрашенной в желтый цвет (билирубин) плазмы крови в СМЖ. Эта билирубинария постоянна, сопровождается гиперпротеинарией.

*Протеинария.* В норме содержание белка в люмбальной СМЖ составляет 0,22–0,33 г/л, желудочковой СМЖ — 0,12–0,2 г/л, цистернальной СМЖ — 0,1–0,22 г/л. Концентрация белка люмбального ликвора 0,33 г/л рассматривается как величина, граничащая с патологией. *Гипопротеинария* — снижение содержания белка в люмбальной СМЖ ниже 0,2 г/л — признак гидроцефальной СМЖ. Гипопротеинария может возникать в результате уменьшения поступления сыровоточного белка в СМЖ или усиленной реабсорбции при повышении внутричерепного давления. Описано снижение уровня общего белка у больных с доброкачественной внутричерепной гипертензией, гипертиреозом и при некоторых лейкозах. *Гиперпротеинария* — показатель патологического процесса при воспалении, травме, опухоли — зависит от нарушения гемодинамики в сосудах мозга, приводящего к увеличению проницаемости их стенок и поступлению белковых молекул из плазмы крови в ликвор. Субарахноидальные кровоизлияния различной этиологии всегда сопровождаются гиперпротеинарией. При ишемических инсультах гиперпротеинария наблюдается редко, а при геморрагических инсультах отмечается значительная гиперпротеинария. Гиперпротеинария сопровождает опухолевые процессы ткани мозга и практически все сосудистые опухоли головного и спинного мозга. Повышение уровня белка более 1 г/л характерно для гнойных менингитов и менингоэнцефалитов, абсцесса головного мозга, для паразитарных инвазий.

Основную массу общего белка СМЖ составляет *альбумин*. В нормальной СМЖ содержание альбумина варьирует от 0,07 до 0,36 г/л. Почти всякое нарушение проницаемости ГЭБ ведет к увеличению абсолютной концентрации альбумина в СМЖ и повышению отношения концентрации альбумина СМЖ и альбумина плазмы. В СМЖ присутствуют белки, являющиеся продуктом клеток ЦНС. Многие из этих белков имеют собственное диагностическое значение. *Нейронспецифическая энлаза (NSE)* в ликворе — маркер ишемических состояний, по уровню которого можно оценить риск развития осложнений при инфаркте мозга, при травматическом и гипоксическом повреждении головного мозга. *Основной белок миелина* выявляется в ликворе при травмах, опухолях, рассеянном склерозе, энцефалитах, инсультах и др. Уровень основного белка миелина в течение нескольких дней после перенесенного мозгового инсульта отражает степень повреждения миелиновых оболочек. *Белок S-100* содержится в ткани мозга, и его уровень в ликворе пропорционален объему повреждения мозговой ткани. Белки  $\alpha$ -2-*трансферрин* и  $\alpha$ -*следовой белок* являются специфическими ликворными белками и незаменимы для диагностики назальной и отоликвореи.

*Фибриновая пленка.* В норме СМЖ не содержит фибриноген. Появление в ликворе этого белка всегда указывает на повышенную проницаемость ГЭБ. Фибриновая пленка имеет вид нежной, почти невидимой сеточки, или мешочка на стенке пробирки, или желеобразного сгустка на дне пробирки. Фибриновая пленка может образоваться сразу после получения СМЖ, что указывает на спинальную блокаду в результате объемного процесса, или через 10 ч и позже, что характерно для гнойных и серозных менингитов, опухолей ЦНС, кровоизлиянии, травматической компрессии, туберкулезного поражения оболочек. С целью исключения туберкулезного процесса из образовавшейся фибринозной пленки готовят препараты для последующего окрашивания по Цилю–Нильсену для выявления микобактерий туберкулеза.

*Гликоархия.* Содержание глюкозы в СМЖ примерно на 40% меньше, чем в плазме крови. В субокципитальной и вентрикулярной СМЖ концентрация глюкозы на 12–15% выше, чем в люмбальной СМЖ. Уровень глюкозы в СМЖ — результат ее активного транспорта через ГЭБ, утилизации клетками паутинной оболочки, эпандимы, глии, нейронами и выхода в венозную систему. Глюкоза является основным энергетическим субстратом для ЦНС.

*Гипогликоархия* — уменьшение глюкозы в СМЖ ниже 2,2 ммоль/л или снижение коэффициента «глюкоза плазмы крови/глюкоза СМЖ» менее 0,3 — является характерным лабораторным маркером бактериальных и грибковых менингитов, паразитарного поражения ЦНС. При первичных и метастатических опухолях мозговых оболочек (глиомы, саркомы, лимфомы, нейролейкемии, меланомы, метастатические карциномы из легких, желудка) отмечается выраженная гипогликоархия, достигающая практически полного исчезновения глюкозы из СМЖ. Снижение глюкозы может наблюдаться при вирусных менингитах и при субарахноидальном кровоизлиянии. При сифилитических менингитах гипогликоархии не происходит.

*Гипергликоархия* встречается относительно редко и не является следствием СД. Легкое или умеренное повышение концентрации глюкозы в СМЖ наблюдается при травме головного мозга и некоторых видах менингоэнцефалита, ишемических и геморрагических инсультах.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.4.3. Цитологическое исследование спинномозговой жидкости



**Цитоз** — общее количество клеточных элементов в 1 мкл ликвора (при необходимости возможен пересчет на 1 л) и определение клеточного состава ликвора, который формирует цитоз. Для точной оценки цитоза необходимо проводить исследование пробы не позднее 30 мин после ее получения, так как из-за низкого содержания белка и относительной плотности ликвора происходит разрушение эритроцитов, лейкоцитов и тканевых клеточных элементов. Для избежания влияния на результат примеси «путевой» крови для цитологического исследования рекомендуется брать вторую или третью пробирку полученной СМЖ.

В нормальном ликворе количество клеток очень низкое (*нормоцитоз* люмбального ликвора взрослого — 3–5 клеток в 1 мкл); даже незначительное увеличение количества клеточных элементов (*плеоцитоз*) является признаком патологического процесса. Подсчет клеточных элементов проводят в большой счетной камере Фукса–Розенталя, объем которой составляет 3,2 мкл. Перед заполнением счетной камеры ликвор аккуратно перемешивают и небольшую его часть переносят в маленькую пробирку, после чего смешивают с реактивом Самсона из расчета 10 объемных частей ликвора и 1 часть реактива Самсона. Реактив Самсона благодаря уксусной кислоте лизирует эритроциты, мешающие подсчету цитоза, стабилизирует клетки (карболовая кислота) и окрашивает их (фуксин), что позволяет легче идентифицировать клетки в камере при увеличении  $\times 400$ . Расчет цитоза проводится по формуле:

$$x = \frac{A \times 11}{3,2 \times 10},$$

где А — количество клеток в камере, 11/10 — разведение ликвора реактивом Самсона, 3,2 — объем камеры Фукса–Розенталя.

Плеоцитоз считается слабым или легким, если количество клеток в люмбальном ликворе колеблется от 6 до  $70 \times 10^6/\text{л}$ , умеренным — от 70 до  $250 \times 10^6/\text{л}$ , выраженным — от 250 до  $1000 \times 10^6/\text{л}$ , резко выраженным — более  $1000 \times 10^6/\text{л}$ , массивным — более  $10 \times 10^9/\text{л}$ . Примерный уровень плеоцитоза при заболеваниях ЦНС представлен в табл. 3.8.

**Таблица 3.8.** Плеоцитоз при заболеваниях центральной нервной системы

Заболевания	Количество клеток в СМЖ
Острый бактериальный менингит	Более $3,0 \times 10^9/\text{л}$
Актиномикоз ЦНС	Около $3,0 \times 10^9/\text{л}$
Вирусный менингоэнцефалит (вирус Коксаки, аденовирус)	$1,0\text{--}3,0 \times 10^9/\text{л}$
Туберкулезный менингит (острая стадия)	$0,3\text{--}3,0 \times 10^9/\text{л}$
Герпетическое поражение ЦНС	Менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$
Миелит	Менее $0,15 \times 10^9/\text{л}$
Серозный менингит	$0,1\text{--}0,3 \times 10^9/\text{л}$
Абсцесс головного мозга	$1,0\text{--}2,0 \times 10^9/\text{л}$
Энцефалиты	$0,03\text{--}0,3 \times 10^9/\text{л}$
Рассеянный склероз	$3,0\text{--}50,0 \times 10^9/\text{л}$
Нейросифилис, различные формы	$0,05\text{--}0,5 \times 10^9/\text{л}$
Нейролейкемии	$0,1\text{--}5,0 \times 10^9/\text{л}$
Опухоли	$10\text{--}60 \times 10^9/\text{л}$
Эпилепсия, гидроцефалия, арахноидиты, спондилез, гиперкинетический прогрессирующий панэнцефалит, дистрофические процессы	Чаще всего нормоцитоз

Если клеточный состав ликвора представлен хорошо узнаваемыми при 400-кратном увеличении нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами, то одновременно с подсчетом цитоза проводят оценку клеточного состава — ликворограммы, оценив долевое соотношение клеток. Когда клеточный состав в препарате с реактивом Самсона оценить невозможно, для изучения клеток необходимо приготовить цитологический препарат. При резко выраженном и массивном плеоцитозе и при значительном количестве эритроцитов в нативном ликворе возможно приготовление препарата в виде мазка из центрифугата ликвора, но в большинстве случаев во избежание потери клеток при центрифугировании в пробирке необходимо выполнять седиментацию клеток непосредственно на стекло с помощью цитоцентрифуги. Высушенные и зафиксированные препараты окрашивают по методу Романовского, Май–Грюнвальда, Паппенгейма. Допустимо окрашивание монослойных препаратов экспресс-методом («Лейкодифф 200», «Дифф-квик»).

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Ликворограмма.** Все клетки СМЖ (кроме арахноэндотелиальных клеток и клеток эпендимы) имеют гематогенное происхождение. Ликворная формула здоровых людей представлена в основном лимфоцитами (70%) и моноцитами (30%). Клетки, попавшие в ликворные пространства в результате патологического процесса, циркулируют от 1–2 ч до нескольких дней. Они подвергаются интратекальному лизису (это превалирующий путь элиминации эритроцитов и гранулоцитов) или фагоцитозу (преимущественно — эритроциты) либо мигрируют обратно в кровь и лимфу

(лимфоциты). В процессе нарастания и последующего снижения активности воспалительной реакции происходит изменение клеточного состава СМЖ. В типичных случаях можно наблюдать три фазы реакции: нейтрофильную (от нескольких часов); фагоцитарную (несколько дней); лимфоцитарную (до нескольких месяцев). Закономерная смена одной клеточной реакции другой прослеживается при бактериальном и туберкулезном менингите, вирусных энцефалитах. Нейтрофильная стадия сопровождается увеличением проницаемости ГЭБ, в результате в ликворе регистрируется гиперпротеинария. Через некоторое время нейтрофилы постепенно сменяются моноцитами/макрофагами, а гиперпротеинария уменьшается. Фагоцитоз заканчивается разрушением клеточных элементов и бактерий, обнаружение в ликворе макрофагов со специфическими включениями указывает на этиологию патологического процесса. В ликворную формулу, помимо лейкоцитов и клеток оболочек, входят также клетки опухолей, если они лежат разрозненно, а не в виде фрагментов ткани, и, следовательно, отражены в общем цитозе. Любые клеточные элементы, которые при подсчете ликворограммы отнесены к «атипичным клеткам», требуют их морфологического описания, а в случае нейтролейкемии клетки могут быть идентифицированы как бласты. Нормоцитоз не исключает патологического процесса в ЦНС.

*Лимфоциты*, обнаруживаемые в СМЖ, выглядят так же, как и в мазках периферической крови, представлены популяцией малых лимфоцитов. Изредка в СМЖ обнаруживаются единичные лимфоциты несколько бо́льших размеров (10–12 мкм), ядра которых окружены широким ободком цитоплазмы светло- или темно-синих тонов. При патологических процессах в ЦНС, сопровождающихся лимфоцитарными плеоцитозами реактивного характера, лимфоциты полиморфны, много реактивных лимфоцитов с обильной цитоплазмой, иногда встречаются большие гранулярные лимфоциты (БГЛ), лимфоциты с выраженной базофилией цитоплазмы. Активация лимфоцитов возникает на фоне бактериальной, вирусной и паразитарной инфекции, при кровоизлияниях и новообразованиях. Резко выраженный лимфоцитарный плеоцитоз (более 85% лейкоцитов) наблюдается при вирусных менингитах. При хронических воспалительных процессах мозговых оболочек (туберкулезный менингит, цистицеркозный арахноидит) количество гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов увеличивается пропорционально. Нерезко повышается количество лимфоцитов при опухолях. В результате инфильтрации мозговых оболочек опухолевыми лимфоцитарными элементами при лимфопрлиферативных заболеваниях в ликворе обнаруживаются клетки, морфологически сходные с циркулирующими в кровеносном русле.

*Моноциты* — вторая основная популяция клеток в нормальной СМЖ, дополняющая нормальный цитоз, — ничем морфологически не отличаются от моноцитов периферической крови. В отличие от макрофагов они не содержат в вакуолях фагоцитированные элементы. Увеличение количества моноцитов в ликворной формуле наблюдается при хронических вялотекущих воспалительных процессах в ЦНС — туберкулезном менингите, цистицеркозе, нейросифилисе, вирусном менингите, рассеянном склерозе, гиперкинетическом прогрессирующем панэнцефалите, ишемических заболеваниях и опухолях головного мозга. Обнаружение моноцитов в сочетании с ПК и полным отсутствием макрофагов в СМЖ после оперативного вмешательства на головном или спинном мозге свидетельствует о вялотекущем заживлении послеоперационной раны. Моноцитарная реакция, как правило, неспецифична, обнаруживается как часть смешанной клеточной реакции на воспаление, сопровождающей увеличение количества нейтрофилов, лимфоцитов и ПК.

*Макрофаги* ликвора относятся к группе нефиксированных макрофагов, в норме в СМЖ не встречаются. Макрофаги — крупные клетки, обычно овальной или правильной круглой формы, диаметром от 7 до 30 мкм. Ядро округлой формы, занимает меньшую часть клетки и сдвинуто к периферии, пикнотичное, в цитоплазме клеток содержатся многочисленные вакуоли и различные фагоцитированные частицы — клетки и фрагменты клеток, бактерии, кристаллы, капли жира. Макрофаги всегда обнаруживаются в СМЖ больных с опухолями головного мозга, растущими в просвет желудочков мозга. Большое количество макрофагов в послеоперационный период свидетельствует об активной санации СМЖ. Среди макрофагов выделяют бактериофаги, эритрофаги, лейкофаги, макрофаги с кристаллами гемосидерина, гематоидина, липофаги. Макрофаги с кристаллами гематоидина и гемосидерина появляются в геморрагическом ликворе уже через 2–3 ч от начала кровотечения. Присутствие макрофагов с дериватами Нб в ксантохромном ликворе указывает на ранее состоявшееся кровотечение. Кристаллы гемосидерина обнаруживаются в макрофагах СМЖ на 4–5-й день после субарахноидального кровоизлияния, ЧМТ или других причин, вызвавших кровотечение в ликворные пространства. Одновременное присутствие в СМЖ эритрофагов и макрофагов с кристаллами гемосидерина указывает на продолжающееся или повторное кровоизлияние. Липофаги — макрофаги с каплями жира, или «зернистые шары», можно увидеть только в нативном препарате и препарате с реактивом Самсона. В препаратах, окрашенных азур-эозином, липофаги выглядят как обильно вакуолизированные крупные клетки с мелкими гиперхромными ядрами — капли жира растворяются во время фиксации препарата в спиртах. Липофаги обнаруживаются в патологической жидкости, полученной из мозговых кист, в СМЖ при распаде ткани головного мозга и новообразований, растущих в просвет желудочков мозга. Липофаги появляются при травматическом или ишемическом некрозе ткани головного мозга, могут сочетаться с кристаллами ХС, которые образуются в очагах жировой дистрофии, участках некроза ткани и в кистах головного мозга.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Нейтрофилы* присутствуют в любом патологическом ликворе, а в острый период воспалительной реакции могут составлять все 100% ликворной формулы. Вследствие низкого содержания белка в СМЖ нейтрофилы быстро разрушаются. Цитоплазма нейтрофилов очень быстро подвергается жировой дистрофии, уже через 3–4 ч при хранении образца СМЖ при комнатной температуре в ней обнаруживаются мелкие капли жира. Нейтрофильный плеоцитоз характерен для острой экссудативной фазы бактериального менингита, острой фазы туберкулезного менингита. При вирусных менингитах нейтрофильная фаза кратковременна, выражена слабо и быстро сменяется лимфоцитарным плеоцитозом. Нейтрофильный плеоцитоз характерен для абсцессов головного мозга, микозов, нейросифилиса, ранних

этапов развития субарахноидальной гематомы и субарахноидального кровоизлияния, а также для ишемического и геморрагического инсульта.

*Эозинофилы* в норме в СМЖ не встречаются. Их появление расценивается как реакция сосудов соединительной ткани субарахноидального пространства на чужеродные белки. Эозинофилы в СМЖ фагоцитируют бактерии, споры грибов и комплексы «антиген–антитело», особенно с Ig и компонентами комплемента. При цистицеркозе и эхинококкозе ЦНС наблюдается выраженная эозинофилия, достигающая 40% и более. Эозинофилы в СМЖ обнаруживаются при эозинофильном менингите, аскаридозе, туберкулезном и лимфоцитарном менингите, некоторых опухолях ЦНС, при субарахноидальных кровоизлияниях, токсических, реактивных, сифилитических менингитах, при кистах головного мозга.

*Базофилы* в нормальном ликворе отсутствуют. Их основные функции — синтез и выделение биологически активных веществ — гистамина, гепарина и, вероятно, серотонина. Они участвуют в реализации аллергических реакций, обнаруживаются в ликворе в сочетании с эозинофилами при тяжело протекающих нейроинфекциях, особенно у детей. *ПК* встречаются в СМЖ при длительных вялотекущих воспалительных процессах головного мозга и мозговых оболочек (хронические энцефалиты, менингиты различной этиологии, арахноидиты), при этом их количество в ликворной формуле может достигать 20–25%. Присутствие ПК в СМЖ характерно у больных рассеянным склерозом и гиперкинетическим прогрессирующим панэнцефалитом. При хронических формах нейросифилиса плазмцитоз сочетается с нормоцитозом или незначительным плеоцитозом. Плазмциты могут обнаруживаться при острых воспалительных процессах ЦНС, а также при некоторых опухолях головного мозга, туберкулезном менингите, саркоидозе, коллагенозах с вовлечением в процесс ЦНС, зоонозах, после кровоизлияния в ткань головного мозга. Появление ПК в СМЖ больных, перенесших операцию на головном мозге или мозговых оболочках, на фоне моноцитов и единичных макрофагов или полного их отсутствия указывает на медленное заживление послеоперационного рубца.

*Клетки арахноэндотелия.* Арахноэндотелий — однослойный эпителий эпендимального происхождения, формирующий паутинную оболочку. Паутинная оболочка, вплотную прилегающая к мягкой мозговой оболочке, формирует вместе с ней единую структуру *pia–arachnoidea* и полностью покрывает головной и спинной мозг, выполняя функцию гидравлического амортизатора. Клетки арахноэндотелия обнаруживаются в СМЖ больных с опухолью головного мозга, при ЧМТ и после операций на спинном и головном мозге, при которых происходило частичное повреждение мозговых оболочек, при частых спинномозговых пункциях как результат механической травматизации нежной тканевой структуры.

*Клетки эпендимы* в нормальном ликворе практически не встречаются. Эти клетки образуют непрерывную эпителиальную выстилку желудочков мозга — эпендиму. Их можно обнаружить в ликворе у маленьких детей, после интратекального введения лекарств и в вентрикулярном ликворе, полученном во время операции на мозге.

*Опухолевые клетки* обнаруживаются при исследовании ликвора у больных с первичными опухолями ЦНС и при метастатическом поражении ЦНС. Опухолевые клетки попадают в СМЖ в результате отторжения от ткани опухоли, прилегающей к ликворным пространствам, при прорастании опухоли головного мозга в просвет желудочков, при опухоли спинного мозга — в просвет спинномозгового канала, при метастатической инфильтрации мягкой мозговой оболочки. Опухолевые клетки в ликворе сравнительно быстро разрушаются, поэтому препараты для цитологического исследования необходимо делать в первые 30 мин после доставки ликвора в лабораторию. Выявление клеток злокачественных новообразований основывается на общепринятых цитологических признаках:

- высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение;
- неравномерная структура хроматина, гиперхромия или анизохромия;
- полиморфизм ядер, ядрышек, полинуклеолярность;
- повышенная митотическая активность;
- амитотическое деление (деление ядер без деления цитоплазмы);
- клеточный полиморфизм;
- многоядерность с выраженным анизоцитозом;
- химическая анаплазия клеточных элементов (гипер- и полихромазия);
- наличие клеточных комплексов из атипичных клеток.

Вероятность обнаружения злокачественных клеток в ликворе зависит от локализации опухоли, характера получения ликвора (пункция или интраоперационный материал), количества исследованных препаратов. Процент положительных результатов выше при исследовании вентрикулярного ликвора в послеоперационный период. Если атипичные клетки в ликворе обнаружены, в 99% случаев эта находка указывает на опухолевое поражение ЦНС. Частота обнаружения злокачественных клеток в ликворе зависит от характера опухолевого процесса: при лейкозах она достигает 70%, при метастазах — 20–60%, а при первичных опухолях мозга — 30%. При цитологическом исследовании возможны следующие заключения:

- 1) клетки злокачественного новообразования не обнаружены;
- 2) атипичная цитограмма, признаков злокачественности не обнаружено;
- 3) обнаружено много митозов и голых ядер, клеток злокачественного новообразования не обнаружено;

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

- 4) обнаружены клетки злокачественного новообразования.

Установить на основании только цитологического исследования ликвора характер и тип опухоли невозможно.

**Первичные опухоли ЦНС** — опухоли нейроэпителиального, мезодермального и эктодермального происхождения.

В СМЖ могут встречаться клетки астроцитомы, олигодендроглиомы, мультиформной спонгиобластомы

(глиобластомы), эпендимомы, медуллобластомы и арахноэндотелиомы. При невриномах и менингиомах опухолевые клетки выявляются крайне редко.

При *астроцитоме* больших полушарий в вентрикулярной СМЖ опухолевые клетки выявляются в 30% случаев. В препаратах они имеют вид единичных клеток вытянутой формы с полярно отходящими отростками базофильной цитоплазмы и овальными или округлыми центрально расположенными ядрами. Цитологическая картина различна в зависимости от степени развития астроцитомы (1-я или 2-я степень). Клетки могут располагаться одиночно или группами на фоне голых ядер этих же клеток. В клетках астроцитомы обнаруживаются крупные ядра с неправильными контурами (дискариоз), цитоплазма окрашивается базофильно (с различной интенсивностью) и может не иметь четкого контура.

При *олигодендроме* опухолевые клетки — округлой или неправильной формы, обычно одинаковых размеров (15–20 мкм). Ядра гиперхромные, иногда крупноглыбчатые, хроматин распределен гомогенно. Цитоплазма серовато-голубоватого цвета, широкой каймой окружает ядро.

При *мультиформной спонгиобластоме (глиобластоме)* на фоне эритроцитов, моноцитов, лимфоцитов обнаруживают единичные опухолевые клетки или группы клеток, полиморфных по величине и форме. Ядра с петливой структурой хроматина содержат одно или несколько ядрышек и занимают, как правило, бо́льшую часть клеток, цитоплазма широким ободком окружает ядро. Ядра клеток окрашиваются азур-эозином неравномерно, чаще встречаются гипохромные. Характерны дистрофические изменения цитоплазмы.

Для *эпендимомы* характерны опухолевые клетки примерно равной величины (12–20 мкм), вытянутой формы, с полярно отходящими отростками цитоплазмы. Ядра клеток могут располагаться центрально и эксцентрично, четко контурированы, с грубой хроматиновой структурой.

Клетки *медуллобластомы* часто выявляются в ликворе при локализации опухоли в заднечерепной ямке с прорастанием в крышу IV желудочка. Опухолевые клетки характеризуются значительным полиморфизмом размера и формы. Чаще наблюдаются клетки округлой формы, с большими округлыми гипохромными ядрами с мелкозернистой хроматиновой структурой, одним-двумя мелкими ядрышками и узким ободком базофильной цитоплазмы. В препаратах могут встречаться очень крупные многоядерные клетки, фигуры митоза. Характерно расположение злокачественных клеток в комплексах.

Для *аденомы гипофиза* характерны крупные клетки округло-овальной формы с базофильной или бледно-серой цитоплазмой. Ядра обычно округлой формы, с четкой хроматиновой структурой и несколькими ядрышками. Встречаются клетки гигантских размеров. При эозинофильной аденоме опухолевые клетки обычно небольшие с эксцентрично расположенными ядрами.

**Вторичные опухоли ЦНС** (метастатическое поражение) встречаются чаще по сравнению со злокачественными клетками при первичных опухолях. Морфологическая структура злокачественных клеток и комплексов зависит от гистогенеза первичной опухоли. Метастазируют в мозг злокачественные опухоли молочной железы (МЖ), легкого, толстой кишки, почки и меланомы.

Клетки *меланомы* в окрашенных препаратах СМЖ характеризуются различной величиной и, как правило, округлой формой. Ядра округлые, гиперхромные, хроматиновой структуры. У большинства клеток цитоплазма темно-базофильная, содержит черные гранулы меланина.

При *раке легких плоскоклеточном без ороговения* отмечается резко выраженный полиморфизм размеров клеток, встречаются гигантские клетки и клетки небольших размеров. Крупное гиперхромное ядро, содержащее единичные ядрышки, располагается центрально на фоне обильной цитоплазмы. Митозы практически не встречаются.

При *высокодифференцированном плоскоклеточном раке* (плоскоклеточном раке с ороговением) на фоне мелкозернистого детрита располагаются клетки различных размеров с цитоплазмой с признаками кератинизации. Ядра небольшие, расположены центрально, пикнотичные, гиперхромные, не содержат ядрышек. Отмечается резко выраженный полиморфизм размеров и формы клеток, встречаются безъядерные кератогиалинизированные чешуйки. При метастазировании *аденокарциномы* опухолевые клетки выявляются достаточно часто. В зависимости от степени дифференцировки клеточные элементы могут сохранять признаки железистой ткани или резко от нее отличаться. Размеры клеток иногда достигают 200 мкм в диаметре. Крупные ядра расположены эксцентрично, содержат большое количество ядрышек. Цитоплазма может содержать секрет (перстневидные клетки). При сохранении железистых структур комплексы состоят из клеток округлой формы разных размеров с выраженным полиморфизмом ядер и ядрышек.

Клетки и комплексы *низкодифференцированного мелкоклеточного рака легких* часто метастазируют по оболочкам головного мозга, могут быть обнаружены в ликворе. Клетки имеют диаметр 12–15 мкм и округлую форму. Ядра занимают практически всю клетку, они равномерно окрашенные, гиперхромные, так как тонкие нити хроматина располагаются в них очень плотно, создавая впечатление монохромности. В комплексах округлой, вытянутой формы или в виде папиллярных структур отмечается плотное прилегание клеток друг к другу с образованием фасеток.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Нейролейкемия.** У больных лейкозами при вовлечении в патологический процесс мозговых оболочек возникает лейкозный менингит. Это осложнение получило название нейролейкемии. Нейролейкемия чаще развивается при *острых лейкозах* (ОЛ). Бластные клетки могут выявляться при нормоцитозе, однако обычно количество клеток в СМЖ варьирует от 100 до  $300 \times 10^9/\text{л}$ . Морфология бластов в препаратах из СМЖ при окраске азур-эозином соответствует их морфологии в мазках периферической крови и костного мозга. На фоне лейкозных клеток в препаратах присутствуют лимфоциты, моноциты и другие клеточные элементы. При внимательном просмотре препарата можно обнаружить фигуры митоза. Лейкемизация злокачественной *миеломы* может сопровождаться развитием специфического менингоэнцефалита с появлением в СМЖ большого количества миеломных ПК.

При злокачественных неходжкинских лимфомах возможна лейкемизация опухоли с инфильтрацией *pia-arachnoidea* клетками лимфомы в 5–29% случаев. Крайне редко поражение ЦНС наблюдается у больных *хроническим лимфолейкозом* (ХЛЛ).

**Микрофлора в ликворе.** Важной частью цитологического исследования препаратов ликвора является оценка присутствующей микрофлоры. При обнаружении бактериальной флоры в препаратах, окрашенных азур-эозином, целесообразно приготовить из осадка ликвора дополнительные препараты для окрашивания по Граму. Результаты микроскопии по Граму задолго до получения результатов бактериологического исследования позволяют клиницисту выбрать эмпирический вариант антибактериальной терапии. В 80–90% случаев обнаруженные при бактериоскопическом исследовании *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus* подтверждаются бактериологическими посевами.

На фоне массивной химио- и иммуносупрессивной терапии у больных нередко развивается тяжелое осложнение — криптококковый, кокцидиоидозный, кандидамикозный или бластомикозный менингит, энцефалит или менингоэнцефалит. Менингеальные и другие клинические симптомы не позволяют дифференцировать бактериальные и грибковые поражения ЦНС, в то время как терапия этих осложнений должна начинаться как можно быстрее. Выявление в окрашенных препаратах ликвора спор грибов с характерной морфологией до получения результатов микробиологического исследования дает возможность назначить специфическую антимикотическую терапию.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.5. Исследование синовиальной жидкости

Синовиальная жидкость (СЖ) — органоспецифичная жидкость, вырабатываемая в результате ультрафильтрации плазмы и продукции клетками выстилки синовиальных оболочек сустава гиалуроновой кислоты и гликозаминогликанов. СЖ является неотъемлемым компонентом сустава и обеспечивает его морфофункциональную стабильность: выполняет метаболическую, локомоторную, трофическую и барьерную функции. Объем СЖ составляет от 0,2 до 3,5 мл в зависимости от размера и типа сустава. Она прозрачная, бледно-желтая, вязкая и с постоянным клеточным и химическим составом, содержит все компоненты плазмы крови. СЖ реагирует на структурные нарушения в суставе изменением физико-химических характеристик и клеточного состава, поэтому лабораторное исследование СЖ имеет значение в диагностике заболеваний суставов.

**Синовиальный выпот** — увеличение объема СЖ. Исследование СЖ проводится для диагностики заболеваний суставов; определения степени активности экссудативной фазы и характера воспалительного процесса в полости сустава; наблюдения за динамикой патологического процесса в полости сустава; оценке эффективности вне- и особенно внутрисуставной терапии. В практической медицине исследование СЖ часто обнаруживает типичные изменения до развернутой клинической картины заболевания.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.5.1. Правила получения синовиальной жидкости

СЖ получают с помощью пункции сустава, при необходимости — под контролем ультразвукового исследования (УЗИ). Аспират СЖ распределяют в три пробирки: 1) стерильную пробирку для микробиологического исследования (необходимо, если цитоз выше 6000/мкл); 2) пробирку с ЭДТА К<sub>3</sub> для подсчета цитоза, цитологического и бактериоскопического исследования; 3) сухую пробирку для биохимического исследования супернатанта и микроскопии нативного препарата. Осадок из пробирки № 3 может использоваться для дополнительных исследований, в частности для бактериоскопического исследования, если цитоз СЖ составляет менее 10 000 клеток в 1 мкл.

Анализ СЖ должен проводиться в кратчайшие сроки с момента ее получения. При задержке исследования более чем на 6 ч уменьшается число лейкоцитов, кристаллов, формируются новые артефактные кристаллы.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.5.2. Физико-химические свойства

Характерные изменения СЖ представлены в табл. 3.9.

**Таблица 3.9.** Характерные изменения основных показателей синовиальной жидкости при разных типах патологических процессов в суставах

Показатель	Норма	Невоспалительный тип	Воспалительный тип	Септический тип	Травматический тип
Прозрачность	Прозрачная	Прозрачная	Мутная	Мутная	Мутная
Цвет	Светло-желтый	Желтый	Желтый, зелено-серый	Серовато-желтый	Кремово-желтый
Белок, г/л	10–30	10–30	>40	30–60	20–30
Глюкоза, ммоль/л	3,3–5,3	3,3–5,3	Снижена	Снижена до 1,1–1,7	3,3–5,3
Цитоз, клеток в 1 мкл	От 20 до 300	От 200 до 1000	6000–40 000	От 60 000 до 1 млн	<2000

Нейтрофилы	<5%	<25%	75%	80–95%	25%
Бактериологический посев	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Положительный	Отрицательный
Кристаллы	Нет	Нет	Могут быть	Нет	Нет
Заболевания, при которых изменения в СЖ позволяют отнести их к одному из патологических типов	—	Остеоартроз, травма, рассекающий остеохондрит, остеохондроматоз, амилоидоз, метаболические заболевания, приводящие к остеоартрозу	Ревматоидный артрит (РА), синдром Рейтера, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит (АС), подагра и псевдоподагра, саркоидоз	Бактериальные инфекции	Травма, пигментный синовит, гемангиома, гемофилия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, опухоль
		СКВ, острый ревматизм, склеродермия			

**Цвет СЖ** при патологии изменяется в зависимости от характера суставного выпота (серозный, геморрагический, фибринозный, смешанный). Янтарно-желтый цвет характерен для вторичных синовитов. Для ревматоидного, псориатического и инфекционного артрита характерен зеленый оттенок СЖ; молочно-белый цвет и сметанообразная консистенция СЖ наблюдаются при подагре. При травматических артритах СЖ приобретает кровянистый вид разной интенсивности. Коричнево-красный цвет наблюдается при пигментированном ворсинчато-узелковом синовите, а коричневый цвет — при хронической артропатии у больных с наследственным нарушением обмена аминокислот за счет накопления гомогентизиновой кислоты. При артритах и болезни Бехтерева цвет СЖ может оставаться светло-желтым — как в норме.

**Прозрачность** — свойство нормальной СЖ. Помутнение из-за клеточных элементов отмечается при РА, псориатическом и септическом артрите, при деформирующем остеоартрозе и гонартрозе; помутнение от большого количества кристаллов характерно для подагры. Нарушение прозрачности часто связано с выпадением фибрина.

**Вязкость СЖ** зависит от pH, концентрации кристаллов, степени полимеризации гиалуроновой кислоты и интенсивности разведения ее воспалительным экссудатом. При травматических артритах и СКВ вязкость СЖ остается нормальной. При обострении РА, подагрического и псориатического артрита, болезни Рейтера, гонартрозе, деформирующем остеоартрозе, анкилозирующем спондилоартрозе, посттравматических артритах и других заболеваниях суставов вязкость снижается за счет добавления к СЖ воспалительного экссудата и нарушения образования синовиоцитами гиалуроновой кислоты и гликозаминогликанов.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

**Белок** в СЖ представлен в основном альбумином, его количество в нормальной СЖ составляет от 10 до 30 г/л.

При невоспалительном типе повреждения суставов количество общего белка практически не меняется.

При воспалительных заболеваниях суставов количество белка резко увеличивается, а при псориатическом артрите и гонартрозе может достигать 70 г/л. Прогрессирование воспалительного процесса приводит к выраженному увеличению проницаемости синовиальных оболочек и пропотеванию в СЖ фибриногена, что ведет к образованию фибриновых сгустков в полости сустава и нарушению его подвижности.

**Глюкоза** в СЖ в норме — 3,5–5,5 ммоль/л. При воспалении суставов количество глюкозы в СЖ снижается, особенно при артропатиях и значительно — при бактериальном поражении суставов — до 1,1 ммоль/л и менее. При подозрении на бактериальный артрит или при высоком цитозе глюкозу в СЖ нужно измерять сразу после ее получения.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.5.3. Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование СЖ включает ориентировочный просмотр нативного препарата для получения представления о количестве клеточных элементов, наличии кристаллов и неклеточных элементов; подсчет количества клеток в камере Горяева; исследование мазков, окрашенных азур-эозином.

Суставы редко поражаются опухолевым процессом, поэтому микроскопическое исследование в первую очередь направлено на распознавание характера клеточного и неклеточного материала, такого как кристаллы, фрагменты матрикса. Имеет значение подсчет клеток.

**Нативный препарат** готовят из пробирки без антикоагулянта. Препарат просматривают на увеличении  $\times 400$  и проводят подсчет 200 клеток, выделяя рагоциты.

**Рагоциты** — это макрофаги и нейтрофилы, содержащие в цитоплазме резко преломляющие свет гранулы, размер которых значительно крупнее мелкой внутриклеточной зернистости этих клеток. Гранулы могут быть бесцветными, зеленоватыми или черными, в зависимости от преломления проходящего через них света. Размер рагоцитов за счет включений больше, чем обычных нейтрофилов и моноцитов. Включения рагоцитов — это фагоцитированные иммунные комплексы, в состав которых входят ревматоидный фактор (РФ), Ig, фибрин и антинуклеарный фактор (АНФ). При серопозитивном РА их содержание в СЖ превышает 70% (70–95%). А при септическом артрите количество рагоцитов может превышать 95%, даже при отсутствии бактерий такое количество рагоцитов является признаком септического характера синовиального выпота.

*Кристаллические элементы* изучают в нативном препарате в проходящем свете и с использованием поляризационных фильтров. Довольно часто кристаллы настолько малы, что обнаружить их можно только при использовании иммерсионного объектива. Важное клинико-диагностическое значение имеют кристаллы урата натрия (кислый мочекислый натр), пирофосфата кальция, ХС, жирных кислот, оксалата кальция, гематоидина, цистина, Шарко–Лейдена.

Уратные кристаллы в СЖ обнаруживают при подагрическом артрите. Кристаллы пирофосфата кальция характерны для хондрокальциноза (псевдоподагры) и гипертрофического остеоартрита, а у пожилых людей появляются в СЖ при фиброзных изменениях хряща. Кристаллы гидроксиапатита обнаруживаются внутри нейтрофилов и внеклеточно, как светлые диски диаметром 2–3 мкм, — указывают на кальцификацию внутрисуставной зоны хряща или подлежащих эпифизов костей. Кристаллы оксалатов обнаруживают в СЖ больных, страдающих почечной недостаточностью. Липиды попадают в СЖ из окружающих тканей при воспалении суставов. Это жирные кислоты в виде игл или капель (липоиды), капли нейтрального жира и кристаллы ХС. Кристаллы ХС и липоиды появляются в СЖ больных, страдающих длительно текущими хроническими артритом различной этиологии: АС, пигментно-виллезном синовите, остеоартрите, и в большинстве случаев — при РА. Кристаллы гематоидина свидетельствуют о старых внутрисуставных геморрагиях. Кристаллы Шарко–Лейдена в сочетании с большим количеством эозинофилов можно обнаружить в СЖ больных с аллергическим синовитом. В СЖ могут быть обнаружены кристаллизированные лекарственные вещества, которые вводились внутрь сустава. Чаще всего это *кристаллы стероидов*, морфологические сходные с уратами. Отличие стероидных кристаллов — внеклеточное расположение.

*Некристаллические неклеточные элементы* в СЖ могут быть представлены фрагментами хряща, аморфными частицами разрушающихся суставных протезов и амилоидом. Амилоидные тельца напоминают растрескавшийся спил дерева. Обнаружение их в СЖ указывает на дегенеративные процессы в хряще и развитие деформирующего остеоартроза.

**Цитоз** в норме составляет не более 300 клеток в 1 мкл. Хранение СЖ в течение нескольких часов при комнатной температуре ведет к разрушению клеток.

Вязкую и с большим содержанием клеточных элементов СЖ необходимо перед заполнением счетной камеры развести изотоническим раствором натрия хлорида в 20 раз. Если необходимо лизировать в СЖ эритроциты, используют гипотонический 0,3% (50 ммоль/л) раствор натрия хлорида. Изотонический и гипотонический растворы натрия хлорида можно подкрашивать 3% раствором метиленового синего или метилвиолета.

В камере Горяева подсчитывают количество клеточных элементов в 40 больших квадратах, расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{A \times 250 \times 20}{40},$$

где А — количество клеточных элементов в 40 больших квадратах камеры Горяева; 250 — объем одного большого квадрата камеры; 20 — степень разведения.

Определение цитоза на автоматических гематологических анализаторах в режиме Body Fluid требует обязательного использования при подготовке пробы гиалуронидазы для разжижения СЖ.

**Цитологическое исследование окрашенных** мазков из цельной СЖ, если она слабовязкая и клеточная. Если цитоз менее 10 000 клеток в 1 мкл, мазки делают из осадка, полученного после центрифугирования СЖ при 1000–2000 об/мин в течение 10 мин. Вязкую и гипервязкую СЖ предварительно разводят изотоническим раствором натрия хлорида в 3–5 раз или более, после чего центрифугируют и из осадка делают мазки. Разведение цельной СЖ при больших цитозах необходимо до уровня 400–1200–2000 клеток в 1 мкл, в противном случае препараты будут очень плотными, и клетки будет невозможно идентифицировать. Высушенные препараты из СЖ фиксируют и окрашивают по Нохту, по Паппенгейму или по Романовскому–Гимзе. Правильная микроскопическая техника подразумевает изучение всего препарата. Обзор проводится на малом увеличении (×100–200), детализация — на увеличении ×400, затем на иммерсии при увеличении ×1000.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

В окрашенном препарате подсчитывают цитограмму (синовиоцитогамму) на 100–200 клеток, предпочтительнее по двум-трем препаратам. В **табл. 3.10** представлен клеточный состав нормальной СЖ. При микроскопическом исследовании препаратов СЖ, окрашенных азу-эозином, выделяют до 15 типов клеток.

**Таблица 3.10.** Клеточный состав синовиальной жидкости в норме

Лейкоциты	<0,1 млн/мл
Синовиоциты	5–30%
Гистиоциты	5–10%
Лимфоциты	8–50%
Моноциты	1–5%
Нейтрофилы	1–2%

В норме клетки тканевого происхождения — синовиоциты и гистиоциты — составляют до 50% клеточного состава, остальные — клетки крови. Изменение количественного соотношения клеток СЖ не является специфическим для конкретных заболеваний суставов, однако клеточные диссоциации позволяют дифференцировать воспалительный/невоспалительный характер процесса и судить о степени воспаления. О воспалительных изменениях свидетельствуют увеличение содержания нейтрофилов (50–93%), низкое содержание лимфоцитов (менее 8%). Увеличение лимфоцитов, снижение нейтрофилов менее 10% и большое количество гистиоидных элементов позволяют предположить иммунный



характер заболевания. Дегенеративные процессы вне обострения не сопровождаются значимым изменением синовиоцитогаммы.

*Синовиоциты* — клетки выстилки суставной поверхности, однослойный уплощенный эпителий, которые обнаруживаются в СЖ в норме и при различных патологических процессах в суставе. Синовиальные клетки обычно одноядерные, диаметром 18–25 мкм, с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, с круглым или овальным центрально или эксцентрично расположенным ядром с мелкоглыбчатой или петливой структурой хроматина. Синовиоциты отторгаются от поверхности синовиальной оболочки в большом количестве при артропатиях, располагаясь в препарате разрозненно и в небольших пластах. Сочетание многоядерных синовиоцитов с лимфоцитами, моноцитами, гистиоцитами и фибробластами характерно для продуктивного неспецифического воспаления.

*Гистиоциты* — тканевые макрофаги размером 18–25 мкм с округлым или моноцитоподобным компактным ядром, окруженным мелкозернистой цитоплазмой. Они всегда присутствуют в СЖ при воспалительных процессах, а при пигментированном ворсинчато-узелковом синовите их количество достигает 32–39%. Выраженная моноцитарно-макрофагальная (гистиоидная) реакция характерна для невоспалительных артропатий и некоторых вариантов остеоартрита, при разрушении суставных протезов, при Лайм-артритах.

*ЛЕ-клетки* в СЖ — моноциты и нейтрофилы с фагоцитированным бесструктурным оксифильными массами — встречаются при длительных вялотекущих воспалительных заболеваниях крупных суставов и не являются прямым указанием на системную красную волчанку, хотя поражение суставов при красной волчанке является нередким.

*Нейтрофилы* в СЖ полностью идентичны нейтрофилам периферической крови, их количество в нормальной СЖ не превышает в формуле 1–2%. При РА содержание нейтрофилов достигает 90%. Аналогичная картина отмечается при АС. При воспалении и внутрисуставном кровотечении нейтрофилы составляют в формуле СЖ 60–80%, а при септической артропатии — более 95%, при кристаллическом артрите — до 90%.

*Лимфоциты* в нормальной СЖ представлены клетками небольшого размера (малые лимфоциты), процент их колеблется от 8 до 30%. При всех воспалительных артритах лимфоциты в СЖ присутствуют, но процент их снижается по мере нарастания количества нейтрофилов. На фоне терапии воспалительного процесса увеличение лимфоцитов до 10% при снижении цитоза расценивается как признак ремиссии. Преобладают лимфоциты в формуле при токсико-аллергических синовитах и костно-суставном туберкулезе.

*ПК* встречаются очень редко, они обнаруживаются в СЖ при РА — хроническом воспалительном процессе. При подозрении на инфекционный характер синовита (значительный цитоз, преобладание в составе нейтрофилов) необходимо провести тщательное бактериоскопическое исследование препарата, окрашенного азуран-эозином. Если флора обнаружена, то из осадка СЖ (пробирка № 3) делают мазки, высушивают и окрашивают по Граму, а при подозрении на туберкулезную инфекцию — по Цилю–Нильсену. Наличие в мазках грамположительных кокков, объединенных в гроздья, позволяет предположить стафилококковую этиологию инфекции, а гонорейный артрит можно предположить по грамотрицательным диплококкам. При грибковых артритах (кандидомикоз, аспергиллез) в СЖ выявляется мицелий гриба. Для точной идентификации вида возбудителя проводятся традиционное культуральное исследование и ПЦР.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6. Исследование эякулята

Исследование эякулята проводится для оценки репродуктивной способности мужчины. До 50% случаев бездетных браков связано с нарушениями фертильности мужчины. Проведение исследования эякулята и трактовка его результатов основывается на рекомендациях ВОЗ.

Эякулят представлен суспензией сперматозоидов, накапливающихся в придатках яичек, которая составляет 2–5% общего объема эякулята, и секрета дополнительных желез, вырабатывающих семенную жидкость: сока простаты, составляющего 25–35%, секрета семенных пузырьков — 50–60%, парауретральных и бульбоуретральных желез — 5–10%. Выброс содержимого секреторных желез и сперматозоидов из семявыносящих протоков в просвет мочеиспускательного канала происходит не одновременно, а в результате нескольких изгоняющих волн. В первой порции содержится наибольшее количество сперматозоидов и секрета простаты, остальные в большей степени содержат секрет семенных пузырьков. Значимую роль в фертильности спермы играют два количественных показателя — общее количество сперматозоидов в эякуляте и общий объем эякулята, поэтому для адекватной оценки качества эякулята должен быть собран весь его объем.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6.1. Правила сбора и обработки эякулята

*Получение эякулята.* Эякулят должен быть собран после как минимум 48 ч, но не более 7 дней полового воздержания, оптимальный срок — 3–4 дня. Для первичной оценки качества эякулята следует провести два исследования с интервалом не менее 7 дней и не более 3 нед. Если результаты двух исследований значительно отличаются друг от друга, нужно провести дополнительный анализ. Результаты у пациента могут варьировать из-за длительного воздержания, которое нарушает эффективный сперматогенез, сопровождается появлением дегенеративных форм, снижением качественных параметров сперматозоидов. Воздержание менее 1 сут снижает общее количество и концентрацию сперматозоидов в эякуляте и качественные параметры сперматозоидов. Исследование эякулята следует отложить на 10–14 дней после стихания симптомов, если пациент перенес любую инфекцию и заболевание, сопровождавшиеся лихорадкой; перед исследованием следует избегать перегрева (бани, сауны), приема антибиотиков, алкоголя. К ухудшению количественных и качественных показателей эякулята может приводить любая



хроническая интоксикация (бытовая, производственная, лекарственная). Пациент должен быть проинструктирован о порядке подготовки к исследованию.

- Перед получением пробы пациент должен помочиться, вымыть с мылом половой член и руки, тщательно и обильно смыть мыло чистой водой.
- Собрать эякулят путем мастурбации в емкость из инертного пластика с широкой горловиной. Эякулят должен быть собран весь полностью!
- Сбор биоматериала рекомендуется проводить непосредственно в лаборатории в специальном помещении, чтобы избежать изменения свойств спермы в результате влияния времени хранения и внешних факторов. Можно собрать эякулят дома, но время доставки в лабораторию не должно превышать 1 ч после эякуляции, проба должна сохраняться все это время при температуре 20–37 °С. Нарушение временных стандартов исследования не позволяет корректно оценивать параметры сперматозоидов. Согласно рекомендациям ВОЗ, установлено время исследования — через 1 ч после получения эякулята, а референсные значения параметров актуальны только при этом условии.
- Если предусмотрено микробиологическое исследование эякулята, сбор эякулята проводится в стерильный контейнер.
- Эякулят из презерватива после полового акта не рекомендуется для исследования, так как латекс презерватива и спермицидная смазка почти моментально приводят к обездвиживанию и гибели сперматозоидов.
- Плохое перемешивание эякулята при взятии порции на исследование (особенно при высокой вязкости) может привести к искажению полученных как количественных, так и качественных показателей.
- Задержка с подсчетом подвижных форм после внесения разведенного эякулята в измерительную камеру более чем на 2 мин может привести к снижению процента подвижных форм.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6.2. Референсные значения показателей эякулята

Референсные значения показателей эякулята в большинстве метод-зависимые.

Приводимые в **табл. 3.11** референсные значения считаются минимально необходимыми для наступления естественного зачатия, однако сперма с показателями ниже референсных также может быть фертильной.

**Таблица 3.11.** Референсные значения (минимальные или порог принятия решения) показателей эякулята (5% процентиль и 95% доверительный интервал) (Всемирная организация здравоохранения, 6-е издание, 2023)

Объем, мл	>1,4 (1,3–1,5)
Общее количество сперматозоидов в эякуляте ( $\times 10^6$ на эякулят)	$\geq 38$ (35–40)
Концентрация сперматозидов ( $\times 10^6$ на 1 мл)	$\geq 16$ (15–18)
Общая подвижность (прогрессивно подвижные + не прогрессивно подвижные, %)*	$\geq 42$ (40–43)
Прогрессивно подвижные, %	$\geq 30$ (29–31)
Жизнеспособность (живые сперматозоиды, %)	$\geq 54$ (50–56)
Морфология сперматозоидов (нормальные формы, %)	$\geq 4$ (3,9–4,0)
Пероксидаза-положительные лейкоциты ( $\times 10^6$ на 1 мл)	<1
Разжижение	В течение 60 мин
pH	$\geq 7,2$
MAR-тест (подвижные сперматозоиды со связанными шариками, %)	<50
Содержание цинка в семенной плазме (микромоль на эякулят)	$\geq 2,4$
Содержание фруктозы в семенной плазме (микромоль на эякулят)	$\geq 13$
Содержание нейтральной глюкозидазы в семенной плазме (мЕд на эякулят)	$\geq 20$

\* Подвижность оценивается по трем категориям: прогрессивно подвижные, не прогрессивно подвижные и неподвижные.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6.3. Макроскопическое исследование. Физические свойства

**Разжижение.** Сразу после эякуляции сперма густая и вязкая. Разжижение эякулята при комнатной температуре должно наступить в течение 60 мин, обычно наступает через 10–30 мин. В некоторых случаях разжижение эякулята не происходит за 60 мин, этот факт необходимо отметить в бланке. Если эякулят длительное время остается вязким, полувязким или вообще не разжижается, можно думать о воспалении предстательной железы. При этом отмечается нарушение образования слизи и выделения муколитических ферментов. Отсутствие разжижения спермы препятствует движению сперматозоидов: они или не двигаются или быстро теряют подвижность.

Осторожное непрерывное перемешивание во время разжижения эякулята уменьшает ошибки при оценке количества сперматозоидов. Образец следует перемешивать в том же контейнере, в котором он был получен, однако его нельзя

трясти. Если разжижения эякулята не наступило, необходимо провести дополнительную обработку образца перед анализом с помощью ферментов (раствор 1 г/л Бромелайна или трипсин до конечной концентрации 1%).

**Вязкость.** Вязкость эякулята определяют методом «нити»: стеклянную палочку опускают в разжиженный эякулят, а затем медленно поднимают. Образующаяся нить не должна быть более 2 см. Вязкая консистенция разжиженного эякулята препятствует движению сперматозоидов, при этом сперматозоиды или вообще не двигаются, или быстро теряют подвижность.

Нормальная вязкость разжиженного эякулята не исключает наличия патологии. Если в образце полученной спермы присутствуют тяжи слизи, вязкость измеряется в свободных от слизи участках. При определении повышенной вязкости применяются процедуры для разжижения. Повышенная вязкость наблюдается достаточно часто — по некоторым данным, у 30–50% обследуемых. Обнаружена связь повышенной вязкости разжиженного эякулята с анаэробной инфекцией придаточных желез урогенитального тракта (инфекции, передаваемые половым путем, и *Trichomonas urogenitalis*). Повышенная вязкость отмечается в бланке.

**Объем.** В норме у здорового пациента после 4–7-дневного полового воздержания объем эякулята колеблется от 1,5 до 6 мл (*нормоспермия*). Объем полученного эякулята измеряют сразу после его разжижения в доставленном контейнере. Можно взвесить контейнер до и после получения эякулята (1 г соответствует 1 мл). Уменьшение объема эякулята ниже 2 мл — *олигоспермия* (*гипоспермия*), а полное отсутствие эякулята — *аспермия*. Олигоспермия и аспермия наблюдаются при окклюзии семявыносящих протоков, ретроградной эякуляции, хроническом воспалении предстательной железы и/или семявыносящих протоков. К уменьшению объема спермы приводит снижение секреции предстательной железы и семенных пузырьков. Снижение объема эякулята характерно для азооспермии — отсутствия сперматозоидов в эякуляте, которое наблюдается при атрофии яичек или облитерации обоих семявыбрасывающих протоков. Увеличение объема эякулята более 6 мл — *полиспермия* — не влияет на фертильность.

**Запах.** Эякулят имеет характерный запах цветов каштанов. Этот запах сперма приобретает при присоединении секрета предстательной железы. При закупорке выводных протоков предстательной железы специфический запах спермы снижается. При атрофии простаты и после простатэктомии сперма теряет запах. Гнилостный запах сперма приобретает при гнойно-воспалительных процессах в простате, семенных пузырьках и зависит от продуктов жизнедеятельности микрофлоры, вызвавшей воспаление.

**Цвет.** Описание цвета проводится сразу после разжижения или через 1 ч после эякуляции. Нормальный эякулят мутный, молочно-белого или серовато-желтого цвета. Степень мутности зависит от количества сперматозоидов. Если количество сперматозоидов снижено — эякулят более прозрачный. Изменение цвета спермы некоторые авторы связывают со временем воздержания и возрастом пациента. При длительном воздержании эякулят становится более прозрачным. Если в эякуляте присутствуют эритроциты, образец приобретает розовый, красный или красновато-коричневый оттенок (*гемоспермия*). Желтоватый оттенок эякулят приобретает при желтухе, при приеме некоторых витаминов, флавинов и длительном воздержании. При большом содержании лейкоцитов сперма окрашивается в желтовато-зеленый цвет (*пиоспермия*).

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6.4. Микроскопическое исследование эякулята

Микроскопическое исследование эякулята проводится после полного его разжижения. На 1-м этапе оцениваются концентрация, подвижность, агглютинация и агрегация сперматозоидов, а также наличие клеточных элементов в нативных препаратах и в счетной камере с использованием простой световой микроскопии или с помощью фазово-контрастного микроскопирования. На 2-м этапе исследование проводится на окрашенных препаратах:

морфологическая классификация сперматозоидов, подсчет лейкоцитов и определение их концентрации, оценивается жизнеспособность сперматозоидов и определяется их концентрация. Дополнительными исследованиями сперматозоидов являются тест на антиспермальные антитела (MAR-тест), определение индексов множественных дефектов сперматозоидов, тест на гипоосмотическое набухание, иммунологические тесты, посев эякулята и биохимический анализ функции придаточных половых желез.

**Первичная оценка сперматозоидов.** Из аккуратно размешанного эякулята готовят нативный препарат для обзорного просмотра на малом увеличении. Результаты вносят в бланк, отмечая наличие агглютинации и/или агрегации сперматозоидов, тяжей слизи, эритроцитов, «круглых клеток» и элементов простатического секрета — кристаллов спермина, лецитиновых зерен и амилоидных телец, а также подвижных жгутиковых простейших.

**Агглютинация** сперматозоидов у здоровых пациентов отсутствует. Наличие агглютинатов (касается только подвижных сперматозоидов) позволяет предположить наличие иммунологического фактора бесплодия, однако ее нельзя считать доказательством последнего. В бланке отмечается тип агглютинации (головками, хвостами или смешанный вариант) и оценивается степень агглютинации: 1-я степень — изолированные (менее 10 сперматозоидов на агглютинат), 2-я — средней степени (10–50 сперматозоидов в агглютинате, много свободных), 3-я — значительной степени (50 и более сперматозоидов в агглютинате, некоторые клетки свободны), 4-я — тяжелая степень (свободных сперматозоидов нет, все — в сливающихся агглютинатах).

**Агрегация** — хаотическое прилипание неподвижных и подвижных сперматозоидов на комочки или тяжи слизи, клеточные элементы и детрит. Агрегация и агглютинация оцениваются как отдельные показатели.

**Слизь** в нормальном эякуляте отсутствует. Обнаруживается слизь при воспалении мочеиспускательного канала, бульбоуретральных желез, простаты, простатических ходов. Слизь препятствует движению сперматозоидов и приводит к снижению фертильности.

С простатическим соком в сперму попадают липоидные тельца, амилоидные тельца и кристаллизуются кристаллы спермина. *Липоидные тельца* содержатся в нормальной сперме в большом количестве, при простатите их количество уменьшается вплоть до полного исчезновения. Амилоидные тельца в норме отсутствуют, но появляются при застое

простатического секрета в протоках железы. Кристаллы спермина (Беттхера) начинают кристаллизоваться при охлаждении спермы из спермина и фосфорнокислой соли. При азооспермии и резко выраженной олигозооспермии кристаллы Беттхера образуются быстро и в большом количестве.

*Trichomonas urogenitalis* — простейшее из класса жгутиковых грушевидной формы длиной 10–20 мкм, шириной 7–10 мкм. Форма тела поддерживается скелетным образованием — аксостилем. В переднем конце тела клетки расположено ядро и пучок из четырех жгутиков, пятый жгутик, возвратный, идет по краю ундулирующей мембраны (складки цитоплазмы). Движение простейшего поступательно-колебательное, осуществляется в результате постоянного движения жгутиков, ундулирующая мембрана совершает волнообразное движение, препятствующее вращению клетки. Трихомонады достаточно крупные, их диаметр в 1,5–3 раза больше диаметра нейтрофила, и достаточно легко распознаются в нативном препарате спермы, несмотря на активное движение сперматозоидов. При обнаружении в нативном препарате этих простейших важно тщательно изучить окрашенные азури-эозином препараты, чтобы дать уверенное диагностическое заключение.

**Предварительная оценка концентрации сперматозоидов** необходима для определения степени разведения пробы перед заполнением счетной камеры. Если в нативном препарате в каждом отдельном поле зрения число сперматозоидов сильно отличается, это указывает на плохое перемешивание образца — необходимо сделать новый препарат после повторного перемешивания. Сохраняющаяся после перемешивания неомогенность свидетельствует о недостаточном разжижении или наличии слизи.

Если число сперматозоидов в поле зрения менее 15, сперму разводят теплым (37 °С) изотоническим раствором натрия хлорида 1:5; если 15–20 — разводят 1:10; если 40–200 — разводят 1:20; если более 200 — разводят 1:50 или 1:100. Если присутствуют один-два сперматозоида, то делают запись о малом количестве сперматозоидов и для точного определения их концентрации центрифугируют аликвоту эякулята для последующего подсчета сперматозоидов в осадке.

**Оценка подвижности сперматозоидов в нативном препарате (кинезиограмма).** Исследование подвижности следует проводить при температуре не ниже 20 °С, иначе будут искажаться результаты оценки подвижности сперматозоидов по категориям. В препарате из хорошо перемешанного эякулята подсчитывают 200 клеток, разделяя их на три категории: прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные и неподвижные; прогрессивно подвижные — движение линейное или по большому кругу, активное или умеренно активное поступательное; непрогрессивно подвижные — непоступательное движение, колебательное или маятникообразное, маневренное, медленное движение по малому радиусу или биение жгутика без перемещения головки. Результат выдается в процентах: суммарно — для прогрессивно подвижных и непрогрессивно подвижных, отдельно — для прогрессивно подвижных.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

Подсчитывают только интактные сперматозоиды, то есть сперматозоиды, имеющие и головку, и жгутик. Общая подвижность (прогрессивно подвижные + непрогрессивно подвижные) не должна быть менее 40%, сперматозоидов с прогрессивной подвижностью — не менее 32%.

**Астенозооспермия** — снижение подвижности сперматозоидов, которую могут вызвать генетические нарушения строения жгутика; энергетические нарушения, связанные с генетически обусловленными или функциональными дефектами митохондрий; хронические воспалительные заболевания; бактериоспермия; экзогенные токсические факторы. Некоторые микроорганизмы приводят к снижению подвижности сперматозоидов, вызывая их агглютинацию и/или адгезию. Этот процесс зависит от концентрации бактерий в сперме. Подвижность сперматозоидов снижается при действии солей тяжелых металлов, свинца, наркотических препаратов, накоплении в сперме кадмия. Действие экзогенных факторов неспецифическое и прямо или косвенно влияет на структуру компонентов жгутиков и, как следствие, подвижность сперматозоидов.

**Определение концентрации сперматозоидов и круглых клеток в счетной камере.** Общее число сперматозоидов в эякуляте и концентрация сперматозоидов — параметры, непосредственно связанные с вероятностью зачатия. От концентрации сперматозоидов в сперме зависит вероятность оплодотворения. В норме при отсутствии обструкции полового тракта и коротком времени полового воздержания общее число сперматозоидов в эякуляте коррелирует с объемом секрета простаты и семенных пузырьков.

Термины «общее количество сперматозоидов» и «концентрация сперматозоидов» — не синонимы. Концентрация сперматозоидов относится к числу клеток на единицу объема эякулята и является функцией количества вырабатываемых сперматозоидов и объема секрета половых желез. Общее число сперматозоидов есть суммарное число сперматозоидов во всем эякуляте, и его получают умножением концентрации сперматозоидов в 1 мл на объем эякулята.

Для определения концентрации сперматозоидов аликвоту эякулята разводят теплым изотоническим раствором натрия хлорида, исходя из данных предварительной оценки их количества, произведенной в нативном препарате. Затем добавляют к разведенному эякуляту фиксирующий реактив [жидкость Барбагалло или забуференный раствор формальдегида (Формалина<sup>★</sup>)], перемешивают и заполняют счетную камеру. Могут использоваться разные счетные камеры.

Подсчитывают только целые сперматозоиды (с головками и жгутиками). Для снижения статистических ошибок должно быть подсчитано не менее 400 сперматозоидов, при двукратном подсчете по 200 клеток в двух аликвотах. Если присутствует много сперматозоидов без головок (ацефалических) или головок без жгутиков, это следует указать. При клинической необходимости их концентрации может быть определена аналогично тому, как подсчитывают целые сперматозоиды, процентное содержание относительно целых сперматозоидов можно определить на окрашенных препаратах.

Минимальным референсным значением для концентрации сперматозоидов принято значение  $16 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл (5-й процентиль, 95% доверительный интервал  $15-18 \times 10^6$ ).

Минимальным референсным значением для общего числа сперматозоидов принято  $39 \times 10^6$  сперматозоидов на эякулят (5-й процентиль, 95% доверительный интервал  $35-40 \times 10^6$ ), что расценивается как *нормозооспермия*.

*Полизооспермия* — в 1 мл эякулята количество сперматозоидов превышает 150 млн. *Олигозооспермия* — в 1 мл эякулята содержится менее 15 млн сперматозоидов. Выраженная олигозооспермия называется *криптозооспермией*, когда единичные сперматозоиды обнаруживаются только в центрифугате эякулята. Если ни одного сперматозоида в центрифугате не обнаружено, в заключении используется термин «*азооспермия*».

Олигозооспермия может быть вызвана обструкцией семявыносящих путей, тестикулярной дисфункцией, приводящей к нарушению сперматогенеза, приобретенным первичным и вторичным гипогонадизмом, атрезией эпидидимиса и семенных пузырьков. При азооспермии в осадке эякулята сперматозоиды могут отсутствовать, но содержаться клетки сперматогенеза. В нативном препарате и в счетной камере клетки сперматогенеза не выделяют, но проводят подсчет всех круглых клеток, подразумевая, что, помимо клеток сперматогенеза, в эякуляте могут содержаться лейкоциты. Количество несперматогенных клеток в эякуляте (эпителиальных клеток, круглых клеток — незрелых половых клеток и лейкоцитов) или отдельных головок и жгутиков сперматозоидов подсчитывают в счетной камере так же, как и количество сперматозоидов. Присутствие в эякуляте «круглых клеток» может указывать на тестикулярное повреждение (незрелые половые клетки), патологию семявыносящей системы (цилиарные пучки) или воспаление желез дополнительной секреции (лейкоциты).

Круглые клетки дифференцируют на лейкоциты и клетки сперматогенеза в окрашенном препарате, что является неотъемлемой частью спермограммы.

Референсное значение концентрации нейтрофильных лейкоцитов — менее  $1 \times 10^6$  на 1 мл эякулята. Пиоспермия — чрезмерное количество лейкоцитов в эякуляте — может быть связана с инфекцией мочеполовой системы. Лейкоциты могут снижать подвижность и нарушать целостность сперматозоидов посредством оксидативного воздействия. Появление лейкоцитов в эякуляте в концентрации выше пороговой является поводом для более углубленного обследования с анализом инфекций половых желез.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

### 3.6.5. Спермограмма

Спермограмма — совокупность количественного и качественного исследования морфологии сперматозоидов в окрашенных препаратах.

Проводится последовательный подсчет 400 сперматозоидов по 200 клеток в препарате. В процессе подсчета сперматозоиды делят на нормальные и патологические. Нет необходимости различать все вариации патологии, но при определенных клинических ситуациях требуется количественная оценка таких патологических форм, как ацефалические формы и глобулозооспермия. Морфологическую оценку проводят для каждого сперматозоида, поддающегося оценке, — с хорошо видимыми головкой и жгутиком.

*Морфологические нормальные зрелые сперматозоиды* должны соответствовать строгим критериям. Все сомнительные и пограничные формы следует относить к патологическим формам. Головка нормального сперматозоида овальная, с гладким и ровным контуром, имеет выраженную акросомальную зону, занимающую от 40 до 70% площади. Вакуоли в акросомальной области допускаются: не более двух маленьких или одной большой, занимающих менее 20% акросомальной зоны. В хроматиновой части головки вакуолей быть не должно. Шейка тонкая, четко выраженная и почти той же длины, что и головка. Ось шейки и центральная ось головки должны совпадать. Допускается наличие небольшой цитоплазматической капли (менее 1/3 головки). Жгутик должен быть одинаковой толщины по всей его длине, тоньше у шейки, длина его должна составлять примерно 10 длин головки. Жгутик может закручиваться сам на себя, но не должен иметь заломов.

Строгие критерии нормальной морфологии обусловлены тем, что имеются данные о прогностической ценности морфологической классификации сперматозоидов для оценки результатов оплодотворения. Только полноценные сперматозоиды способны проникать в верхний отдел цервикального канала женщины.

Кроме морфологически нормальных сперматозоидов, в эякуляте здорового мужчины всегда присутствует то или иное количество патологических морфологических форм — с измененными по форме головкой, жгутиком и шейкой. Важным в прогнозе фертильной функции является достаточное количество нормальных клеток. Количество нормальных форм в эякуляте, принимаемое за референсное значение, в разных источниках существенно различается, чаще всего указывается, что морфологически нормальных сперматозоидов не должно быть менее 30%. В руководстве ВОЗ указывается, что снижение частоты удачного оплодотворения *in vitro* связано со снижением морфологически нормальных сперматозоидов менее 15%, тем не менее минимальным допустимым и достаточным для оплодотворения считают 4% морфологически нормальных сперматозоидов. После подсчета процента нормальных форм в мазках необходимо рассчитать их количество, исходя из общего количества сперматозоидов в эякуляте.

**Патологические формы сперматозоидов** характеризуются изменением размера, формы и качества головки, шейки и жгутика. Дефекты головки: большая или маленькая, грушевидная, аморфная, конусообразная, содержащая большое количество вакуолей, в частности в постакросомальной зоне, выраженное увеличение и уменьшение акросомальной зоны (<40 или >70% области головки), наличие двух и более головок. Иногда большое число сперматозоидов может иметь специфический структурный дефект — отсутствие акросомы. Дефекты шейки и средней части: асимметричное прикрепление, выраженное утолщение или утоньшение, неровность контура, скрученность шейки. Дефекты жгутика: короткие, множественные, с заломом, утолщенные, спирально скрученные. К патологическим сперматозоидам

относят сперматозоиды с большой цитоплазматической каплей, окружающей головку («космонавт»), — это аномалия сперматогенеза часто сочетается с дефектом средней части.

Подробная категоризация всех патологических форм может быть полезна с диагностической позиции, поэтому вычисляют процент клеток с дефектами головки (%H), шейки (%M) или жгутика (%P), сперматозоидов с остаточными цитоплазматическими каплями (%C) и сперматозоидов с сочетанной патологией. На основании полученных результатов можно рассчитывать индексы множественных дефектов.

Подсчитывают только интактные сперматозоиды — есть и головка, и жгутик. Присутствие небольшого количества «бесхвостых» головок и отдельно лежащих жгутиков (сперматозоиды — «булавочные головки») указывается в описании, но подсчету они не подлежат. Особая форма дефекта головок — круглые головки без акросомы (глобулозооспермия), так же как ацефалические формы и головки без жгутиков, когда их много, в подавляющем большинстве случаев обуславливают бесплодие. Если подобных дефектных форм сперматозоидов много, то целесообразно рассчитать их количество отдельно.

*Тератозооспермия* — увеличение количества патологических форм сперматозоидов выше определенных значений. Выраженная тератозооспермия резко снижает шансы оплодотворения и увеличивает вероятность пороков развития у плода, если оплодотворение произошло. Тератозооспермия обычно сочетается с олигозооспермией и астенозооспермией. Увеличение относительного количества сперматозоидов с двумя головками и двумя хвостами связывают с поражением сперматозоидов вирусом. Удлиненные головки, макроголовки и множественные хвосты обнаруживаются у мужчин, у которых повышено количество полиплоидных и анеуплоидных сперматозоидов.

### Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

*Индексы дефектов сперматозоидов.* Сперматозоиды с патологической морфологией часто имеют множественные дефекты. Ранее в протоколах фиксировался только один дефект, предпочтение отдавалось дефектам головки. В настоящее время часто подсчитывают индекс тератозооспермии или индекс множественных аномалий, то есть число дефектов, разделенное на число патологических сперматозоидов. С помощью этих индексов прогнозируется функция сперматозоидов как *in vivo* (экстракорпоральное оплодотворение), так и *in vitro* (фертильность эякулята). Отдельно выделяют «дефекты головки», «дефекты средней части», «дефекты хвоста». Значение индекса тератозооспермии лежит в пределах от 1 (каждый патологический сперматозоид имеет только один дефект) до 3 (каждый патологический сперматозоид имеет дефекты головки, средней части и хвоста). Имеются данные, что при индексе тератозооспермии более 1,6 снижается частота беременностей.

*Морфология круглых клеток спермы в окрашенных препаратах.* Клетки эякулята, кроме сперматозоидов, обнаруживаемые в нативном препарате, в совокупности обозначают как круглые клетки. Их количество не должно превышать  $5 \times 10^6$ /мл спермы. В окрашенном препарате их дифференцируют на лейкоциты и клетки сперматогенеза.

*Лейкоциты* в эякуляте представлены нейтрофилами. Морфология их не отличается от таковой в периферической крови или любом другом биологическом материале. Повышенная концентрация лейкоцитов коррелирует с бактериоспермией. Лейкоспермия указывает на воспалительный процесс в органах репродуктивной системы, особенно часто это происходит в придаточных железах. Лейкоспермия снижает вероятность оплодотворения.

Обнаружение лейко- или пиоспермии служит сигналом для проведения микробиологического исследования эякулята.

*Клетки сперматогенеза (незрелые половые клетки)* — сперматогонии, сперматоциты и сперматиды. В эякуляте чаще всего встречаются сперматоциты и сперматиды на разных стадиях созревания, количество их небольшое. Клетки сперматогенеза хорошо различимы в нативном препарате и хорошо узнаваемы в окрашенных препаратах. Это клетки правильной круглой формы, разных размеров, характеризуются плотной базофильной гомогенной консистенцией, цитоплазмой, в которой расположены одно или несколько ядер также плотной структуры. При обструктивной азооспермии и некрооспермии для процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) могут использовать удлиненные (поздние) сперматиды, также называемые тестикулярными сперматозоидами, — их получают путем биопсии эпидидимиса. Помимо клеток сперматогенеза, в препаратах могут быть обнаружены *остаточные тельца* — свободные цитоплазматические капли или фрагменты цитоплазмы сперматид, которые образуются в процессе формирования сперматозоида или разрушения сперматид (неэффективный спермиогенез). В норме процесс созревания сперматозоида и освобождение его от цитоплазматической капли происходит в семенном канальце, где клетки Сертоли или эпителиальные клетки эпидидимиса фагоцитируют эти остатки цитоплазмы, поэтому остаточных телец в нормальном эякуляте практически нет. Появление их в эякуляте обычно сочетается с появлением клеток сперматогенеза (сперматид, иногда в сочетании со сперматоцитами).

*Макрофаги* в окрашенных азур-эозином препаратах в норме не обнаруживают. Они появляются в сперме больных, страдающих хроническим специфическим и неспецифическим воспалением простаты, эпидидимиса, добавочных половых желез.

*Спермиофаги* — макрофаги, фагоцитирующие сперматозоиды. В норме в канальцах эпидидимиса роль макрофагов выполняют эпителиальные клетки (спермиофаги эпидидимиса), которые фагоцитируют цитоплазматические капли, «сброшенные» с шейки созревших сперматозоидов. Появление в сперме спермиофагов обусловлено длительным застоем спермы в эпидидимисе, выходом в результате редких эякуляций из эпидидимиса неполноценных или старых сперматозоидов.

*Эритроциты* в сперме здоровых мужчин отсутствуют. Гемоспермия может быть истинной и ложной. Ложная гемоспермия — появление эритроцитов в сперме в результате острой микротравмы (грубая мастурбация, исследование спермы, полученной на следующий день после инструментального исследования мочевого пузыря или взятия материала из мочеиспускательного канала для бактериологического исследования). Истинная гемоспермия наблюдается при воспалении добавочных желез, при новообразованиях.

*Эпителиальные клетки* в эякуляте могут быть представлены клетками многослойного плоского эпителия с головки полового члена и крайней плоти; клинического значения они не имеют. Также в пробе могут оказаться в небольшом количестве клетки переходного эпителия из простатической части мочеиспускательного канала и цилиндрический многослойный эпителий из губчатой и дистальной (простатической) части мочеиспускательного канала, отторгающиеся с поверхности слизистой во время семяизвержения.

**Жизнеспособность сперматозоидов** — это доля живых сперматозоидов. Оценивать жизнеспособность сперматозоидов необходимо, когда в эякуляте доля прогрессивно-подвижных сперматозоидов составляет менее 40%. Наиболее распространен тест на жизнеспособность, который основан на интактности мембраны головки у живых клеток, что предотвращает проникновение внутрь головок суправитального красителя (окраска водным раствором эозина или эозина и нигрозина). Тест на гипоосмотическое набухание применяется, когда необходимо отобрать сперматозоиды для ИКСИ: жгутики живых сперматозоидов начинают набухать начиная с 5-й минуты и максимально изменяются к 30-й минуте.

Наличие большого количества живых, но неподвижных сперматозоидов указывает на структурные дефекты жгутиков. Это состояние носит название «астенозооспермия». *Некрозооспермия* — выраженное (более 50%) преобладание в эякуляте мертвых сперматозоидов.

Минимальным референсным значением для жизнеспособности (сперматозоиды с интактной мембраной) принято 54% (5-й процентиль, 95% доверительный интервал 50–56).

**Автоматизация исследования эякулята** нацелена на стандартизацию процедуры измерения концентрации и подвижности сперматозоидов по группам (общая подвижность, поступательная подвижность и неподвижные) и оценку их морфологии. Автоматические сперманализаторы работают с цельным неразведенным эякулятом, поддерживая во время процедуры оптимальную для оценки подвижности температуру образца. Автоматически на основании полученных результатов производится подсчет количества сперматозоидов, общего количества сперматозоидов с нормальной морфологией, количество функциональных сперматозоидов, рассчитываются различные индексы. Благодаря высокой чувствительности используемой технологии могут исследоваться образцы с низкой концентрацией сперматозоидов при олиго- и криптозооспермии, образцы с низкой концентрацией подвижных сперматозоидов при астензооспермии. В ряде приборов есть система визуализации — автоматизированная микроскопия, когда на экране прибора или на мониторе подключенного к анализатору компьютера можно контролировать процесс и в режиме «стоп-кадр» изучать морфологию отдельных клеток.

## Глава 3. Общеклинические исследования биологических материалов

Широкое распространение получили автоматические системы SCA-CASA с различными аппаратными и программными платформами, дающие возможность оценивать не только концентрацию, подвижность и морфологию сперматозоидов, включая анализ морфологии в окрашенных мазках, но и фрагментацию генетического материала в специально обработанных препаратах (модуль «ДНК-фрагментация»). Эти системы работают по принципу анализа изображения и морфометрии, позволяют адаптировать исследование с разными счетными камерами.

### Рекомендуемая литература

1. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. В 2 т. / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
2. Клиническая лабораторная диагностика: учебник в 2 т. / Под ред. В.В. Долгова. М.: Лабдиаг, 2017. Т. 1. 688 с.
3. Козлов А.В. Анализ мочи. Руководство для врачей. М.: СИМК. Серия «Школа профессора», 2019. 256 с.
4. Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, шестое издание [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition], ВОЗ, 2023
5. Миронова И.И., Романова Л.А., Долгов В.В. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота, синовиальная жидкость. М.—Тверь: Триада, 2021. 496 с.
6. Миронова И.И., Романова Л.А. Атлас осадков мочи. М.—Тверь: Триада, 2022. 184 с.
7. Сапожкова Ж.Ю., Селиванов Т.О., Негашева Е.С. и др. Интерпретация лабораторных исследований при инфекциях мужских половых желез и нарушении репродуктивной функции. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 144 с.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1. Общий (клинический) анализ крови

Общий (клинический) анализ крови (ОАК) является одним из значимых диагностических тестов. Современная гемограмма предоставляет ценную информацию об изменениях в крови и, в некоторой степени, в костном мозге, а также прямые или косвенные данные о состоянии здоровья и заболеваниях различных систем организма. ОАК является информативным исследованием при диагностике и классификации анемии, гемоглобинопатий, скрининге дефицитных анемий, аплазии костного мозга, выявлении паразитемии (малярии, бабезиоза и др.), дифференциальной диагностике тромбоцитопений, диагностике вирусных инфекций, воспалительных и других заболеваний. Гемограмма является первым исследованием, с которого начинается диагностика ОЛ и хронических лейкозов, миелодиспластических синдромов (МДС), лимфоидных неоплазий и другой патологии.

В настоящее время практически все исследования ОАК выполняются на гематологических анализаторах. Перед началом работы на гематологическом анализаторе рекомендовано, следуя инструкции прибора, установить референсные значения показателей ОАК.

## Глава 4. Лабораторная гематология

4.1.1. Референсные диапазоны показателей общего анализа крови, получаемые на гематологических анализаторах. Наиболее часто используемые референсные показатели ОАК приведены в **табл. 4.1**.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1.2. Эритроцитарные параметры

Подсчет числа эритроцитов и тромбоцитов осуществляется кондуктометрическим методом, основанным на подсчете числа и измерении амплитуды электрического сигнала, возникающего при прохождении клеток через отверстие малого диаметра (апертуру), соизмеримого с объемом клетки. Процессор усиливает импульсы и сравнивает их с пороговыми значениями потенциала для разных клеток. Тромбоциты генерируют электрические импульсы низкой амплитуды, а эритроциты и лейкоциты — импульсы высокой амплитуды. CV для RBC составляет 1–2%, а для некоторых приборов — менее 1%.

**Таблица 4.1.** Референсные значения показателей периферической крови у взрослых

Показатель	Нормальные значения	
	Мужчины	Женщины
Гемоглобин (Hb), г/л	130–160	120–140
Эритроциты (RBC) $\times 10^{12}/л$	4,0–6,0	3,8–5,0
Гематокрит (HCT), %	40–48	36–42
Средний объем эритроцита (MCV), фл, мкм <sup>3</sup>	80–100	
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	27–31	
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/л	300–380	
Ширина распределения эритроцитов по объему, (RDW), %	11,5–14,5	
Ретикулоциты (RET), %, ручной подсчет	0,2–1,2%	
Ретикулоциты, %, подсчет на гематологическом анализаторе	0,2–2,2%	
Лейкоциты (WBC), $\times 10^9/л$	4,0–9,0	
Нейтрофилы, % ( $10^9/л$ ): – палочкоядерные – сегментоядерные	1–6 (0,04–0,50) 47–72 (2,0–6,4)	
Эозинофилы, % ( $10^9/л$ )	0,5–5,0 (0,02–0,40)	
Базофилы, % ( $10^9/л$ )	0–1,0 (0–0,065)	
Лимфоциты, % ( $10^9/л$ )	19–37 (1,0–3,0)	
Моноциты, % ( $10^9/л$ )	3–11 (0,09–0,70)	
Плазматические клетки	—	
Тромбоциты (PLT), $10^9/л$	150–400	
Средний объем тромбоцита (MPV), фл	7,4–10,4	
Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), %	10–20	
Тромбокрит (PCT), %	0,15–0,40	
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/ч	2–10	2–15

Возможные ошибки подсчета эритроцитов на гематологических анализаторах представлены в **табл. 4.2**.

**Таблица 4.2.** Возможные ошибки подсчета эритроцитов

Ложное повышение	Ложное понижение
Гигантские тромбоциты (объем более 30 фл). Криоглобулинемия. Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/л$ )	Агглютинация эритроцитов. Выраженный микроцитоз эритроцитов

Криоглобулинемия может наблюдаться у больных миеломой, МВ, злокачественными новообразованиями, лейкозами, лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями, вирусным гепатитом, СД. Агглютинация эритроцитов может привести наряду со снижением RBC к увеличению MCV, MCH и MCHC.

В большинстве гематологических анализаторов измерение концентрации Hb осуществляется колориметрическим методом с использованием бесцианидных реагентов. Фотометрический метод измерения концентрации Hb является традиционным гемихромным методом, в котором все фракции Hb переводятся в метгемоглобин и при длине волны 555 нм определяется оптическая плотность гемолизата. CV измерения концентрации Hb при этом не превышает 2%. Возможные погрешности при измерении Hb представлены в **табл. 4.3**.

## Глава 4. Лабораторная гематология

**Таблица 4.3.** Возможные ошибки измерения гемоглобина

Ложное повышение	Ложное понижение
Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$ ). Присутствие нестабильных Hb (HbS, HbC). Гиперлипидемия. Гипербилирубинемия. Криоглобулинемия. Гемолиз ( <i>in vivo</i> ). Резистентные к лизису эритроциты	Образование микросгустков в пробе крови. Некачественный гемолизирующий раствор

*Повышение концентрации Hb* наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах.

*Снижение концентрации Hb* имеет место при анемиях, гипергидратации, злокачественных новообразованиях, опухолевых и неопухолевых заболеваниях крови.

**HCT** отражает сумму прямо измеренных объемов эритроцитов и рассчитывается в анализаторе по формуле:

$$\text{HCT} = \frac{\text{RBC} \times \text{MCV}}{10} (\%).$$

Возможные погрешности определения HCT эритроцитов на гематологических анализаторах представлены в **табл. 4.4**.

**Таблица 4.4.** Возможные ошибки измерения гематокрита

Ложное повышение	Ложное понижение
Гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл). Криоглобулинемия. Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$ ). Гипергликемия ( $>600$ мг/дл). Диабетический кетоацидоз	Агглютинация эритроцитов. Выраженный микроцитоз эритроцитов ( $<36$ фл)

Ложное повышение HCT наблюдается при гипергликемии и диабетическом кетоацидозе, что вызвано гиперосмолярностью плазмы крови.

*Повышение HCT* также имеет место при реактивных и опухолевых эритроцитозах, уменьшении объема циркулирующей плазмы (ожоговая болезнь, дегидратация). *Снижение HCT* имеет место при анемиях, беременности (II триместр), гипергидратации.

**MCV** выражается в кубических микрометрах ( $\text{мкм}^3$ ) или в фемтолитрах ( $1 \text{ фл} = 1 \text{ мкм}^3$ ). MCV определяется большинством гематологических анализаторов благодаря прямой зависимости амплитуды электрического импульса от объема клетки. Вычисляется MCV делением суммы клеточных объемов на число эритроцитов. В то же время MCV является усредненным показателем объема всей популяции эритроцитов в диапазоне 36–360 фл. Поэтому нормальное значение MCV может быть при смешанном анизоцитозе, большом количестве аномальных эритроцитов (например, при серповидноклеточной анемии; выраженном пойкилоцитозе). В этом случае особую диагностическую важность приобретают анализ эритроцитарной гистограммы и морфология клеток в окрашенных мазках крови. Возможные погрешности определения MCV представлены в **табл. 4.5**.

**Таблица 4.5.** Возможные ошибки измерения среднего объема эритроцита

Ложное повышение	Ложное понижение
Холодовые агглютинины. Диабетический кетоацидоз. Гиперосмолярность плазмы. Гипернатриемия. Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$ ). Длительное хранение крови (более 8 ч). Ретикулоцитоз. Макротромбоцитоз	Повышенное содержание фрагментов эритроцитов в крови вследствие механического гемолиза. Коагулопатия потребления

MCV является важным показателем в дифференциальной диагностике анемий. На основании MCV анемии разделяют на нормоцитарные (MCV 80–100 фл), микроцитарные (MCV менее 80 фл) и макроцитарные (MCV более 100 фл). MCV — показатель, отражающий изменения в эритроцитах при длительном хранении крови, которые возникают раньше, чем в лейкоцитах и тромбоцитах, поэтому хранение крови более 8 ч вызывает увеличение MCV.

**МСН** характеризует среднее содержание Hb в отдельном эритроците в абсолютных единицах. Рассчитывается по формуле:

$$\text{МСН} = \frac{\text{Гемоглобин (г/л)}}{\text{Количество эритроцитов} \times 10^{12}}.$$

В норме МСН составляет 27–31 пг. МСН — более объективный параметр, чем цветовой показатель, который не отражает синтез Hb и его содержание в эритроците и выражается в условных единицах.

*Возможные ошибки измерения.* Параметр МСН является расчетным, поэтому к ложноповышенным результатам приводят все факторы, влияющие на увеличение значений Hb и снижение количества эритроцитов.

Изменения МСН лежат в основе разделения анемий на нормохромные (МСН — 27–31 пг), гипохромные (МСН менее 27 пг) и гиперхромные (МСН более 31 пг). Снижение МСН наблюдается при анемиях, обусловленных нарушением



синтеза Hb (ЖДА, порфирии), повышение — при макроцитарных и особенно мегалобластных анемиях.

**МСНС** (г/дл) вычисляется по формуле:

$$\text{МСНС} = \frac{\text{Гемоглобин (г/л)}}{\text{Гематокрит (\%)}} \times 100\% \text{ (г/дл)}.$$

Различия между двумя последними индексами заключаются в том, что МСН указывает на массу Hb в одном эритроците и выражается в пикограммах. МСНС показывает концентрацию Hb в одном эритроците, то есть соотношение содержания Hb к объему клетки. Этот показатель отражает насыщение эритроцита Hb и в норме составляет 300–380 г/л. МСНС не зависит от клеточного объема и является чувствительным показателем нарушения процессов Hb-образования.

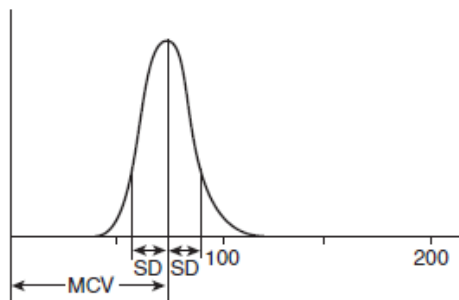
## Глава 4. Лабораторная гематология

Снижение значения *МСНС* наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся нарушением синтеза Hb. Повышение *МСНС* выше 380 г/л встречается редко: при холодовой агглютинации эритроцитов, наследственном сфероцитозе, антиретровирусной, иммуносупрессорной терапии, химиотерапии. В большинстве случаев увеличение *МСНС* свидетельствует об ошибках, допущенных при измерении пробы (погрешности определения Hb или МСВ). Поэтому данный параметр часто используется в качестве индикатора ошибок, допущенных на аналитическом или преаналитическом этапе работы.

**Ширина распределения эритроцитов по объему** (red cell distribution width — RDW) характеризует степень анизоцитоза, часто этот показатель представляют как RDW-CV. Этот показатель вычисляется большинством гематологических анализаторов на основании гистограммы распределения эритроцитов, как CV объема эритроцитов:

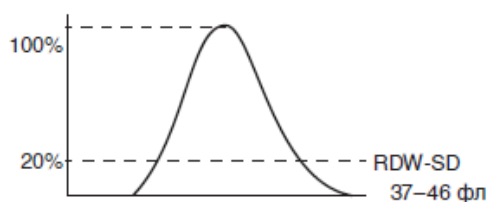
$$\text{RDW - CV (\%)} = \frac{\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100,$$

где SD — стандартное среднеквадратическое отклонение объема эритроцита от среднего значения (**рис. 4.1**).



**Рис. 4.1.** Схематическое изображение распределения эритроцитов по объему (MCV), на основании которого рассчитывается показатель анизоцитоза (RDW). SD — стандартное среднеквадратическое отклонение. На этот показатель влияет MCV, поэтому как при микроцитозе, так и при макроцитозе отмечается тенденция к увеличению RDW.

Повышение RDW предполагает присутствие смешанной популяции эритроцитов (нормоциты и микроциты или макроциты и нормоциты). Оценка прибором анизоцитоза более точная, чем при визуальном просмотре мазка крови. RDW характеризует колебания объема клеток внутри эритроцитарной популяции, этот показатель не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. Поэтому при наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным объемом (например, микроцитов) значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5–14,5%). В то же время при выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным. Таким образом, сочетание использования двух параметров — RDW и MCV — позволяет точнее характеризовать изменения в периферическом звене эритронов. **RDW-SD** определяется некоторыми гематологическими анализаторами, помимо RDW-CV. RDW-SD независим от MCV и представляет собой прямое измерение ширины эритроцитарной гистограммы на уровне 20% пика кривой. При этом высота пика RBC-гистограммы принимается за 100% (**рис. 4.2**). Референсные значения RDW-SD — 42±5 фл. Клиническое значение имеет увеличение RDW-SD >60 фл.



**Рис. 4.2.** Определение RDW-SD. Ширина эритроцитарной гистограммы на уровне 20% пика кривой

**Дополнительные показатели.** Некоторые современные гематологические анализаторы имеют параметры, позволяющие проводить более детальную характеристику популяции эритроцитов: % Мисго (микроцитов); % Масго (макроцитов); % Нуно (гипохромных эритроцитов); % Нурег (гиперхромных эритроцитов); FRC% (относительное количество) и FRC# (абсолютное количество) фрагментированных эритроцитов.

**Нормобласты (NRBC)** — ядросодержащие эритроциты, которые подсчитываются многими анализаторами в совокупности с лейкоцитами, что может быть причиной увеличения количества лейкоцитов и лимфоцитов, так как

NRBC имеют размер, аналогичный малому лимфоциту. В этих случаях необходима микроскопия окрашенных препаратов крови с последующей коррекцией истинного количества лейкоцитов. Современные гематологические анализаторы способны дифференцировать и подсчитывать NRBC отдельно, не включая их в общее число лейкоцитов. В этом случае появляется дополнительный параметр — число NRBC в относительных величинах (% или ‰ на 100 или 1000 эритроцитов) и абсолютных количествах ( $\#$  —  $\times 10^9/\text{л}$ ). Следует отметить, что порог чувствительности определения NRBC в гематологических анализаторах составляет менее 20/мкл, чего невозможно достичь при микроскопическом исследовании мазков крови.

NRBC появляются в периферической крови при онкогематологических заболеваниях, анемиях (гемолитические,  $B_{12}$ - и фолиеводефицитные), тяжелых септических состояниях и интоксикациях. Наличие в крови NRBC может расцениваться как маркер гипоксии и воспаления. Появление NRBC в послеоперационный период является плохим прогностическим признаком, предсказывающим возможный летальный исход.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1.3. Ретикулоцитарные параметры

Ретикулоциты (RET) — незрелые эритроциты, содержащие остатки рибонуклеиновой кислоты (РНК), образующиеся после потери ядер у NRBC. Ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых RET на фоне активного эритропоэза отражает повышенную регенераторную способность костного мозга. Сохраняющийся ретикулоцитоз может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении. Ретикулоцитопения — индикатор угнетения эритропоэза. Нормализация абсолютного количества RET (RET $\#$ ) — показатель восстановления пролиферативной активности эритрокариоцитов в костном мозге. Исследование RET используется для: оценки активности эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей; детекции нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов  $B_{12}$ ,  $B_6$ , фолатов, меди и мониторинга терапии; оценки состояния эритропоэза на фоне лечения Эритропоэтином<sup>®</sup> (ЭПО), железосодержащими препаратами, витамином  $B_{12}$ ; оценки способности костного мозга к регенерации после цитотоксической терапии и трансплантации костного мозга; оценки восстановления синтеза ЭПО после трансплантации почки.

Современные гематологические анализаторы предоставляют следующие параметры RET:

- **RET%** — относительное количество ретикулоцитов, %;
- **RET $\#$**  — абсолютное количество ретикулоцитов,  $\times 10^9/\text{л}$ ;
- **MCVr** — средний объем ретикулоцитов, фл;
- **CHCMr** — средняя концентрация гемоглобина в ретикулоцитах, г/дл;
- **CHr (RET-He)** — среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, пг.

По интенсивности включения красителя РНК в клетку RET разделяются по степени зрелости на три популяции:

- **LFR%** — популяция малых зрелых ретикулоцитов (87–99%);
- **MFR%** — популяция средних ретикулоцитов (2–12%);
- **HFR%** — популяция больших незрелых ретикулоцитов (1–2%);
- **IRF (Immature Reticulocyte Fraction)** — фракция незрелых ретикулоцитов, определяется как  $MFR + HFR$  (норма — 2–14%).

Параметры CHCMr и CHr характеризуют эритропоэз последних 5–7 дней и показывают содержание Hb во вновь образованных клетках, в отличие от MCH, который отражает картину эритропоэза последних 8–12 нед. Снижение этих параметров является ранним индикатором нарушения синтеза Hb, в частности при дефиците железа. Важно отметить, что на значения CHr не оказывает влияние наличие воспаления в организме. Снижение CHr менее 28 пг свидетельствует о наличии железодефицитного эритропоэза. Кроме того, данный параметр является ранним маркером оценки ответа на заместительную терапию железосодержащими препаратами, его повышение наблюдается через 48 ч после начала лечения.

**IRF** используется в качестве индикатора активности эритропоэза, а также для дифференциальной диагностики анемий с высокой активностью эритропоэза (гемолитическая анемия, постгеморрагическая анемия), при которых будет наблюдаться усиленная продукция RET, включая их незрелую фракцию и повышенное значение показателя IRF, и анемий с низкой активностью эритропоэза [апластическая анемия (АА), химиотерапия, парциальная красноклеточная аплазия при парвовирусной инфекции], при которых наблюдается снижение IRF.

Увеличение IRF свидетельствует об ускоренном выбросе незрелых клеток из костного мозга. IRF повышается, как правило, на 2 дня раньше, чем процент RET, и может служить наиболее чувствительным маркером в мониторинге за состоянием эритропоэтической активности костного мозга и эффективности лечения витамином  $B_{12}$ , фолиевой кислотой, препаратами железа и Эритропоэтином<sup>®</sup>.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1.4. Тромбоцитарные параметры

Количество **тромбоцитов** (platelet — PLT) подсчитывается кондуктометрическим методом, как клетки размером менее 36 фл (PLTi). В ряде современных гематологических анализаторов применяются дополнительные технологии для

подсчета тромбоцитов: оптический метод (PLTo), флюоресцентный и иммунологический с использованием моноклональных антител, которые позволяют дифференцировать мелкие эритроциты и их фрагменты от тромбоцитов и осуществлять более точный подсчет клеток. Для большинства современных гематологических анализаторов CV показателя PLT не превышает 5%.

**Средний объем тромбоцитов** (mean platelet volume — MPV) варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом. «Молодые» тромбоциты имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза MPV возрастает. Увеличение MPV наблюдается также при активации тромбообразования. *Увеличение MPV* наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, СД, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом, детей с врожденными пороками сердца «синего типа». Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях. *Уменьшение MPV* отмечается после спленэктомии, при рецидиве болезни Крона и неспецифическом язвенном колите.

MPV применяется в качестве дифференциально-диагностического маркера при тромбоцитопениях. Увеличение MPV более 7,9 фл свидетельствует о гипердеструктивной тромбоцитопении, снижение ниже 7,4 фл позволяет прогнозировать гипопродуктивную форму тромбоцитопении.

**Ширина распределения тромбоцитов по объему** (platelet distribution width — PDW) измеряется в процентах (CV тромбоцитометрической кривой) и количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам (степень анизоцитоза тромбоцитов). В норме этот показатель составляет 10–20%.

Увеличение PDW одновременно со снижением MPV свидетельствует о преобладании микротромбоцитов и указывает на угнетение тромбоцитопоэза. Сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа макротромбоцитов — усиление продукции тромбоцитов. Увеличение PDW является диагностическим признаком развития деструктивной тромбоцитопении. *Увеличение PDW* может наблюдаться при миелопролиферативных заболеваниях. *Уменьшение PDW* наблюдается при ЖДА.

**Тромбокрит** (platelet crit — PCT, %) отражает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами. В норме PCT составляет 0,15–0,4%. PCT является чувствительным показателем в оценке риска возникновения кровотечений.

*Снижение PCT* <0,1% коррелирует с возникновением послеоперационных кровотечений у пациентов с развивающейся тромбоцитопенией. *Повышение PCT* увеличивает риск тромбозов.

Современные гематологические анализаторы позволяют определять ряд дополнительных параметров, таких как:

количество крупных тромбоцитов [L-PLT (large platelet, %,  $10^9/\text{л}$ ); P-LCR (%); P-LCC ( $10^9/\text{л}$ )]; IPF (%rP) — фракция незрелых тромбоцитов (или процент ретикулярных тромбоцитов).

Увеличение числа крупных тромбоцитов происходит при усилении тромбоцитообразования или при формировании тромбов и является более ранним маркером, чем изменение числа тромбоцитов. IPF отражает состояние костномозгового тромбоцитопоэза и является индикатором скорости тромбоцитообразования в костном мозге. При активном тромбоцитопоэзе повышение IPF в среднем на неделю опережает подъем числа тромбоцитов.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1.5. Лейкоцитарные параметры

Измерение **лейкоцитов** (white blood cells — WBC) на гематологических анализаторах происходит после полного лизиса эритроцитов специальным реагентом. Все частицы объемом более 35 фл подсчитываются как лейкоциты. CV при автоматическом определении этого показателя составляет 1–3%, в то время как при ручном подсчете — 6,5–15% в зависимости от числа лейкоцитов.

*Гематологические анализаторы 3Diff*, анализирующие клетки крови на основе кондуктометрической технологии, распределяют лейкоциты на три популяции: лимфоциты, лейкоциты среднего размера (сумма моноцитов, эозинофилов и базофилов) и нейтрофилы. Эта технология не позволяет полностью дифференцировать клетки, входящие в лейкоцитарную формулу. *Гематологические анализаторы 5Diff* дифференцируют лейкоциты с использованием технологии проточной цитометрии на основе определения размера, формы и гранулярности клеток и представляют популяции в виде скатерограммы в трехмерном изображении. Гематологические анализаторы не могут разделить сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы, что в значительной мере компенсируется не только относительным, но и абсолютным подсчетом как общей популяции лейкоцитов, так и субпопуляции нейтрофилов.

Некоторые высокотехнологические анализаторы способны оценивать наличие незрелых гранулоцитов, проводить оценку стволовых гемопоэтических клеток. Использование таких приборов позволяет повысить точность дифференциального подсчета лейкоцитов, провести скрининг нормы и патологии, динамический контроль за лейкоцитарной формулой и сократить ручной подсчет лейкоцитарной формулы.

**IMG% (IG), IMG# (IG)** (фракция незрелых гранулоцитов) — параметр, дающий представление об относительном и абсолютном количестве (% , #) незрелых гранулоцитов (сумма промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов).

Незрелые гранулоциты появляются в периферической крови при инфекциях, воспалительных заболеваниях, сепсисе, миелопролиферативных неоплазиях, выходе из агранулоцитоза, осложнениях при химиотерапии. Мониторинг за показателем незрелых гранулоцитов используется с целью прогноза течения воспалительного процесса и эффективности проводимой терапии.

Ограниченное число клеток, анализируемое при подсчете лейкоцитарной формулы, неравномерное распределение лейкоцитов в окрашенном препарате, использование нестандартизированных методов подсчета являются главными причинами существенного разброса результатов ручного и автоматического анализа лейкоцитарной формулы. В то же время при микроскопическом исследовании врач оценивает в полном объеме морфологию клетки (ядерно-цитоплазматическое отношение, структуру распределения хроматина и особенности окраски ядра, наличие зернистости или включений в цитоплазме, признаки дисплазии), что позволяет ему выявлять патологические изменения лейкоцитов, недоступные для анализатора.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.1.6. Скорость оседания эритроцитов

СОЭ — показатель, входящий в ОАК. СОЭ рассматривается как неспецифический тест, изменяющийся в зависимости от целого ряда физиологических и патологических факторов. Многие факторы влияют на результаты этого теста. Основное влияние на СОЭ оказывают поверхностный заряд клеток и диэлектрическая компонента плазмы.

Поверхностный заряд определяется наличием на поверхности эритроцита большого количества гликопротеидов. За счет постоянного отрицательного электростатического заряда эритроциты в потоке отталкиваются друг от друга и не образуют агрегатов. Отсутствие эритроцитарных агрегатов обеспечивает постоянный ток крови по сосудам.

Воспаление — это во всех случаях активация протеолитического процесса. Протеолитические ферменты плазмы разрушают реакционные группы гликопротеидов эритроцитов и нивелируют поверхностный заряд. В результате эритроциты теряют способность к электростатическому отталкиванию, собираются в агрегаты и быстро оседают. После завершения воспалительного процесса и снижения активности протеолиза эритроциты уже не могут восстановить реакционные группы на поверхности, так как у них отсутствует система синтеза белков. Эритроцит остается без поверхностного заряда до конца своей жизни. Поэтому СОЭ сохраняется ускоренной и после выздоровления, постепенно нормализуясь по мере замены «старых» эритроцитов на новые. Основной недостаток СОЭ как показателя воспаления — длинный «хвост» после выздоровления, нормализация СОЭ всегда затянута.

Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) для определения СОЭ рекомендован метод Вестергрена (Westergren), при классической постановке он проводится на венозной крови в капилляре длиной 200 мм. Серийно выпускаются автоматические анализаторы СОЭ, которые на основе кинетических измерений экстраполируют результаты к методу Вестергрена. В нашей стране исторически более распространенным является метод Панченкова, в котором используется капилляр длиной 100 мм, он не автоматизирован и не снабжен системой документирования результатов. Хотя метод Панченкова недорог и прост, он требует не менее 1 ч для выполнения и проводится вручную. Методы Панченкова и Вестергрена в диапазоне нормальных значений (1–20 мм/ч) хорошо коррелируют между собой. Однако при увеличении значений СОЭ метод Вестергрена дает более высокие цифры (до 200 мм/ч), это, в частности, связано с тем, что метод Панченкова имеет измерительную шкалу лишь до 100 мм.

Увеличение СОЭ наблюдается при воспалительных процессах, интоксикациях, острых и хронических инфекциях, при ИМ, опухолях, после кровопотери, оперативных вмешательств. При острых воспалительных и инфекционных процессах ускорение СОЭ наступает через 24 ч. Особенно выраженное ускорение СОЭ (60–80 мм/ч) характерно для парапротеинемических гемобластозов (ММ, МВ, острый плазмобластный лейкоз) и моноклональных гаммапатий, сопутствующих злокачественным новообразованиям, хроническому гепатиту, циррозу печени, туберкулезу, амилоидозу, заболеваниям соединительной ткани. Замедление СОЭ наблюдается при эритремии и симптоматических эритроцитозах.

Некоторые гематологические анализаторы имеют отдельный модуль для определения количества С-реактивного белка (СРБ) нефелометрическим методом, являющегося компонентом неспецифического острофазного иммунного ответа. Синтез СРБ происходит в печени и при тяжелых воспалительных процессах возрастает более чем в 1000 раз. Особенностью СРБ является высокая корреляция его концентрации в крови с активностью заболевания, что отличает СРБ от СОЭ. Именно поэтому измерение значений СРБ широко применяется для мониторинга и контроля эффективности терапии бактериальных и вирусных инфекций, хронических воспалительных заболеваний, онкологических заболеваний, осложнений в хирургической практике и др.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.2. Исследование пунктата костного мозга

#### 4.2.1. Подготовка материала для исследования

Качество цитологических препаратов костного мозга (КМ) является условием успешного анализа количественного и качественного состава клеток, а также оценки их диспластических изменений. Количество аспирационной взвеси клеток зависит от объема и характера предполагаемых исследований. Для приготовления мазков КМ требуется не более 0,5 мл аспирата. Дальнейшее увеличение объема аспирата приводит к разведению его периферической кровью. Если аспират КМ помещают в пробирку с антикоагулянтом  $K_2$ -ЭДТА, то срок хранения материала для приготовления мазков не должен превышать 2 ч, поскольку клетки подвергаются дегенеративным изменениям (вакуолизация цитоплазмы, пельгеризация ядра, образование апоптотических телец). Для проведения молекулярно-генетических, цитогенетических и иммунофенотипических исследований костный мозг помещается в пробирки с соответствующим антикоагулянтом (гепарин,  $K_2$ -ЭДТА). С целью проведения иммунофенотипирования методом проточной цитометрии достаточно 0,5–1 мл КМ, взятого в пробирку с  $K_2$ -ЭДТА, однако для оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) исследуемый объем полученного материала увеличивается до 2–3 мл.

Учитывая повышенную свертываемость костного мозга, необходимо делать мазки быстро. Существует два способа приготовления мазков костного мозга. Первый аналогичен приготовлению мазков из периферической крови. Другой способ основан на приготовлении мазков непосредственно из «крошки» КМ, которая содержит стромальные элементы и миелокариоциты. Для этого часовое стекло (предметное стекло, чашка Петри), на котором находится взвесь КМ, наклоняют, чтобы стекла вся жидкая часть КМ, и пастеровской пипеткой или углом стекла собирают белые комочки («крошку») и помещают на середину чистого предметного стекла. Затем «крошку» накрывают другим предметным стеклом, придавливают осторожно, этого достаточно для раздавливания костномозговых частиц, и делают движение, растягивая два стекла в разные направления вдоль длины стекла. Такой способ приготовления мазков позволяет сконцентрировать клетки, получить более высокую клеточность, оценить элементы стромы костного мозга. Обычно

делают два препарата из «крошки» и шесть-восемь препаратов из аспирата костного мозга. Препараты аспирата КМ маркируются после высушивания материала с указанием фамилии, имени и отчества, даты взятия материала. Маркировку препаратов осуществляет врач, выполнивший пункцию КМ. Из полученных или приготовленных непосредственно в лаборатории 10 мазков для цитологического исследования отбираются пять, остальные пять мазков предназначены для цитохимического исследования клеток КМ. На первом этапе фиксируются и окрашиваются три мазка, при необходимости (при первичном обследовании пациента, поиске метастазов злокачественного новообразования, клеток Рид–Штернберга) дополнительно окрашивают и изучают все оставшиеся мазки КМ. Окрашенные препараты хранятся в архиве в течение 20 лет.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.2.2. Миелограмма

Миелограмма отражает клеточность костного мозга, процессы пролиферации и дифференцировки отдельных ростков кроветворения, его клеточный состав и функциональное состояние костного мозга, морфологические признаки дисплазии. Характеристика костномозгового кроветворения включает оценку клеточности КМ; процентного соотношения ростков кроветворения; индексов миелограммы; описание миелограммы (процессов пролиферации и созревания различных ростков кроветворения, морфологических особенностей клеточных элементов гемопоэза, признаков дисплазии в ростках гемопоэза).

*Оценка клеточности* КМ и количества мегакариоцитов проводится камерным методом или ориентировочно при микроскопии окрашенных мазков. Количество миелокариоцитов считается нормальным, если при подсчете в камере Горяева их число колеблется в пределах от  $41 \times 10^9$  до  $195 \times 10^9/\text{л}$  (по данным Соколова В.В., Грибовой И.А.) либо при просмотре препарата с иммерсионным объективом в каждом поле зрения встречается 15–25 миелокариоцитов. В подсчет миелокариоцитов не включаются остеобласты, остеокласты, макрофаги, мегакариоциты, комплексы или разрозненно лежащие клетки метастазов рака, стромальные и разрушенные клетки. У здоровых лиц клеточность КМ зависит от возраста, у новорожденных детей КМ гиперклеточный, у лиц старше 70 лет клеточность КМ снижается. Количество мегакариоцитов варьирует в пределах  $50\text{--}150 \times 10^6/\text{л}$  (при подсчете в камере) или от 2 до 7 мегакариоцитов в окрашенных мазках КМ при нормальном числе тромбоцитов в гемограмме. Исследование миелограммы включает:

- просмотр мазков КМ под малым увеличением ( $\times 10$ ), целями которого являются оценка клеточности и характера костномозгового пунктата (полиморфный или мономорфный по составу), выявление крупных клеточных элементов или скоплений клеток (мегакариоциты, клетки Гоше, клетки Ниманна–Пика, метастазы в КМ), а также выбор места для подсчета миелограммы;
- расчет КМ индексов: лейкоэритробластическое соотношение, индекс созревания нейтрофилов, индекс созревания эритрокариоцитов, парциальная эритронормобластограмма; описание миелограммы.

Согласно стандарту, при исследовании КМ подсчитывается 500 миелокариоцитов. Подсчет большего числа миелокариоцитов требуется при получении пограничного результата, например 19% бластных клеток (в случае дифференциальной диагностики ОЛ или МДС) или 4,5% бластных клеток при оценке ремиссии.

*Лейкоэритробластическое соотношение* определяет соотношение клеток белого ростка (гранулоцитарного, моноцитарного и лимфоидного) к эритроидным ядродержащим клеткам. В норме соотношение равно 2,1–4,5. *Индекс созревания нейтрофилов* отражает соотношение незрелых и зрелых нейтрофилов костного мозга:

$$\text{ИСН} = \frac{\text{ПроМц} + \text{Мц} + \text{МетаМц}}{\text{П/Я} + \text{С/Я}},$$

где ПроМц — промиелоциты; Мц — миелоциты; МетаМц — метамиелоциты; П/Я — палочкоядерные нейтрофилы; С/Я — сегментоядерные нейтрофилы. В норме индекс созревания нейтрофилов составляет 0,5–0,9. При нормальной или высокой клеточности КМ повышение индекса созревания нейтрофилов свидетельствует о задержке созревания нейтрофилов, при сниженной — о повышенной элиминации зрелых нейтрофилов из костного мозга. Снижение индекса созревания нейтрофилов при повышенной клеточности КМ указывает на задержку выхода зрелых нейтрофилов; при бедном костном мозге — на разведение его периферической кровью.

Для разведения КМ периферической кровью характерна совокупность следующих признаков: низкая клеточность костного мозга; резкое увеличение лейкоэритробластического соотношения; снижение индекса созревания нейтрофилов; отсутствие мегакариоцитов (при нормальном количестве тромбоцитов в периферической крови); близость процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов к их числу в крови пациента. При высокой степени разведения аспирата КМ периферической кровью адекватно оценить костномозговое кроветворение невозможно.

*Индекс созревания эритрокариоцитов* отражает соотношение гемоглобинизированных эритрокариоцитов (полихроматофильных и оксифильных) ко всем клеткам эритроидного ряда:

$$\text{ИСЭ} = \frac{\text{Полихроматические нормобласты} + \text{оксифильные нормобласты}}{\text{Общее количество эритрокариоцитов}}.$$

Нормальные значения: 0,8–0,9.

Снижение индекса созревания эритрокариоцитов свидетельствует о задержке гемоглобинизации (гипохромные анемии) или увеличении количества незрелых стадий эритрокариоцитов (дизэритропоэтические анемии); повышение

индекса созревания эритрокариоцитов — об ускорении гемоглобинизации. Индекс созревания эритрокариоцитов не всегда в полной мере отражает изменения, происходящие в эритроидном ростке.

При усиленной пролиферации эритроидных элементов можно оценить парциальную эритронормобластограмму, которая выявляет соотношение базофильных (пронормобласты + базофильные NRBC), полихроматофильных и оксифильных форм эритрокариоцитов. *Нормальное соотношение:* (базофильные формы) : (полихроматофильные NRBC) : (оксифильные NRBC) = 1:(2–4):(1,5–2). Для нормального эритропоэза характерно преобладание полихроматофильных NRBC (в 2–4 раза больше, чем базофильных форм). Количество оксифильных форм занимает промежуточное положение между базофильными и полихроматофильными клеточными элементами.

Уменьшение относительного содержания полихроматофильных и оксифильных форм расценивается как задержка созревания на стадии базофильных NRBC либо является результатом повышения неэффективного эритропоэза (например, МДС). Снижение относительного содержания оксифильных форм при нормальных или высоких показателях полихроматофильных форм расценивается как задержка гемоглобинизации на стадии полихроматофильных NRBC (гипохромные анемии). Гемолитические анемии, острые постгеморрагические анемии характеризуются усилением пролиферации элементов эритропоэза без нарушения созревания.

## Глава 4. Лабораторная гематология

После дифференцированного подсчета клеточных элементов различных ростков кроветворения оцениваются морфологические особенности клеток, кинетика созревания и формулируется заключение по миелограмме в целом при обязательном сопоставлении с показателями гемограммы.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.2.3. Цитохимические исследования гемопоэтических клеток

Основное применение цитохимические методы находят в диагностике гемобластозов. Цитохимические реакции в онкогематологии используются для установления варианта ОЛ и бластного криза хронического миелолейкоза (ХМЛ); дифференциальной диагностики первичного миелофиброза и ХМЛ; диагностики волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) и лимфомы селезенки с отрубчатými лимфоцитами.

**Миелопероксидаза (МПО)** локализуется преимущественно в специфических азурофильных гранулах в цитоплазме гранулоцитов и является маркером клеток миелоидного ряда. МПО выявляется в клетках гранулоцитарного ряда, начиная с миелобласта. В сегментоядерных нейтрофилах здоровых людей выявляется высокая активность МПО в виде гранул, заполняющих цитоплазму. Самая высокая активность фермента наблюдается в зрелых эозинофилах. В базофильных промиелоцитах и миелоцитах активность МПО, как правило, высокая, однако по мере дифференцировки их в зрелые клетки активность фермента снижается. Слабоположительная реакция на МПО наблюдается в различных проценте моноцитов в виде немногочисленных рассеянных гранул. В эритрокариоцитах, лимфоцитах, базофилах МПО не определяется.

**Клиническое значение.** Цитохимическое определение МПО используется главным образом с целью диагностики ОЛ. При острых миелобластных лейкозах активность фермента в опухолевых клетках варьирует от умеренной до выраженной в зависимости от степени дифференцировки бластов. При острых монобластных лейкозах реакция на МПО в опухолевых клетках слабая, при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) — отрицательная.

**Липиды** обнаруживаются практически во всех лейкоцитах за исключением лимфоцитов. Основная масса липидов связана с клетками гранулоцитарного ряда. Они входят в состав специфической зернистости нейтрофильных гранулоцитов, эозинофилов и накапливаются по мере созревания клеток. В миелобластах обычно имеется скудное количество гранул, локализующихся в перинуклеарной зоне, в промиелоцитах их становится несколько больше, в миелоцитах и метамиелоцитах содержание суданофильных гранул высокое. В зрелых нейтрофилах липиды заполняют всю цитоплазму.

**Клиническое значение.** При дифференциальной диагностике ОЛ обычно липиды выявляются параллельно с МПО, но могут обнаруживаться и в менее зрелых миелобластах в отсутствие МПО, то есть являются более чувствительным маркером миелоидной дифференцировки.

При диагностике ОЛ для подтверждения миелоидной природы бластов необходимо выявление 3% и более бластных клеток, положительных по МПО и/или липидам. Появление отдельных сегментоядерных нейтрофилов, не содержащих липиды, отмечается при ХМЛ.

**PAS-реакция** — это реакция выявления гликозаминогликанов с помощью реактива Шиффа и йодной кислоты. В гранулоцитарном ростке концентрация гликозаминогликанов нарастает по мере созревания клеток. Диффузное окрашивание цитоплазмы обычно свойственно наиболее молодым клеткам — миелобластам, промиелоцитам, миелоцитам. На всех стадиях дифференцировки клеток эритроидного ряда PAS-реакция отрицательная. В норме 10–40% лимфоцитов периферической крови содержат PAS-положительный материал, располагающийся в виде гранул вокруг ядра.

**Клиническое значение.** При диагностике острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) бластные клетки могут быть либо PAS-отрицательными, либо обнаруживать слабодиффузное окрашивание цитоплазмы. Яркое диффузное окрашивание цитоплазмы наблюдается только при остром промиелоцитарном лейкозе. При ОЛЛ PAS-реакция в бластных клетках гранулярная в виде средних и крупных гранул, располагающихся в цитоплазме венчиком вокруг ядра, иногда сливающихся в блоки. Количество клеток с таким характером PAS-реакции значительно варьирует. Выявление PAS-положительного вещества в виде гранул в эритрокариоцитах является одним из признаков дизэритропоэза.

**Неспецифическими эстеразами (НЭ)** обозначают ферменты, способные гидролизовать простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот. Все НЭ являются лизосомальными ферментами.

При использовании в качестве субстрата *а-нафтилацетата* выявляется резко положительная реакция НЭ преимущественно в клетках моноцитарного ряда, которая ингибируется фторидом натрия (NaF), в то время как в клетках других ростков кроветворения она не поддается.

*Клиническое значение.* Определение активности НЭ используется для идентификации лейкозных моноцитарных предшественников. Эти клетки проявляют высокую активность НЭ с субстратами бутиратом, ацетатом и AS-D-ацетатом, которая в значительной степени ингибируется NaF.

**Кислая фосфатаза (КФ)** проявляет наиболее высокую активность в ПК, мегакариocyтах, тромбоцитах, моноцитах и макрофагах, гранулоцитарных предшественниках.

*Клиническое значение.* Определение активности КФ имеет значение в диагностике ВКЛ. Часто при ВКЛ в клетках выявляется тартрат-резистентная КФ. Активность КФ в лимфоцитах при лимфоме маргинальной зоны селезенки низкая или отсутствует.

**Щелочная фосфатаза (ЩФ)** присуща только зрелым клеткам гранулоцитарного ряда, преимущественно нейтрофилам. Изредка в эозинофилах имеет место фоновая окраска цитоплазмы, но не гранул. Базофилы не содержат ЩФ как в норме, так и при патологических состояниях. В лимфоцитах, моноцитах, эритроцитах и тромбоцитах реакция на ЩФ отрицательная.

*Клиническое значение.* Определение активности ЩФ ранее активно применялось для дифференциальной диагностики ХМЛ от других миелопролиферативных заболеваний и реактивных изменений в гемограмме. Активность ЩФ увеличивается при истинной полицитемии (ИП), первичном миелофиброзе, бактериальных инфекциях и резко снижается при ХМЛ. Низкие показатели ЩФ почти всегда обнаруживаются при Ph-позитивном ХМЛ. У больных с ХМЛ в период ремиссии может отмечаться нормальная или даже повышенная активность ЩФ.

Глава 4. Лабораторная гематология

**Сидеробласты и сидероциты** — это NRBC (эритробласты) и эритроциты, содержащие в цитоплазме негемоглобиновое железо в виде гранул. Соединения железа не обнаруживаются в лейкоцитах, тогда как выявление их в эритрокариocyтах информативно для изучения неэффективного эритропоэза и диагностики некоторых вариантов МДС. При этих заболеваниях железо, поступающее в эритробласты, не используется для синтеза Hb, а откладывается в эритрокариocyтах, в костномозговых макрофагах в виде гемосидерина или ферритина. Исследование сидеробластов в КМ дает полезную информацию для оценки накопления железа в организме.

*Клиническое значение.* Истощение запасов железа происходит при ЖДА и сопровождается снижением количества сидеробластов. Избыточное накопление наблюдается при идиопатическом и приобретенном гемохроматозе, хронической гемолитической анемии, талассемии и МДС, что приводит к увеличению числа сидеробластов.

Глава 4. Лабораторная гематология

4.3. Высокотехнологичные лабораторные исследования гемобластозов

4.3.1. Многоцветная проточная цитометрия

Проточная цитометрия играет ключевую роль в онкогематологии. Основные диагностические возможности иммунофенотипирования в онкогематологии представлены в **табл. 4.6**.

**Таблица 4.6.** Возможности многоцветной проточной цитометрии

Клиническое значение
Диагностика ОЛЛ и ОМЛ, смешанно-линейного ОЛ
Диагностика и дифференциальная диагностика В-клеточных лимфопролиферативных новообразований, моноклонального В-клеточного лимфоцитоза (МВКЛ)
Диагностика и дифференциальная диагностика Т-клеточных лимфопролиферативных новообразований
Диагностика ММ и других моноклональных гаммапатий
Определение МОБ при ОЛ, ХЛЛ, других неходжкинских лимфомах, ММ
Диагностика ПНГ и мониторинг ПНГ-клона в процессе терапии
Подсчет гемопоэтических стволовых клеток периферической крови и костного мозга
Мониторинг CD20-позитивных В-лимфоцитов в динамике терапии анти-CD20-моноклональными антителами

Широкое использование многоцветной проточной цитометрии в онкогематологии привело к качественно новой диагностике лейкозов и лимфом, а также к разработке новых подходов к оценке эффективности лечения и мониторинга МОБ, определяющей дальнейшую тактику ведения больных.

DxFLEX от Beckman Coulter — передовой проточный цитометр для диагностики in vitro (РЗН 2022/18713). Высокая чувствительность и простота управления DxFLEX позволяют легко стандартизировать клинические исследования и превратить проточную цитометрию в мощный инструмент для решения любых диагностических задач.

- Гибкая конфигурация. Возможность выбора конфигураций из 7 доступных — от 1 до 3 и от 4 до 13 каналов детекции флуоресценции.
- Высокая чувствительность. Уникальная конструкция проточной кюветы и инновационная оптика с модулем детекции, включающим высокоэффективные твердотельные детекторы, обеспечивают высокую чувствительность и разрешение сигнала.



- Высокая точность. Автоматические алгоритмы обработки данных позволяют получать достоверные результаты, что является важным в диагностике иммунодефицитных и лимфопролиферативных заболеваний.
- Высокая производительность. Скорость анализа данных до 30 000 соб/с и автоматический карусельный загрузчик на 32 пробирки позволяют автоматизировать рутинные исследования и значительно снизить время сбора данных.
- Легкость в использовании. Компактный цитометр с интуитивно понятным интерфейсом, упрощенными системами настройки, сбора данных и экспорта результатов, простой в эксплуатации и обслуживании, минимизирует время на обучение персонала и ускоряет выполнение операций.

Проточный цитометр DxFLEX позволит вам сосредоточиться на ваших клинических исследованиях и изменит ваше представление о многоцветной проточной цитометрии.

Официальный дистрибьютор Beckman Coulter в России —

АО «БиоХимМак Диагностика», [www.biochemmack.ru](http://www.biochemmack.ru). На правах рекламы

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.3.2. Молекулярно-генетические исследования

Показания к молекулярно-генетическому исследованию при заболеваниях системы крови определяются рекомендациями российского и международного сообществ. Современная классификация миелоидных и лимфоидных неоплазий базируется на обнаружении молекулярных маркеров, определяющих вариант ОМЛ, ОЛЛ, стратификацию на группы риска и комбинацию химиотерапевтических, гипометилирующих и таргетных препаратов в лечении. При ОМЛ и ОЛЛ для первичного исследования используют 2–2,5 мл аспирата КМ, взятого в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. При невозможности получения КМ материалом для исследования может служить кровь при количестве бластов не менее 30%. Основными методами являются полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), секвенирование по Сэнгеру и секвенирование нового поколения (Next-generation sequencing — NGS). В дальнейшем проводится оценка МОБ с высокой чувствительностью ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$ ). Для миелопролиферативных неоплазий, как при первичной диагностике, так и для мониторинга МОБ и контроля эффективности терапии, используются молекулярные исследования. С целью определения Т- и В-клеточной клональности для диагностики В-клеточных и Т-клеточных неходжкинских лимфом и лейкозов, дифференциальной диагностики опухолевой и реактивной лимфоидной пролиферации используется аллель-специфичная ПЦР-РВ. Однако клональные перестройки следует учитывать с данными клиники, морфологии и иммунофенотипирования.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.4. Реактивные изменения крови

#### 4.4.1. Лейкоцитоз и лейкопения

**Лейкоцитоз** — увеличение количества лейкоцитов более  $9 \times 10^9/\text{л}$ , может быть нейтрофильный, эозинофильный, моноцитарный, лимфоцитарный, редко вследствие увеличения другого вида клеток, например бластных. Наиболее часто имеет место нейтрофильный лейкоцитоз, или нейтрофилез, при котором абсолютное количество нейтрофилов превышает  $6,4 \times 10^9/\text{л}$ . Патогенетические механизмы и заболевания, сопровождающиеся нейтрофилезом в гемограмме, приведены в **табл. 4.7**.

**Лейкопения** — снижение содержания лейкоцитов в крови менее  $4,0 \times 10^9/\text{л}$ . Возникает обычно как следствие **нейтропении**, при этом абсолютное содержание нейтрофилов в крови составляет  $<2,0 \times 10^9/\text{л}$ . Падение абсолютного числа нейтрофилов  $<0,5 \times 10^9/\text{л}$  обозначают как агранулоцитоз. Лейкопения с нейтропенией, палочкоядерным сдвигом, токсогенной зернистостью свидетельствует о резком истощении костномозгового гранулоцитарного резерва и является крайне неблагоприятным прогностическим признаком. Выраженная нейтропения всегда связана с повышенным риском развития инфекции. Нейтропения может иметь различный генез (**табл. 4.8**).

**Таблица 4.7.** Клинико-диагностическое значение нейтрофилеза

Вид лейкоцитоза	Патогенетические механизмы	Клиническая ситуация
Реактивный (перераспределительный)	Перераспределение пристеночного и циркулирующего пула нейтрофилов, мобилизация костномозгового пула нейтрофилов	Физическая нагрузка, прием пищи, физиотерапевтические процедуры, горячие и холодные ванны, боль, стресс, послеоперационные состояния
	Гипоксия	Острые и хронические анемии (острая кровопотеря, гемолиз и др.)
Стимуляция лейкопоэза	Инфекционные агенты, токсины	Абсцесс, остеомиелит, ангина, скарлатина, дифтерия, отит, пневмония, аппендицит, пиелонефрит, менингит, сепсис, перитонит
	Воспаление и некроз тканей (факторы воспаления и тканевого распада)	Эмпиема плевры, инфаркт органов, атака ревматизма, обширные ожоги и травмы, операция, злокачественные новообразования и др.



	Эндогенные интоксикации	Ацидоз, эклампсия, уремия, синдром Кушинга, подагра
	Лекарственные препараты	Колонистимулирующий фактор, глюкокортикоиды, препараты лития, эпинефрин (Адреналин <sup>▲</sup> ) и др.
Опухолевый	Лейкозная пролиферация клеток	Хронические лейкозы (ИП, нейтрофильный лейкоз)

**Таблица 4.8.** Этиологические факторы нейтропении

Наследственная	Приобретенная
Циклическая нейтропения	Инфекции, постинфекции
Доброкачественная семейная нейтропения	Лекарственная (антибиотики, противогрибковые, противомалярийные, психотропные, нестероидные противовоспалительные препараты, диуретики, цитостатики, сердечно-сосудистые препараты)
Редкие синдромы: Чедиака–Хигаси, Швахмана–Даймонда, синдром Костманна	Экзогенные факторы: ионизирующая радиация, химические агенты
АА (анемия Фанкони, Блекфена–Даймонда, врожденный дискератоз)	Аутоиммунная (первичная, вторичная, синдром Фелти)
<b>WHIM-синдром</b> (первичный иммунодефицит)	<b>АА</b>
	<b>Лейкозы</b> [ОМЛ, МДС, ММ, лимфомы, ХЛЛ, Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ)], миелофтиз
	<b>Дефицит В<sub>12</sub>, фолатов, меди</b>
	<b>Диета</b>

Нейтропения возникает вследствие: снижения продукции нейтрофилов в костном мозге; истощения гранулоцитарного костномозгового резерва; замедления выхода нейтрофильных гранулоцитов из костного мозга; повышенной деструкции в сосудистом русле и уменьшения времени циркуляции; перераспределения нейтрофильных гранулоцитов в сосудистом русле.

*Этническая нейтропения.* У некоторых лиц африканского и ближневосточного происхождения нормальные абсолютные значения нейтрофилов находятся в диапазоне от  $0,5$  до  $1,5 \times 10^9/\text{л}$ , реже — ниже. Этническая нейтропения связана с однонуклеотидным полиморфизмом (Single Nucleotide Polymorphism — SNP) в гене, кодирующем Duffy antigen receptor for chemokine (DARC), который также является рецептором для малярийного плазмодия. Потеря экспрессии антигена группы крови Duffy превалирует в эндемичных по малярии регионах, где и распространена этническая нейтропения.

## Глава 4. Лабораторная гематология

**Эозинофилия** — увеличение количества эозинофилов в крови более  $0,4 \times 10^9/\text{л}$ . Эозинофильные реакции сопровождают ответ на активирующее действие многих факторов: гистамин (фактор хемотаксиса эозинофилов), IgE, C3a, C5a, интерлейкин (IL)-5, IL-2, IL-8 и др. Эозинофилия — частый симптом аллергических заболеваний различной локализации (бронхиальная астма, атопические экземы, сенная лихорадка, пищевая аллергия). Хорошо известна взаимосвязь эозинофилии с гельминтозами. Хемотаксис эозинофилов и распознавание ими паразитов осуществляются за счет факторов, продуцируемых клетками воспаления, и продуктов жизнедеятельности паразитов. Эозинофилия обнаруживается при многих заболеваниях, включая злокачественные новообразования (**табл. 4.9**), в фазе выздоровления от инфекционных заболеваний. Выраженная эозинофилия может иметь место при применении антибиотиков, сульфаниламидных препаратов, ацетилсалициловой кислоты (Аспирина<sup>▲</sup>), аминофиллина (Эуфиллина<sup>▲</sup>), преднизолона и др.

**Таблица 4.9.** Клинико-диагностическое значение эозинофилии

Патогенетические механизмы	Заболевания
Инвазия паразитами	Аскаридоз, трихинеллез, токсокароз, эхинококкоз, шистосомоз, филяриатоз, стронгилоидоз, описторхоз, анкилостомидоз, лямблиоз
Опухолевая пролиферация (повышенная продукция IL-5)	Гиперэозинофильный синдром, лимфогранулематоз, острые и хронические лейкозы, лимфомы, злокачественные новообразования других локализаций, сопровождающиеся метастазами или некрозом
Сенсибилизация организма	Лекарственная аллергия, бронхиальная астма, аллергические дерматиты, инфекционный эозинофилез, аллергический ринит, пищевая аллергия
Иммунодефициты	Синдром Вискотта–Олдрича и др.
Патология соединительной ткани	Узелковый периартериит, РА, системная склеродермия (ССД), эозинофильный фасцит

Инфекции	Туберкулез, хламидийная пневмония
Интерстициальные и другие заболевания легких	Саркоидоз, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, эозинофильный плеврит, легочный эозинофильный инфильтрат (болезнь Леффлера), хроническая эозинофильная пневмония

**Эозинопения** — снижение количества эозинофилов в крови менее  $0,02 \times 10^9/\text{л}$  — или анэозинофилия — отсутствие эозинофилов в крови — встречается на первом этапе воспалительного процесса, при тяжелых гнойных инфекциях, шоке, стрессе, эклампсии и в родах, интоксикациях различными химическими соединениями, тяжелыми металлами. Абсолютная эозинопения коррелирует с клиническими исходами у пациентов с пневмонией COVID-19. Данный показатель может быть использован как маркер для определения неблагоприятного прогноза заболевания. Оценка динамики изменения количества эозинофилов в течение воспалительного процесса имеет прогностическое значение. Эозинопения соответствует началу воспаления, восстановление количества эозинофилов или эозинофилия — началу выздоровления. Однако ряд инфекционных и других заболеваний с высоким уровнем IgE характеризуется эозинофилией после окончания воспалительного процесса, что указывает на незаконченность иммунной реакции с ее аллергическим компонентом. В то же время снижение числа эозинофилов в активной фазе заболевания зачастую свидетельствует о тяжести процесса и является неблагоприятным признаком. В целом изменение количества эозинофилов в периферической крови является результатом дисбаланса процессов продукции клеток в костном мозге, их миграции и распада в тканях.

**Базофилия** — увеличение количества базофилов в крови (более  $0,1 \times 10^9/\text{л}$ ). Базофилы и тучные клетки участвуют в клеточных воспалительных реакциях замедленного типа в коже и других тканях, вызывая гиперемию, формирование экссудата, повышенную проницаемость капилляров. Эти клетки служат основным источником медиаторов, запускающих анафилактическую реакцию гиперчувствительности немедленного типа. Пероксидаза эозинофилов вызывает дегрануляцию базофилов и выделение ими в кровь биологически активных веществ, в том числе фактора хемотаксиса эозинофилов, поэтому эозинофилы встречаются везде, где имеется увеличение числа тучных клеток или повышение их активности. Усиленная базофильная инфильтрация может происходить в секретах дыхательных путей при аллергии, вызываемой антигенами окружающей среды, а также в почках при хроническом интерстициальном нефрите и отторжении трансплантата, при контактном дерматите, хроническом язвенном колите. Базофилия может наблюдаться при аллергических заболеваниях, в ранней фазе ревматизма, при ХМЛ, первичном миелофиброзе, ИП. Тучноклеточный лейкоз сопровождается увеличением тучных клеток в костном мозге и крови.

**Моноцитоз** — количество моноцитов  $>0,7 \times 10^9/\text{л}$ . Моноцитопоз в костном мозге представлен пролиферирующими клетками-предшественниками и не имеет резервного пула зрелых клеток (в отличие от гранулоцитопоза), поэтому причиной моноцитоза можно считать ускоренное созревание и выход клеток из костного мозга в кровь. Моноцитоз возможен при туберкулезе, саркоидозе, бруцеллезе, сифилисе, малярии, подостром септическом эндокардите, болезни Ходжкина, хроническом сепсисе, аутоиммунных заболеваниях, злокачественных новообразованиях (табл. 4.10).

**Таблица 4.10.** Клинико-диагностическое значение моноцитоза

Патогенез	Заболевания
Реактивный моноцитоз (усиление пролиферации в костном мозге клеточных элементов моноцитопоза)	Инфекции (подострый септический эндокардит, вирусные, грибковые, риккетсиозные, протозойные инфекции), период реконвалесценции после острых инфекций. Хронические инфекции, сопровождающиеся эпителиоидноклеточной пролиферацией с образованием гранул (туберкулез, сифилис, бруцеллез, саркоидоз). Хронические заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит). СКВ, РА, узелковый периартериит
Опухолевый моноцитоз	Хронический миеломоноцитарный лейкоз, ХМЛ, острый миеломонобластный лейкоз, острый монобластный лейкоз

## Глава 4. Лабораторная гематология

**Моноцитопения** — снижение содержания моноцитов менее  $0,09 \times 10^9/\text{л}$  встречается при гипоплазии кроветворения.

**Лимфоцитоз** — относительное увеличение количества лимфоцитов (более 37%) или в абсолютных значениях (более  $3,0 \times 10^9/\text{л}$ ). Абсолютный или относительный лимфоцитоз сопровождает большинство вирусных заболеваний: инфекционный лимфоцитоз, краснуха, инфекционный мононуклеоз, ветряная оспа, полиомиелит, инфекционный гепатит, паротит, грипп (табл. 4.11). Лимфоцитоз может наблюдаться при протозойной инвазии (токсоплазмоз). При вышеперечисленных инфекциях большинство лимфоцитов представлены широкоцитоплазматическими клетками, встречаются иммунобласты, лимфоциты с базофильной цитоплазмой, плазмочиты.

**Таблица 4.11.** Клинико-диагностическое значение лимфоцитоза

Лимфоцитоз	Этиологический фактор	Заболевания
Реактивный (поликлональный)	Вирусы	Инфекционный мононуклеоз, инфекционный лимфоцитоз, ветряная оспа, коклюш, корь, краснуха, острый и хронический вирусный гепатит, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ

	Бактерии	Хронические бактериальные инфекции, сопровождающиеся образованием эпителиоидноклеточной гранулемы (туберкулез, сифилис, бруцеллез)
	Паразитарный антиген	Токсоплазмоз
	Иммунопатологический процесс	Аутоиммунные заболевания
Опухолевый (моноклональный)	Опухолевая пролиферация	Лимфопролиферативные новообразования

**Лимфоцитопения** — содержание лимфоцитов менее  $1 \times 10^9/\text{л}$ , наблюдается при острых инфекционных заболеваниях, милиарном туберкулезе (висцеральная форма), СКВ, почечной недостаточности, в терминальной стадии злокачественных новообразований, при лимфогранулематозе, как ранний признак острой лучевой болезни, в терминальной стадии СПИДа, при вторичных иммунодефицитах. У детей и подростков лимфоцитопения (менее  $1 \times 10^9/\text{л}$ ) возможна при аллергических реакциях и при наследственном иммунодефиците.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.4.2. Эритроцитоз и эритроцитопения

**Эритроцитоз** — увеличение количества эритроцитов крови более  $6 \times 10^{12}/\text{л}$  у мужчин и более  $5 \times 10^{12}/\text{л}$  у женщин. Эритроцитоз может быть реактивный и опухолевый. Реактивный эритроцитоз развивается вследствие гиперпродукции ЭПО в ответ на тканевую гипоксию, опухоли, поликистоз почек, стеноз почечной артерии, гидронефроз. Повышение выработки ЭПО является важным критерием дифференциальной диагностики реактивного эритроцитоза от ИП, при которой уровень ЭПО не увеличен, а усиленный эритропоэз — результат неконтролируемого опухолевого роста.

**Ретикулоцитоз** (количество RET в крови более  $80\text{--}90 \times 10^9/\text{л}$  или более 2,2%) наблюдается при постгеморрагической анемии, гемолизе, терапии эритропоэтином, витамином B<sub>12</sub>, фолиевой кислотой и других состояниях.

**Эритроцитопения** — уменьшение количества эритроцитов в крови менее  $4,0 \times 10^{12}/\text{л}$ ; может развиваться при кровопотере, АА, повышенном гемолизе эритроцитов, радиационном облучении, дефиците гемопоэтических факторов (железо, витамин B<sub>12</sub>, фолиевая кислота). Эритроцитопения часто сопровождается неэффективным эритропоэзом, который проявляется повышенным содержанием и дисплазией эритрокариоцитов в КМ, накоплением в них PAS-положительного материала и гранул железа, повышенным апоптозом.

**Ретикулоцитопения** имеет место при АА, парциальной красноклеточной аплазии, метастазах рака в костный мозг, лейкозах, снижении уровня ЭПО, неэффективном эритропоэзе, МДС.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.4.3. Тромбоцитоз и тромбоцитопения

**Тромбоцитоз** — увеличение количества тромбоцитов в крови более  $400 \times 10^9/\text{л}$ . Тромбоцитоз может быть первичным, в результате опухолевой пролиферации мегакариоцитов при хронических миелопролиферативных заболеваниях и вторичным реактивным. Реактивный тромбоцитоз возможен при злокачественных новообразованиях, воспалительных заболеваниях, после кровотечений, гемолитических кризов, оперативных вмешательств, инфекций и спленэктомии. Тромбоцитоз приводит к микроциркуляторным нарушениям с последующим развитием тромбоза или геморрагического синдрома.

**Тромбоцитопения** — уменьшение количества тромбоцитов в крови ниже  $150 \times 10^9/\text{л}$ . Тромбоцитопении являются результатом недостаточного образования, повышенного разрушения или потребления тромбоцитов. Различают наследственные и приобретенные тромбоцитопении. Приобретенные тромбоцитопении могут наблюдаться при гиперспленизме, инфекционных заболеваниях, хронической интоксикации любого генеза, гипер- и метапластических поражениях КМ, лучевой и цитостатической терапии и сопровождаются геморрагическим синдромом. Среди приобретенных тромбоцитопений наиболее часто встречаются иммунные и аутоиммунные.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5. Анемии

**Анемия** — состояние, характеризующееся снижением концентрации Hb и, в большинстве случаев, количества эритроцитов и НСТ в единице объема крови.

Критерии ВОЗ для диагностики анемии:

- у мужчин — число эритроцитов  $<4,0$  млн/мкл, Hb  $<130$  г/л, НСТ  $<39\%$ ;
- у женщин — число эритроцитов  $<3,8$  млн/мкл, Hb  $<120$  г/л, НСТ  $<36\%$ ;
- у беременных — Hb  $<110$  г/л, НСТ  $<33\%$ .

Экспертами ВОЗ было показано, что анемия чаще встречается в развивающихся странах и наиболее подвержены анемии две группы населения: дети раннего возраста и беременные. По данным Росстата от 2021 г., анемия (без

уточнения этиологии) определяется у 36% беременных, в то время как распространенность анемии у детей раннего возраста в России ниже общепопуляционной и составляет около 0,8%. Высокая частота анемии характерна для пациентов в периоперационный период: в предоперационный период анемия регистрируется с частотой от 12 до 70%, в послеоперационный период достигает 90%. На ЖДА приходится до 60–75% случаев предоперационных анемий. Анемии разнообразны по генезу и часто имеют смешанный патогенез. В большинстве клинических случаев анемия — не самостоятельная нозологическая форма, а проявление основного заболевания. Она сопутствует диффузным болезням соединительной ткани [РА, СКВ, системные васкулиты (СВ)], заболеваниям ЖКТ, печени, почек, злокачественным новообразованиям, хроническим инфекционным заболеваниям и воспалительным процессам. Тем не менее даже в случаях, когда анемия является осложнением или проявлением основного заболевания, как правило, имеет место нарушение эритропоэза.

**Морфологическая классификация анемий** была создана на основании эритроцитарных индексов с разделением на микроцитарные гипохромные, нормоцитарные нормохромные и макроцитарные гиперхромные (рис. 4.3). Одинаковые по патогенезу анемии могут относиться к различным морфологическим вариантам. Так, анемии хронических заболеваний (АХЗ) могут быть как нормоцитарными, так и микроцитарными; смешанная ЖДА и В<sub>12</sub>-дефицитная анемия может быть нормоцитарной. Тем не менее морфологический вариант анемии имеет важнейшее значение для проведения дифференциальной диагностики.

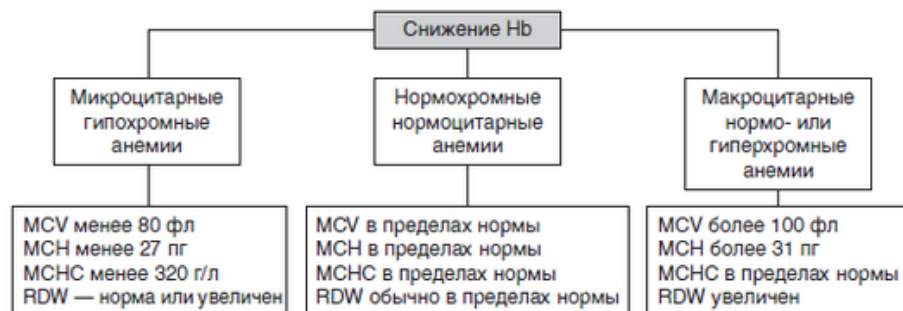


Рис. 4.3. Классификация анемий с использованием эритроцитарных индексов

**Гипохромные анемии:** ЖДА, анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов, анемия при ХБП.

**Нормохромные анемии:** острая постгеморрагическая анемия, АХЗ, АА.

**Гиперхромные анемии:** мегалобластные анемии, В<sub>12</sub>-дефицитная анемия, фолиеводефицитная анемия.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.1. Железодефицитная анемия

ЖДА — полиэтиологичное заболевание, развитие которого связано с дефицитом железа в организме из-за нарушения поступления, всасывания или повышенных потерь данного микроэлемента (табл. 4.12).

Таблица 4.12. Наиболее частые причины железодефицитной анемии

Нарушения всасывания железа	Кровопотери	Недостаточное поступление с пищей	Повышение потребности в железе
<ul style="list-style-type: none"> <li>Резекция желудка и кишечника.</li> <li>Недостаточность ПЖ.</li> <li>Глютеновая энтеропатия, спру.</li> <li>Болезнь Крона</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Желудочно-кишечная.</li> <li>При менструациях и родах.</li> <li>Легочная (гемосидероз легких).</li> <li>Через мочеполовой тракт (заболевания почек, гемоглобинурия).</li> <li>Донорство</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Вегетарианская или веганская диета</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Беременность.</li> <li>Лактация.</li> <li>Быстрый рост в пубертатный период.</li> <li>Терапия рекомбинантным ЭПО</li> </ul>

Железодефицитное состояние является причиной нарушения метаболических процессов в организме, снижения работоспособности у взрослых, вызывает задержку роста и развития детей. ЖДА составляют до 90% анемий в детском возрасте и до 80% у взрослых.

Хроническая кровопотеря является наиболее частой причиной развития ЖДА. В 500 мл крови содержится 250 мг железа (в 1 мл — 0,5 мг), поэтому при продолжающемся кровотечении происходит значительная потеря железа, несмотря на увеличение всасывания его в кишечнике. При ежедневной потере 6–12 мл крови развивается отрицательный баланс железа.

Общая потребность в железе во время беременности значительно увеличивается. В I триместре потребности в железе несколько снижены из-за прекращения менструальных кровопотерь. Необходимость в железе значительно возрастает во II–III триместре вследствие увеличения массы эритроцитов до 20% и роста плода и плаценты, что требует дополнительно 400 мг железа. Ежедневная потребность в железе к III триместру увеличивается до 6 мг/сут.

Всасывание в кишечнике строго регулируется запасами железа, поэтому при беременности с адекватными запасами железа в организме сначала уровень кишечной абсорбции достаточно низкий и повышенные потребности в железе удовлетворяются из тканевых депо. Во второй половине беременности истощение запасов железа стимулирует всасывание железа в кишечнике, которое может увеличиться в 5–9 раз к концу II–III триместра. Дефицит железа неизбежен у женщин, имевших четверо и более родов, так как при каждой беременности, родах, лактации оно расходуется в значительной степени.

Выделяют латентный дефицит железа и собственно ЖДА. Решающее значение в диагностике ЖДА имеют лабораторные исследования. В первую очередь снижается содержание депонированного железа в органах и тканях, затем — транспортного железа, несколько позже — железа гемосодержащих ферментов и затем — железа, необходимого для синтеза Hb.

*Латентный дефицит железа* сопровождается сидеропеническим синдромом. Лабораторные показатели метаболизма железа на этой стадии характеризуются гипоферритинемией, нормальной или сниженной концентрацией сывороточного железа. Синтез Hb на этой стадии не нарушен, и эритроцитарные показатели (Hb, RBC, MCV, MCH, MCHC) сохраняются в пределах нормы. В случае незначительного снижения MCV, MCH и повышения RDW при нормальном Hb можно предположить наличие латентного дефицита железа и исследовать содержание ферритина в сыворотке крови. При трансформации латентного дефицита железа в ЖДА повышение RDW может предшествовать изменениям других эритроцитарных параметров.

*ЖДА* сопровождается клиническим симптомокомплексом, включающим гипоксический и сидеропенический синдромы. Несмотря на четко очерченную клиническую картину ЖДА, симптомы анемии и сидеропении обладают низкой диагностической ценностью и не позволяют уверенно диагностировать ЖДА. В зависимости от состояния эритропоэтической активности костного мозга различают регенераторную и гипорегенераторную стадии ЖДА.

*Регенераторная стадия* ЖДА характеризуется нормальной клеточностью костного мозга, умеренной гиперплазией клеток эритропоэза с преобладанием базофильных и полихроматофильных эритробластов. Гиперплазия эритроидного ростка обусловлена компенсаторным усилением синтеза ЭПО в ответ на тканевую гипоксию. Поскольку деление клеток зависит от концентрации Hb, число митозов во время их созревания может быть повышенным, это приводит к образованию не только гипохромных, но и мелких по размеру эритрокариоцитов и, соответственно, RET и эритроцитов (микроцитов). По мере нарушения процессов Hb-образования происходит снижение MCV, MCH и MCHC. Показатель RDW — в пределах нормы либо немного увеличен. Ретикулоцитоз не характерен, но может присутствовать у пациентов с кровотечениями.

*Гипорегенераторная стадия* ЖДА характеризуется истощением пролиферативной активности костного мозга, снижением количества сидеробластов, повышением неэффективного эритропоэза, что приводит к снижению количества эритроцитов, появлению популяции эритроцитов с увеличенным объемом. Присутствие микро- и макроцитов приводит к повышению RDW, что коррелирует с наличием смешанного анизоцитоза в мазках периферической крови, может наблюдаться незначительный пойкилоцитоз. На этой стадии наблюдается ретикулоцитопения, что отражает снижение пролиферативной активности клеток эритропоэза в костном мозге.

## Глава 4. Лабораторная гематология

Современные гематологические анализаторы способны определять дополнительные параметры, являющиеся индикаторами железодефицитного эритропоэза, к которым относятся Ret-He и процент гипохромных эритроцитов (HYP-He). Снижение показателя Ret-He менее 28–29 пг и увеличение HYP-He более 5% свидетельствуют о наличии дефицита железа.

Отличительными признаками ЖДА являются низкий уровень сывороточного ферритина, отражающий истощение тканевых запасов железа, и повышенные показатели общей железосвязывающей способности сыворотки, трансферрина и концентрации растворимых рецепторов трансферрина (sTfR). Показатели сывороточного железа и коэффициент насыщения трансферрина железом (НТЖ) в типичных случаях снижены, однако наличие нормальных и даже повышенных показателей не исключает диагноз ЖДА, поскольку прием пациентом накануне исследования железосодержащих препаратов, мясная диета или предшествующая (за 10–14 дней) трансфузия эритроцитсодержащих компонентов крови могут сильно исказить показатель сывороточного железа и, соответственно, коэффициент НТЖ. Оценка биохимических показателей функции печени необходима для правильной интерпретации параметров обмена железа, так как нарушение белково-синтетической функции печени приводит к снижению продукции гепатоцитами трансферрина и, как следствие, к снижению показателей сывороточного трансферрина и общей железосвязывающей способности сыворотки, искажению расчетного коэффициента НТЖ. Нарушение функции почек может приводить к развитию как относительного, так и абсолютного железодефицита.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.2. Анемии, связанные с нарушением синтеза порфиринов

**Сидеробластные анемии** обусловлены недостаточной или аномальной утилизацией внутриклеточного железа при синтезе Hb, несмотря на нормальное или даже повышенное содержание железа в митохондриях эритроидных предшественников. В крови отмечаются высокие уровни железа, ферритина и НТЖ; в костном мозге — гиперплазия эритроидных клеток и кольцевидные сидеробласты.

**Наследственные анемии** встречаются преимущественно у мужчин, так как наследование сцеплено с X-хромосомой. Относительно чаще наблюдается форма болезни, вызванная дефектами синтеза  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты. Нарушение образования протопорфирина обуславливает невозможность связывания железа, и вследствие этого происходит накопление его в организме. Преимущественное поступление железа в печень приводит к развитию цирроза, в ПЖ — к СД, накопление железа в яичках — к евнухоидизму, в надпочечниках — к надпочечниковой недостаточности. Содержание RET нормальное или несколько сниженное. Эритроциты гипохромные, отмечаются анизо- и пойкилоцитоз, мишеневидные эритроциты. Для этой анемии характерны признаки неэффективного эритропоэза, который определяется как анемия с относительной или абсолютной ретикулоцитопенией. Содержание железа в крови значительно повышено (до 100 мкмоль/л), трансферрин насыщен железом.

**Приобретенные анемии** обусловлены нарушением синтеза порфиринов, возникающие чаще при отравлении свинцом или дефиците витамина В<sub>6</sub>. Свинец блокирует активные центры ферментов, участвующих в синтезе гема, и снижает скорость синтеза  $\alpha$ -цепи глобина. Нарушается включение железа в молекулу протопорфирина, увеличивается содержание железа и ферритина в крови и отложение его в тканях (гемосидероз). В крови постепенно снижается содержание Hb до 50–60 г/л, эритроциты с выраженной гипохромией (низкие MCH, MCHC), выявляется анизо- и пойкилоцитоз, появляется базофильная пунктация эритроцитов. Содержание железа в сыворотке крови повышается до 350–550 мкг/дл, коэффициент НТЖ достигает 100%. Самым характерным биохимическим признаком свинцового отравления является увеличение концентрации в моче  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты и копропорфирина, в эритроцитах повышено содержание протопорфирина.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.3. Анемия при хронической болезни почек

Анемия — один из наиболее характерных синдромов, сопровождающих ХБП. Степень выраженности анемии не всегда коррелирует с уремией, тем не менее при снижении клиренса креатинина ниже 30 мл/мин величина НСТ практически всегда ниже 30%. Основными причинами анемии при ХБП являются снижение продукции ЭПО, дефицит железа и воспалительный процесс. Усугубляют анемию неадекватный режим программного гемодиализа, инфекционные осложнения, хронические кровопотери, вторичный гиперпаратиреоз. Дефицит ЭПО вызывает ускоренный апоптоз эритроидных клеток в костном мозге. Вместе с тем, хотя и не решающую роль, в патогенезе анемии при ХБП играют уремические токсины, которые неспецифически ингибируют пролиферацию и дифференцировку эритрокариоцитов.

В периферической крови анемия носит характер нормоцитарной нормохромной. Количество RET при нефрогенной анемии обычно нормальное или незначительно повышено и зависит от степени активности костномозгового эритропоэза. На фоне длительного гемодиализа, вследствие кровопотерь анемия может стать гипохромной микроцитарной. В мазках крови наблюдается пойкилоцитоз различной степени выраженности с преобладанием эхиноцитов (шиповидных эритроцитов). Лечение больных ХБП препаратами рекомбинантного ЭПО приводит к частичной коррекции анемии, однако вследствие стимуляции эритропоэза может развиться ЖДА, что диктует необходимость исследовать метаболизм железа при лечении рекомбинантным ЭПО.

При ХБП показатели обмена железа (сывороточное железо, общая железосвязывающая способность сыворотки, НТЖ) могут быть в пределах нормы, снижены или повышены. При интерпретации уровня ферритина следует помнить, что данный показатель повышается при воспалительном процессе. *ЖДА у пациентов с ХБП* диагностируется при содержании ферритина ниже 100 нг/мл. При количестве ферритина выше 100 нг/мл, НУРО-Не более 6% или НТЖ <20% диагностируют *функциональный дефицит железа*.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.4. Острая постгеморрагическая анемия

В результате быстрой потери значительного объема крови возникает дефицит объема циркулирующей крови, однако уровни Hb, НСТ и RBC приближаются к исходным цифрам и не отражают степень анемии. Сразу же после кровопотери наблюдаются признаки коллапса: резкая слабость, падение давления, бледность, головокружение, обморочное состояние, тахикардия, холодный пот, рвота, цианоз, судороги. В ответ включаются адаптационные механизмы, направленные на компенсацию дефицита объема циркулирующей крови. Нормальная реакция организма на кровопотерю характеризуется активацией гемопоэза за счет усиления синтеза и секреции почками ЭПО. В период кровотечения в связи с большим потреблением тромбоцитов, которые мобилизуются для его остановки, возможно снижение их содержания. Развивающаяся спустя 1–2 дня после кровопотери анемия носит нормохромный нормоцитарный характер. MCH и MCHC зависят от наличия запасов железа в организме. Через 3–5 дней после кровотечения развивается ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых RET, что на фоне активного эритропоэза отражает регенераторную способность костного мозга, которая становится максимальной к 7–10-му дню. Появление в крови полихроматофильных макроцитов приводит к увеличению MCV, и анемия приобретает макроцитарный нормохромный характер с появлением эритрокариоцитов в крови. После остановки кровотечения нормализация числа RET отмечается через 2–3 нед. Если их количество к началу второй недели не снижается, это может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.5. Анемия хронических заболеваний

Анемии, сопровождающие инфекционно-воспалительные, ревматические и опухолевые заболевания, получили условное название АХЗ. Этот тип анемии развивается при длительно текущих патологических процессах, занимает по распространенности второе место после ЖДА. При всем многообразии патогенетических механизмов АХЗ (угнетение эритропоэза, нарушение метаболизма железа, действие гуморальных ингибиторов эритропоэза) одним из основных является перераспределение железа в клетки макрофагальной системы, активирующейся при различных воспалительных (инфекционных и неинфекционных) или опухолевых процессах. Развивается перераспределительный, или функциональный, дефицит железа вследствие накопления и блокады освобождения железа в тканевых макрофагах, что приводит к снижению доставки железа к эритрокариоцитам костного мозга, нарушению эритропоэза и развитию анемии. АХЗ обычно носит нормохромный нормоцитарный характер, однако

гипохромия эритроцитов встречается часто, и иногда анемия становится микроцитарной гипохромной. АХЗ постоянно сопровождается нарушением метаболизма железа: гипохромией, некоторым снижением концентрации трансферрина в крови и повышением ферритина как в крови, так и в органах и тканях.

Активация иммунной системы при воспалительных, инфекционных и некоторых онкологических заболеваниях антигенными факторами вызывает синтез провоспалительных цитокинов [IL-1, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), IL-6], интерферонов (IFN). IL-6 является основным индуктором синтеза гепсидина в печени, который повышается независимо от состояния эритропоэтической активности и изменений в обмене железа. Гепсидин является негативным регулятором как выведения железа из макрофагов, так и всасывания железа в тонком кишечнике. Результатом действия гепсидина является блокада железа в клетках макрофагальной системы, гепатоцитах и энтероцитах, нарушение передачи железа трансферрину и быстрое развитие гипохромии. Так как всасывание железа и мобилизация его из депо нарушены, а клетки костного мозга продолжают расходовать железо, то плазменный пул железа быстро истощается. При продолжительной гипохромии развивается железодефицитный эритропоэз. У пациентов с АХЗ отмечается неадекватно низкая продукция ЭПО вследствие подавления экспрессии гена ЭПО в клетках почек и печени цитокинами IL-1, ФНО- $\alpha$ , трансформирующим фактором роста  $\beta$ -1 (ТФР- $\beta$ -1). Таким образом, каскад событий, который приводит к развитию АХЗ, сводится к следующему: действие провоспалительных цитокинов на избыточный синтез гепсидина, нарушение метаболизма железа (гипохромия, гиперферритинемия), избыток железа в макрофагах тканей и органов, развитие перераспределительного, или функционального, дефицита железа, снижение доставки железа к эритрокариотам костного мозга, нарушение эритропоэза и развитие анемии.

Количество RET нормальное или снижено, индекс продукции RET в норме или снижен, что отражает сниженную пролиферативную активность костного мозга. Изменения метаболизма железа характеризуются снижением сывороточного железа, трансферрина, коэффициента НТЖ, нормальной или пониженной общей железосвязывающей способностью сыворотки и гиперферритинемией. Ферритин относится к острофазным белкам, поэтому повышенный его уровень при АХЗ может не только отражать запас железа в организме, но является проявлением острофазного ответа, что ограничивает его применение в качестве показателя определения запасов железа. В большинстве случаев АХЗ повышены и другие белки острой фазы. Количество sTfR остается стабильным при воспалительных процессах. АХЗ необходимо дифференцировать с ЖДА, а также с гипохромными анемиями, протекающими с перегрузкой железом: талассемией, порфирией, свинцовой интоксикацией (табл. 4.13).

**Таблица 4.13.** Дифференциальная диагностика железодефицитной анемии и анемии хронических заболеваний

Показатель	ЖДА	АХЗ	Референсные значения*
Сывороточное железо	↓	↓ N	Мужчины: 11,6–31,3 мкмоль/л. Женщины: 9,0–30,4 мкмоль/л
Общая железосвязывающая способность сыворотки	↑	N или ↓	46–90 мкмоль/л
НТЖ	↓ N	↑↑	15–45%
Ферритин сыворотки	↓	N или ↑	Мужчины: 15–200 мкг/л. Женщины: 12–150 мкг/л

\* Референсные значения могут отличаться в разных КДЛ в зависимости от используемых коммерческих тест-систем.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.6. Апластическая анемия

АА — заболевание, характеризующееся панцитопенией, обусловленной аплазией костного мозга, связанной с нарушением иммунных механизмов регуляции кроветворения, количественным дефицитом и функциональными дефектами стволовых кроветворных клеток. Уменьшение пула гемопоэтических клеток костного мозга сопровождается нарушением обмена железа и отложением токсического железа в костном мозге, миокарде, печени, эндокринных и половых органах, что вызывает нарушение функции этих органов. Кроме того, течение АА может осложниться развитием таких клональных заболеваний, как ПНГ, МДС, ОМЛ. Частота развития клональных осложнений может достигать 32% в течение 10 лет.

АА могут быть врожденными и приобретенными. Врожденные АА (анемия Фанкони, анемия Даймонда–Блекфена) являются редкими формами аплазии и сочетаются с другими пороками развития. Приобретенные формы АА связаны с действием ионизирующей радиации, лекарственных препаратов (антибиотики, сульфаниламидные, антигиперлипидные, противосудорожные, противотуберкулезные, препараты золота), химических соединений (бензол и его производные, этилированный бензин, пестициды), вирусов гепатитов А (HAV), В (HBV), С (HCV), вирусов Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), ВИЧ. Изменение функции тимуса нередко сопровождается возникновением парциальной красноклеточной аплазии. В большинстве случаев АА этиологический фактор остается неизвестным (*идиопатические АА*).

Критериями диагноза АА являются трехростковая цитопения: анемия (Hb <110 г/л), гранулоцитопения (гранулоциты <2,0×10<sup>9</sup>/л), тромбоцитопения (тромбоциты <100×10<sup>9</sup>/л); снижение клеточности КМ и отсутствие мегакариот в аспирате костного мозга; преобладание жирового костного мозга (по данным трепанобиоптата). Эритропоэз характеризуется абсолютным уменьшением количества эритрокариот и нарушением их дифференцировки. Количество сидеробластов и сидероцитов в костном мозге значительно возрастает. Резко снижено количество мегакариот, а в тяжелых случаях они могут отсутствовать. В крови регистрируется нормохромная нормоцитарная анемия с резким снижением концентрации Hb (25–80 г/л), количества эритроцитов (0,7–2,5×10<sup>12</sup>/л), умеренным анизоцитозом с тенденцией к макроцитозу, глубокая тромбоцитопения (2–25×10<sup>9</sup>/л), иногда в мазках периферической крови тромбоциты могут отсутствовать. В большинстве случаев АА ускорена СОЭ. На фоне частых

гемотрансфузий при АА изменения в метаболизме железа характеризуются повышением содержания сывороточного железа и НТЖ, что ведет к развитию гемосидероза.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.7. Мегалобластная В<sub>12</sub>-дефицитная анемия

Анемии, вызванные нарушением синтеза ДНК, могут быть наследственными и приобретенными. Общим признаком этих анемий является наличие в костном мозге мегалобластического кроветворения. Чаще наблюдается изолированный дефицит витамина В<sub>12</sub>, реже — фолиевой кислоты или комбинированный.

Встречаемость дефицита витамина В<sub>12</sub> среди населения составляет от 3 до 16%, а среди пожилых лиц в возрасте 65–74 лет достигает 56% и свыше 75 лет — 93%. Неуклонный рост распространенности недостатка витамина В<sub>12</sub> является в значительной степени следствием социальных (общее старение населения, снижение качества питания в целом, распространенность диет) и ятрогенных (увеличение использования целого ряда ЛС, включая метформин и ингибиторы Н<sup>+</sup>,К<sup>+</sup>-АТФазы) причин. Основная причина развития дефицита витамина В<sub>12</sub> — нарушение его всасывания в кишечнике. Parietalные клетки тела и дна желудка секретируют белок, «внутренний фактор Кастла», необходимый для всасывания витамина В<sub>12</sub> (кобаламин, «внешний фактор»). Образование стойкого комплекса «кобаламин — внутренний фактор Кастла» начинается в щелочной среде двенадцатиперстной кишки, далее всасывание витамина В<sub>12</sub> происходит в тонком кишечнике, в основном в подвздошной кишке, где локализуется кубулин — специфический белок-рецептор для «внутреннего фактора». В процессе всасывания «комплекс» распадается, витамин В<sub>12</sub> проникает через стенку тонкой кишки в кровоток, где связывается с транскобаламином, который доставляет его клеткам-потребителям, в том числе клеткам костного мозга и печени.

К основным причинам недостаточности и дефицита В<sub>12</sub> относятся:

- снижение продукции или отсутствие «внутреннего фактора Кастла» вследствие наличия аутоантител к нему или к париетальным клеткам желудка, другие атрофические гастриты, резекция желудка;
- нарушение всасывания в тонкой кишке, панкреатодуоденальная резекция, болезнь Крона, дивертикулярная болезнь, целиакия, хронический панкреатит с внешнесекреторной недостаточностью ПЖ;
- длительный прием некоторых лекарственных препаратов (ингибиторов Н<sup>+</sup>,К<sup>+</sup>-АТФазы и метформина, комбинаций сахароснижающих препаратов, содержащих метформин, антацидов, блокаторов H<sub>2</sub>-рецепторов, колхицина, аллопуринола, леводопы, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, противосудорожных и противомикробных средств, гормональных контрацептивов и препаратов гормонозаместительной терапии, сульфасалазина, некоторых противоопухолевых, противотуберкулезных и антиретровирусных препаратов;
- алиментарный фактор (вегетарианская и особенно строгая веганская диета, полное или частичное голодание, специальная диета, например при подагре);
- пожилой возраст (как правило, из-за сочетания нескольких факторов);
- использование ингаляций динитрогена оксида (Азота закиси<sup>▲</sup>) с лечебной (ингаляционный наркоз) или рекреационной целью;
- конкурентное поглощение (дивертикулез с изменением флоры, дифиллоботриоз, лямблиоз, амебиаз, синдром «слепой петли» при анастомозе тонкой кишки);
- бариатрические операции, связанные с редукцией разных отделов пищеварительного тракта;
- синдром избыточного бактериального роста, дисбактериоз.

Дополнительным фактором риска развития дефицита и недостаточности витамина В<sub>12</sub> выступают заболевания системы крови, сопровождающиеся неэффективным эритропоэзом, а также повышенной продукцией и/или деструкцией клеток крови: гемолитические анемии, гемоглобинопатии.

Дефицит витамина В<sub>12</sub> приводит к нарушению синтеза тимидина, что нарушает синтез ДНК, накоплению токсичного для нервных клеток метаболита — метилмалоновой кислоты и уменьшению содержания миелина в нервных волокнах. В большинстве случаев дефицит витамина В<sub>12</sub> манифестирует именно неврологическими симптомами. Широкий спектр нарушений регистрируется в периферической нервной системе (онемение, парестезии, нарушение глубокой чувствительности и пошатывание при ходьбе, синдром беспокойных ног, нарушение обоняния) и ЦНС (снижение концентрации внимания, памяти, забывчивость и другие когнитивные нарушения, астенические, депрессивные расстройства, нарушение сна). Длительная недостаточность витамина В<sub>12</sub> может приводить к необратимым последствиям, при этом классическая анемия развивается не более чем в 13–15% случаев.

У пациентов с новой коронавирусной инфекцией может наблюдаться дефицит витамина В<sub>12</sub>, что обусловлено нарушением всасывания В<sub>12</sub> (вследствие дисфункции кишечника, размножения микробов, вызывающих дефицит кобаламина, применения антибактериальных средств, глюкокортикоидов и других препаратов); повышенным расходом витамина В<sub>12</sub>, необходимым для адекватного функционирования иммунной системы; нередко — снижением потребления продуктов питания, содержащих кобаламин (на фоне нарушений обоняния и вкуса, расстройств аппетита).

Анемия при дефиците В<sub>12</sub> имеет *макроцитарно-гиперхромный характер*. Количество эритроцитов резко снижено

(1,0–1,5×10<sup>12</sup>/л), концентрация Нб может снижаться до 25–40 г/л. Отмечается увеличение MCV (MCV >100 фл) и MCH (MCH >31 пг) при нормальных значениях MCHC. Характерными морфологическими изменениями являются



базофильная пунктация эритроцитов, тельца Жолли и кольца Кебота в эритроцитах, наличие овальных макроцитов и единичных NRBC. Абсолютное число RET снижено, в то время как относительное их количество может быть нормальным или повышенным. Дополнительную информацию может предоставить определение ретикулоцитарных индексов: отмечается увеличение среднего объема RET (макроретикулоциты), Ret-He и повышение IRF. Часто наблюдается умеренная тромбоцитопения без геморрагического синдрома.

## Глава 4. Лабораторная гематология

В костном мозге наблюдается мегалобластический тип кроветворения, расширение эритропоэза преимущественно за счет базофильных и полихроматофильных форм эритрокариоцитов, имеющих причудливую форму ядер. Продукция эритроцитов снижена, что обусловлено усилением неэффективного эритропоэза (разрушением эритроидных предшественников), низкой продолжительностью жизни мегалобластов (в 2–4 раза меньше нормальной), поэтому большинство клеток, не созревая, погибают в костном мозге. Характерны также морфологические аномалии других ростков кроветворения — гигантские метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы, гиперсегментация ядер нейтрофилов. Морфологическое исследование костного мозга следует проводить до введения витамина В<sub>12</sub>. Инъекция витамина В<sub>12</sub> в течение 1–2 сут изменяет тип кроветворения. Мегалобласты уменьшаются в размерах, меняется структура ядра, клетки становятся макронормобластами.

*При В<sub>12</sub>-дефицитной анемии отмечается:* высокая активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), умеренное повышение уровня непрямого билирубина, низкий уровень витамина В<sub>12</sub> в крови (менее 140 пг/мл), нормальный уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови (более 5 нг/мл), повышение уровня гомоцистеина и метилмалоновой кислоты. Сопоставление клинических и лабораторных данных демонстрирует возможность формирования функционального дефицита витамина В<sub>12</sub> и при уровне кобаламина в диапазоне 200–450 пг/мл. У многих лиц с симптомами, обусловленными дефицитом кобаламина, показатель витамина В<sub>12</sub> может быть выше установленной лабораторией нижней границы референсного диапазона, что связано с приемом поливитаминов или биологически активных добавок, повышающим его уровень в сыворотке крови, но часто недостаточным для восполнения дефицита В<sub>12</sub> в тканях. В случае нормального содержания В<sub>12</sub> целесообразно определение холотранскобаламина (HoloTC) в сыворотке крови (активная форма витамина В<sub>12</sub>, связанная с транскобаламином), содержание которого может быть снижено. HoloTC несет от 10 до 30% витамина В<sub>12</sub>. Данный комплекс необходим для транспорта кобаламина в печень и другие ткани и является единственной формой витамина В<sub>12</sub>, которая усваивается клетками, именно по этой причине его называют активной формой витамина В<sub>12</sub>.

При В<sub>12</sub>-дефицитной анемии показатели сывороточного железа и ферритина, как правило, высокие. Однако у пациентов с синдромом мальабсорбции может наблюдаться сочетание дефицита кобаламина и железа, диагностика этих состояний диктует необходимость исследовать расширенный спектр лабораторных показателей в сочетании с анамнестическими данными и клинической картиной заболевания.

Дефицит витамина В<sub>12</sub> не всегда приводит к развитию анемии, степень дефицита витамина В<sub>12</sub> не всегда соответствует степени тяжести анемии, дефицит витамина В<sub>12</sub> не является синонимом анемии. Дифференциальная диагностика В<sub>12</sub>-дефицитной анемии проводится с другими видами макроцитарных анемий, ассоциированных с дефицитом фолиевой кислоты, дефицитом витамина В<sub>6</sub>, некоторыми формами латентного гемолиза, при которых макроцитоз обусловлен увеличенным содержанием RET в циркуляции, МДС, АА.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.8. Мегалобластная фолиеводефицитная анемия

Содержание фолатов в организме человека варьирует в пределах 7–22 мг. При достаточном количестве свежих овощей и фруктов в рационе питания в сутки с пищей поступает 400–600 мкг фолатов, однако потребность существенно возрастает при беременности, быстром росте ребенка, больших физических нагрузках и резкой активации эритропоэза. В отличие от дефицита витамина В<sub>12</sub> истощение запасов фолатов наступает быстро, уже через несколько недель или месяцев с момента появления причины. Всасывается фолиевая кислота в тощей кишке в соединении с молекулой глутаминовой кислоты. После попадания в организм фолиевая кислота превращается в активный метаболит — тетрагидрофолиевую кислоту. Тетрагидрофолиевая кислота — активная коферментная форма фолатов. Фолаты участвуют в синтезе пуринов и пиримидинов, тимидин-монофосфата из уридина и образовании метионина из гомоцистеина. Дефицит фолиевой кислоты приводит к нарушению клеточного деления и накоплению токсичных метаболитов, таких как гомоцистеин.

Основными характеристиками фолиеводефицитной анемии являются мегалобластный эритропоэз в костном мозге и макроцитарная гиперхромная анемия, зачастую сопровождающаяся тромбоцитопенией и нейтропенией.

Основные причины развития дефицита фолиевой кислоты:

- алиментарная недостаточность (частая причина у пожилых людей; у новорожденных — вскармливание козьим молоком; недостаток употребления сырых овощей, несбалансированная диета);
- нарушение всасывания в кишечнике (резекция тощей кишки, целиакия, хронические энтериты, амилоидоз, хронический алкоголизм);

- использование медикаментов — антагонистов фолиевой кислоты (противосудорожные и противоопухолевые препараты, барбитураты и их производные; препараты для лечения СД);
- повышенная потребность в фолатах (беременность, наследственные гемолитические анемии, недоношенность, дефицит массы тела при рождении);
- повышенное потребление фолатов в кишечнике (глистная инвазия);
- повышенное выведение (гемодиализ).

Болеют чаще лица молодого возраста, беременные. Преобладают признаки анемии: бледность кожи с легкой субиктеричностью, тахикардия, слабость. Неврологическая симптоматика несвойственна этим больным, нарушения со стороны ЖКТ незначительны в виде диареи, синдрома мальабсорбции. У лиц, страдающих эпилепсией и шизофренией, дефицит фолиевой кислоты приводит к учащению приступов и ухудшению течения заболевания. Дефицит фолиевой кислоты увеличивает риск осложнений беременности и родов (выкидыши, отслойка плаценты, недоношенность).

Изменения в крови и костном мозге аналогичны таковым при  $V_{12}$ -дефицитной анемии. В сыворотке крови отмечается снижение уровня фолата (норма — 6–20 нг/мл), концентрация его уменьшена и в эритроцитах (норма — 160–640 нг/мл).

Необходимо учитывать наличие приобретенных (курение, неэффективный эритропоэз, ХБП) и врожденных [гомозиготная мутация гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), который кодирует внутриклеточный фермент, участвующий в превращении гомоцистеина в метионин] факторов риска развития гипергомоцистеинемии. Дефицит фолатов в таких случаях может резко повысить риск развития тромботических осложнений и осложнений беременности, что определяет необходимость длительного профилактического приема фолиевой кислоты.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.5.9. Гемолитические анемии

Гемолитические анемии объединяют большую группу заболеваний, обусловленных резко повышенным разрушением эритроцитов вследствие имеющихся дефектов клеток или под действием определенных внешних факторов.

Гемолитические анемии могут быть наследственными и приобретенными. Различают анемии с преимущественным развитием внутриклеточного и внутрисосудистого гемолиза (табл. 4.14).

**Таблица 4.14.** Признаки внутриклеточного и внутрисосудистого гемолиза

Лабораторные показатели внутриклеточного гемолиза	Лабораторные показатели внутрисосудистого гемолиза
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Анемия.</li> <li>• Ретикулоцитоз.</li> <li>• NRBC в периферической крови.</li> <li>• Повышение содержания неконъюгированного билирубина в сыворотке крови с наличием желтухи или без таковой.</li> <li>• Увеличение содержания уробилина в моче и стеркобилина в кале.</li> <li>• Повышение содержания железа в сыворотке</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Анемия.</li> <li>• Ретикулоцитоз.</li> <li>• NRBC в периферической крови.</li> <li>• Повышение ЛДГ.</li> <li>• Повышение содержания свободного Hb в плазме.</li> <li>• Снижение концентрации гаптоглобина в сыворотке крови.</li> <li>• Наличие в моче гемосидерина и Hb</li> </ul>

При *внутриклеточном гемолизе* разрушение эритроцитов происходит в клетках ретикулоэндотелиальной системы, прежде всего в селезенке. Патологический внутриклеточный гемолиз может возникнуть при наследственных дефектах мембраны эритроцита (эритроцитопатии), нарушении синтеза Hb и ферментов (гемоглобинопатии, энзимопатии), иммунологическом конфликте по групповой и резус (Rh)-принадлежности крови матери и плода.

При *внутрисосудистом гемолизе* разрушение эритроцитов происходит непосредственно в кровеносной системе. Патологический внутрисосудистый гемолиз может возникнуть при токсических, механических, радиационных, инфекционных повреждениях мембраны эритроцитов; ПНГ; эритроцитарных энзимопатиях; паразитарных инфекциях, в частности малярии, бабезиозе; приобретенных аутоиммунных гемолитических анемиях (АИГА); посттрансфузионных осложнениях, несовместимости по групповому или Rh-фактору, переливании донорской крови с высоким титром антиэритроцитарных антител и других заболеваниях.

#### Наследственные гемолитические анемии

**Наследственный сфероцитоз (болезнь Минковского–Шоффара)** — наследственная гемолитическая анемия вследствие дефекта мембраны эритроцитов, приводящего к характерному изменению формы эритроцитов (сфероциты), которая гетерогенна по степени тяжести клинических проявлений, дефектам мембранных белков и типу наследования. Распространенность — 1:2000–1:5000 населения, возраст постановки диагноза варьирует, в большинстве случаев — детский и подростковый возраст, может быть у взрослых. Большинство людей имеет слабо или умеренно выраженный гемолиз.

Измененная морфология и более короткая продолжительность жизни эритроцитов связаны с дефицитом или дисфункцией одного из элементов цитоскелета эритроцита, поддерживающих форму, устойчивость к деформации и эластичность эритроцита. Описаны дефекты состава или функции белков мембраны эритроцитов, ответственные за формирование вертикального взаимодействия между внутренним спектринным цитоскелетом и трансмембранными белками. Выраженное уменьшение мембранных белков приводит к фрагментации мембраны, снижению площади поверхности мембраны, повышению ее проницаемости, гемолизу. Циркулирующие микросфероциты имеют сниженную продолжительность жизни (до 12–14 дней), осмотическую резистентность. Через два-три пассажа через селезенку сфероцит подвергается фагоцитозу макрофагами (внутриклеточный гемолиз), развивается спленомегалия.

После脾切除术 срок пребывания сфероцитов в крови значительно возрастает. Заболевание проявляется задержкой роста и развития, холелитиазом, гемолитическими кризами, апластическими кризами, гепатоспленомегалией. Основной признак заболевания — гемолитический синдром, который проявляется желтухой, спленомегалией и анемией. Возникновение заболевания в детском возрасте нарушает нормальное развитие организма, в результате имеются выраженные клинические признаки: деформация скелета (особенно черепа), рано отмечаются увеличение селезенки, общая отсталость развития. При гетерозиготной форме заболевания клинические признаки слабо выражены, но имеют место характерные морфологические изменения эритроцитов (микросфероцитоз). Гемолитический криз возникает под влиянием провоцирующих факторов (инфекция, переохлаждение, переутомление, беременность и др.). Диагностические критерии наследственного сфероцитоза представлены в табл. 4.15.

**Таблица 4.15.** Диагностические критерии наследственного сфероцитоза

Параметр	Особенность при сфероцитозе
Клинические данные	Почти всегда анемия, желтуха и спленомегалия
Признаки гемолиза	Повышение билирубина, ЛДГ и ретикулоцитоз
ОАК	Снижение Hb, MCV в пределах нормы, повышение MCHC, RDW, ретикулоцитоз, IRF в норме
Мазок периферической крови	Наличие сфероцитов
Эритроцитометрия	Средний диаметр эритроцитов снижен, индекс сферичности снижен, кривая Прайс-Джонса сдвинута влево
Осмотическая резистентность эритроцитов	Снижена
ЭМА-тест (проточная цитометрия с флуоресцентным красителем эозин-5-малеимидом)	Снижен

## Глава 4. Лабораторная гематология

Микросфероциты имеют небольшой размер, гиперхромные, без центрального просветления, их число варьирует в зависимости от степени тяжести сфероцитоза. В период гемолитического криза увеличиваются до 30% и выше.

**Наследственные гемолитические анемии, обусловленные нарушением структуры липидов мембраны эритроцитов (акантоцитоз)**, — редкое заболевание, наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Наследственный акантоцитоз выявляется при абетаполипротеинемии. Эритроциты приобретают зубчатый контур, похожий на листья аканта. Аномальные эритроциты разрушаются главным образом в селезенке внутриклеточным гемолизом.

Наблюдаются нормохромная нормоцитарная анемия, ретикулоцитоз.

**Гемоглобинопатии** — наследственно обусловленные нарушения синтеза Hb, приводящие к развитию синдромов анемии разной степени тяжести. Клиническая картина варьирует от бессимптомных форм до тяжелых гемолитических анемий. Количественные гемоглобинопатии выражаются в снижении уровня одного типа глобиновой цепи, создавая дисбаланс в соотношении  $\alpha$ -подобных и  $\beta$ -подобных цепей.

**Талассемии** — гетерогенная группа наследственно обусловленных заболеваний, в основе которых лежит нарушение синтеза одной из полипептидных цепей глобина, что приводит к увеличению продукции других цепей и развитию дисбаланса между ними. Талассемии относят к количественным гемоглобинопатиям, так как структура цепей Hb не изменена. В норме синтез цепей глобина сбалансирован. В результате сложных молекулярных дефектов нарушается синтез одного из видов цепей и происходит избыточное накопление другого. При  $\alpha$ -талассемии наблюдается патологическое накопление  $\beta$ -цепей, при  $\beta$ -талассемии —  $\alpha$ -цепей (табл. 4.16).

**Таблица 4.16.** Типичные изменения фракций гемоглобина при разных формах талассемии

Форма талассемии	HbF, %	HbA <sub>2</sub> , %
<b><math>\beta</math>-Талассемия</b>		
Малая форма	<5,0%	>3,5%
Промежуточная форма	10–50% (иногда до 100%)	>3,5%
Большая форма	>50%	<3,5%
<b><math>\alpha</math>-Талассемия</b>		
С минимальными проявлениями		2–3%
Немое носительство	Норма	Норма
Гемоглобинопатия H (может присутствовать 1–40% HbH)	0–1%	до 1%

Наиболее часто встречается  $\beta$ -талассемия. Цепи, синтезируемые в избыточном количестве, накапливаются и откладываются в эритрокариocyтах костного мозга, вызывая повреждение клеточной мембраны и преждевременную гибель клеток (неэффективный эритропоэз). Это приводит к нарушению соотношения между резко раздраженным эритроидным ростком костного мозга и небольшим повышением числа RET. В зависимости от формы талассемии клиническое течение и лабораторные данные варьируют. Очаги экстрамедуллярного кроветворения обнаруживаются в селезенке и печени, вызывая сплено- или гепатоспленомегалию.

**$\alpha$ -Талассемия** — результат снижения синтеза  $\alpha$ -полипептидных цепей вследствие делеции одного или нескольких генов  $\alpha$ -цепей.

Лабораторная диагностика гемоглобинопатий начинается с ОАК, где регистрируется микроцитарная гипохромная анемия (MCV <80 фл, MCH <27 пг). В окрашенных препаратах крови отмечается анизопойкилоцитоз (мишеневидные эритроциты). Большая и промежуточная формы талассемий проявляются как гемолитическая анемия средней или тяжелой степени тяжести с высоким ретикулоцитозом, нормобластозом до 50–300 NRBC на 100 лейкоцитов, множеством мишеневидных эритроцитов. Общее количество эритроцитов при этом снижено или находится в пределах референтного интервала. Малую талассемию сопровождают выраженные микроцитоз и гипохромия, RET в пределах референтных значений или незначительно повышены, высокий эритроцитоз (до  $6-7 \times 10^9/\text{л}$ ), мишеневидные эритроциты.

Для предварительной диагностики количественных гемоглобинопатий предложены расчетные эритроцитарные индексы, разработанные на соотношении классических и современных параметров анализа крови.

*Индекс Ментцера (М)* рассчитывается как соотношение MCV/RBC; если он больше 13, то более вероятна ЖДА, если результат больше 13, то более вероятна ЖДА.

*Индекс Урречаги (MicroR–HYP0–He–RDW–CV)* (анализаторы компании Sysmex), или индекс %M–%H (гематологические анализаторы компаний Advia, Siemens, Mindrey). Пороговые значения индекса Урречаги составляют <–7,6 для ЖДА, >–7,6 для минорной  $\beta$ -талассемии. Для индекса %Micro/%Hypo (Siemens, Advia) значения <1,0 характерны для ЖДА, >2,0 – для талассемии.

Методы лабораторной диагностики гемоглобинопатий включают разные типы электрофореза, наиболее эффективным является капиллярный электрофорез. Убедительные диагностические результаты получают молекулярно-биологическим методом с оценкой генетических полиморфизмов и аномалий.

**Серповидноклеточная анемия (гемоглобинопатия S)** — качественная гемоглобинопатия, связанная с заменой в  $\beta$ -цепи глобина глютаминовой кислоты на валин. Замена одной аминокислоты на другую сопровождается тяжелыми физико-химическими изменениями Hb и ведет к деполимеризации HbS. Дезоксигенация вызывает отложение молекул аномального Hb в виде мономеров, которые агрегируют, превращаясь в кристаллы продолговатой формы, изменяя тем самым мембрану и форму эритроцитов в виде серпов. Средняя продолжительность жизни эритроцитов при анемии, гомозиготной по HbS, составляет около 17 дней. В то же время такая аномалия делает эти эритроциты непригодными для жизнедеятельности плазмодий, носители HbS не болеют малярией, что путем естественного отбора привело к распространению этой гемоглобинопатии в странах «малярийного пояса».

## Глава 4. Лабораторная гематология

Болезнь характеризуется гемолитическими кризами с внутрисосудистым гемолизом, поэтому частым осложнением бывают тромбозы мелких и крупных сосудов разных органов. В крови — невыраженная нормохромная анемия. При гемолитическом кризе наблюдаются резкое падение уровня Hb и HCT, ретикулоцитоз, нормобластоз, тельца Жолли, серповидные эритроциты, базофильная пунктация, мишеневидные эритроциты, пойкилоцитоз, лейкоцитоз, тромбоцитоз, повышение СОЭ, повышение уровня неконъюгированного билирубина. Моча черного цвета за счет гемоглобинурии, обнаруживается гемосидерин.

**Гемолитические анемии, обусловленные носительством аномальных нестабильных Hb C, D, E**, — достаточно распространенная форма. В HbC глютаминовая кислота в положении 6 заменена лизином, что ведет к его кристаллизации. В HbE глютаминовая кислота в положении 26 заменена лизином, в HbD глютаминовая кислота в положении 121 заменена на глутамин. Гетерозиготные формы протекают без клинических проявлений. У гомозигот клиническая симптоматика обусловлена анемией: характерны легкая гемолитическая анемия, желтуха, спленомегалия. Анемия носит нормоцитарный характер, в крови много мишеневидных клеток. Характерна склонность к кристаллизации молекул Hb. Сочетание всех трех видов гемоглобинопатий с талассемией дает тяжелую клиническую картину. HbC распространен среди афроамериканцев и африканцев ЮАР, HbE чаще всего встречается в Юго-Восточной Азии и среди африканцев.

**Наследственные гемолитические анемии, обусловленные дефицитом ферментов эритроцитов**, чаще всего связаны с дефектами глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, пируваткиназы или глутатионредуктазы.

**Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа** — единственный фермент пентозофосфатного пути, первичный дефицит которого ведет к гемолитической анемии. Это самая распространенная эритроцитарная ферментопатия. Ген синтеза глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы сцеплен с X-хромосомой, поэтому заболевание проявляется значительно чаще у мужчин. Провоцирующими факторами гемолитического криза могут быть инфекционные заболевания (грипп, сальмонеллез, вирусный гепатит), употребление в пищу конских бобов (фавизм), вдыхание цветочной пыльцы. В период криза уровень Hb снижается до 20–30 г/л, увеличивается количество RET, лейкоцитов со сдвигом лейкоцитарной формулы влево до миелоцитов. Количество тромбоцитов обычно не меняется. При тяжелом гемолитическом кризе может выявляться большое количество телец Гейнца–Эрлиха как результат преципитации цепей глобина и белков мембраны эритроцитов. Отмечаются анизо- и пойкилоцитоз, полихроматофилия, базофильная пунктация, тельца Жолли. В сыворотке крови повышается содержание непрямого неконъюгированного Hb (внутрисосудистый гемолиз), наблюдается гипогаттоглобинемия. В моче — гемоглобинурия, гемосидеринурия. Диагностика основана на определении уровня глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

### Иммунные гемолитические анемии

Иммунные гемолитические анемии развиваются вследствие образования антител к эритроцитарным антигенам. Выделяют две основные формы — аллоиммунные гемолитические анемии и АИГА. Процесс иммунного гемолиза эритроцитов связан со взаимодействием IgM или IgG с антигенами мембраны эритроцитов, после чего эритроцит разрушается макрофагами, преимущественно в селезенке. Такой вид иммунного гемолиза характеризуется внутриклеточным разрушением эритроцитов и встречается чаще всего. В случае присоединения компонента к Fc-

фрагменту Ig и последующей активации системы комплемента происходит преимущественно внутрисосудистый гемолиз, показателями которого являются гемоглобинемия, гемоглобинурия и гемосидеринурия.

**АИГА** обусловлены наличием антител к антигенам эритроцитов. АИГА встречаются с частотой от 1:41 000 до 1:80 000 в любых возрастных группах; соотношение женщин и мужчин составляет 2:1. АИГА разделяют на первичные (идиопатические) и более распространенные вторичные, встречающиеся при других заболеваниях. Вторичные АИГА чаще всего связаны с лимфоидными новообразованиями, СКВ, РА, а также с неспецифическим язвенным колитом, врожденными иммунодефицитами, раком толстой кишки, легких, желудка и яичников, некоторыми инфекциями. По механизму разрушения эритроцитов выделяют внутриклеточный, внутрисосудистый и смешанный варианты гемолиза. По течению АИГА подразделяются на острые и хронические. На основании серологической характеристики антител и клинических проявлений выделяют четыре вида АИГА: АИГА с неполными тепловыми агглютинидами (47–80% АИГА); АИГА с тепловыми гемолизинами; АИГА с полными холодовыми агглютинидами (12%); АИГА с двухфазными гемолизинами. АИГА диагностируют по наличию аутоантител, фиксированных на эритроцитах, с помощью пробы Кумбса, при которой антиглобулиновые антитела вступают во взаимодействие с Ig эритроцитов (прямая реакция Кумбса) и вызывают агглютинацию эритроцитов. Эритроциты, на которых, помимо Ig, фиксирован комплемент, быстрее удаляются из кровотока. В этом процессе принимают участие макрофаги печени и селезенки. При отсутствии комплемента на поверхности эритроцита решающую роль в гемолизе играют молекулы Ig. Прямая проба Кумбса в большинстве случаев положительна, но при массивном гемолизе, а также при холодовых и гемолизинных формах АИГА, вызванных IgA- или IgM-аутоантителами, может быть отрицательной. При АИГА выявляется нормо- или макроцитарная гиперхромная анемия со значительным анизоцитозом, полихромазией, относительным и абсолютным ретикулоцитозом, что характеризует выраженную эритропоэтическую активность костного мозга. Число лейкоцитов и тромбоцитов обычно не изменено, но при интенсивном гемолизе возможны лейкоцитоз со сдвигом влево, а также тромбоцитоз или тромбоцитопения. В мазке периферической крови, как правило, сочетание микросфероцитов с макроэритроцитами, но в зависимости от свойств антител может наблюдаться холодовая агглютинация, иногда шизоциты. Ключевые изменения биохимических показателей крови: гипербилирубинемия (преобладает непрямая, неконъюгированная фракция), повышение активности ЛДГ в сыворотке в 2–8 раз (в зависимости от интенсивности гемолиза).

#### **Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (болезнь Маркиафавы–Микели)**

ПНГ — редкое приобретенное клональное заболевание системы крови с внутрисосудистым гемолизом, дисфункцией костного мозга и повышенным риском тромботических и органных осложнений. По данным международного регистра ПНГ, инициированного в 2003 г., заболеваемость ПНГ составляет 1–1,5 на 1 000 000 населения в год, возникает в любом возрасте, чаще у лиц среднего возраста.

## **Глава 4. Лабораторная гематология**

Причиной повышенного гемолиза является дефект мембраны эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, обусловленный соматической мутацией в стволовых кроветворных клетках гена *PIGA*, ответственного за синтез гликозилфосфатидилинозитолового якоря (GPI), через который большинство поверхностных молекул (CD55, CD59, CD14, CD16, CD58 и др.) прикрепляются к клеточной мембране. GPI-белки функционируют как ферменты, рецепторы, регуляторы комплемента и адгезивные молекулы. В отсутствие экспрессии GPI-белков (CD55 и CD59) на поверхности эритроцитов происходит неконтролируемая активация компонентов комплемента и сборка мембраноатакующего комплекса с последующим лизисом клетки. Эритроциты подвергаются внутрисосудистому гемолизу, носящему кризовый, периодический характер. Ночные гемолитические кризы сопровождаются выделением мочи бурого цвета (гемоглобинурия, гемосидеринурия), однако гемоглобинурия отмечается лишь у 25–27% больных. Склонность к тромбозам сосудов наряду с тромбоцитопенией является частым осложнением болезни.

В гемограмме отмечается анемия, которая носит разнонаправленный характер, то есть может быть нормохромно-нормоцитарной, микроцитарно-гипохромной и макроцитарной. Гемолиз, потеря железа с мочой, гемосидероз тканей нередко приводят к развитию ЖДА, которую подтверждают, исследуя основные показатели обмена железа. Зачастую у пациентов с ПНГ выявляется дефицит фолатов или витамина B<sub>12</sub> или сочетанный дефицит витаминов. Проточная цитометрия является «золотым стандартом» диагностики ПНГ. Для выявления клеток крови с дефицитом GPI (первичная диагностика и последующий мониторинг) используется скрининговая панель с маркерами CD59 (эритроциты), CD24/FLAER (гранулоциты), CD14/FLAER (моноциты). Диагностика ПНГ осуществляется при обязательном исследовании ПНГ клона на эритроцитах, нейтрофилах и моноцитах. Постоянный внутрисосудистый гемолиз, а также гемотрансфузии не позволяют оценить истинный размер клона ПНГ по эритроцитам, однако он может быть оценен по лейкоцитам. При выявлении клона  $\geq 0,01\%$  лейкоцитов с полным или частичным дефицитом GPI-связанных белков пациенты подлежат последующему наблюдению и мониторингу величины клона. Ошибки диагностики классической ПНГ составляют более 78%, и наиболее частыми диагнозами являются ЖДА, B<sub>12</sub>- или фолиеводефицитная анемия, АИГА, МДС, ХБП, нефрит, гепатит и др. Причинами диагностических ошибок являются недостаточная осведомленность врачей о ПНГ и несоблюдение формальных алгоритмов оценки гемолиза, цитопении, тромбозов.

#### **Гемолитические анемии при механическом повреждении эритроцитов**

При избыточном воздействии сил сдвига и турбулентности в периферической крови появляются фрагменты эритроцитов необычной формы (треугольные, шлемовидные и др.), они служат основанием для установления диагноза. Из-за присутствия подобных фрагментов эритроцитов MCV снижается, а RDW увеличивается (проявление анизоцитоза). Источник травмирования может находиться вне сосудов (маршевая гемоглобинурия), внутри сердца (обызвествление и стеноз аортального клапана или дефекты протезов клапанов сердца), в артериолах (злокачественная артериальная гипертензия), в концевых артериолах (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания —

ДВС). При микроангиопатической гемолитической анемии, возникающей из-за травматической фрагментации эритроцитов при прохождении через искусственные клапаны сердца или поврежденные кровеносные сосуды, анемия может быть резкой с фрагментированными эритроцитами (шизоциты, шлемовидные эритроциты). При повышенном гемолизе отмечается лейкоцитоз с нейтрофильным сдвигом и выраженной тромбоцитопенией.

*Маршевая гемоглобинурия* сопровождается внутрисосудистым гемолизом в результате механического повреждения эритроцитов в капиллярах стоп. Часто единственным симптомом болезни является преходящая гемоглобинурия с появлением мочи черного цвета. Интенсивность гемоглобинурии и интервалы между приступами зависят от тяжести поражения и нагрузки.

#### Гемолитико-уремический синдром

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) — полиэтиологическое расстройство, проявляющееся триадой симптомов: Кумбс-негативной гемолитической анемией с наличием шизоцитов, тромбоцитопенией и острой почечной недостаточностью. Указанные признаки являются составляющими тромботической микроангиопатии — генерализованной окклюзии сосудов мелкого калибра тромбами, возникшими вследствие повреждения эндотелия. В результате поражения эндотелиальных клеток происходит механическое повреждение эритроцитов, активация агрегации тромбоцитов с образованием тромбов в микроциркуляторном русле, особенно в почках. Заболевание чаще развивается у детей до 10 лет, реже у взрослых после перенесенных или хронических инфекций. У детей раннего возраста в большинстве случаев (90–95%) развивается так называемый типичный или постдиарейный ГУС (диарея + ГУС), который вторичен по отношению к инфекции *Escherichia coli*, продуцирующей Шига-токсин (Shigatoxine — Stx, продуцирующий *E. coli*; STEC). Реже инфекционными стимулами служат шигеллы и пневмококки. При ГУС в крови увеличено содержание мультимеров фактора Виллебранда (vWF), при этом активность металлопротеиназы ADAMTS-13, которая разрушает vWF, не изменена. STEC-инфекция обнаруживается приблизительно в 85% случаев ГУС с помощью посева кала. Другим вариантом диагностики STEC-инфекции являются выявление гена Шига-токсина в кале методом ПЦР.

Другая форма ГУС, называемая атипичной, встречается гораздо реже (5–10% случаев). *Атипичный ГУС* — системное заболевание из группы тромботических микроангиопатий с прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом, в основе которого лежит неконтролируемая активация альтернативного пути комплемента наследственной или приобретенной природы, приводящая к генерализованному тромбообразованию в сосудах микроциркуляторного русла. Тромбоцитопения (менее  $150 \times 10^9/\text{л}$ ) развивается вследствие потребления тромбоцитов в процессе микроциркуляторного тромбообразования. Микроангиопатическая гемолитическая анемия ( $\text{Hb} < 100 \text{ г/л}$ ) является результатом механического гемолиза вследствие повреждения мембран эритроцитов при контакте с тромбами. Наличие гемолиза подтверждает низкий уровень гаптоглобина и повышенный ЛДГ в крови, а микроангиопатическую природу гемолиза — наличие шизоцитов (шистоцитов) в мазке периферической крови и отрицательная реакция Кумбса. Поражение почек в большинстве случаев проявляется в виде острой почечной недостаточности. У пациентов с сохраненным диурезом отмечается протеинурия разной выраженности. При постепенном развитии заболевания может развиваться нефротический синдром, возможно появление гематурии. Экстраренальные проявления заболевания обнаруживают не менее чем у 20–30% пациентов. Основными диагностическими критериями атипичного ГУС являются: анемия, тромбоцитопения, шизоциты в мазке крови (более 1%), повышение уровня ЛДГ и билирубина. Дефицит активности ADAMTS-13 со снижением менее 10% является диагностическим маркером тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП). При любых других тромботических микроангиопатиях (ТМА), включая атипичный ГУС, активность ADAMTS-13 может снижаться, но всегда превышает 10%. При подозрении на атипичный ГУС рекомендовано выполнение молекулярно-генетического исследования для выявления мутаций генов белков-регуляторов комплемента.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.6. Острые лейкозы

**Лейкозы** — опухолевые клональные заболевания кроветворной системы с первичным поражением костного мозга. Мишенью опухолевой трансформации являются гемопоэтические стволовые клетки или коммитированные клетки-предшественницы. Лабораторная диагностика опухолевых заболеваний кроветворной ткани основывается на результатах морфоцитохимических, цитогенетических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических исследований.

ОЛ классифицируются на ОМЛ, лимфоидные, смешанно-линейные и недифференцированные. В каждой группе в зависимости от особенностей морфологии бластных клеток выделяют несколько вариантов. Частота встречаемости ОМЛ и острых лимфоидных лейкозов отличается в разных возрастных группах. ОЛЛ регистрируются в 80% случаев у детей и только в 20% — у взрослых. На долю ОМЛ приходится от 15 до 20% ОЛ у детей в возрасте до 15 лет и свыше 80% — у взрослых. Клинические проявления ОЛ разнообразны и определяются патофизиологическими механизмами развития заболевания. В соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. диагноз ОЛ устанавливается при  $\geq 20\%$  бластных клеток в костном мозге и/или крови.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.6.1. Острые миелоидные лейкозы

ОМЛ — гетерогенные опухолевые заболевания, характеризующиеся блоком дифференцировки и неконтролируемой пролиферацией гемопоэтических клеток-предшественниц. Основным критерием диагностики ОМЛ, определяемых дифференцировкой, являются  $\geq 20\%$  бластных клеток в костном мозге и/или крови (за исключением острого

эритроидного лейкоза). В подсчет бластных клеток включают миелобласты, монобласты (и их эквивалент — промоноциты), мегакариобласты. Эритробласты включают в счет клеток эритроидного роста. Среди цитохимических реакций актуальной остается МПО ( $\geq 3\%$  позитивных бластных клеток); реакция на липиды чаще всего аналогична МПО, но не заменяет ее; PAS-реакция в миелобластах представлена в диффузной форме, в моноцитарных клетках — в диффузно-гранулярной форме; моноцитарная линия дифференцировки бластных клеток подтверждается выявлением НЭ с ингибцией фторидом натрия. Обязательными методами диагностики ОМЛ являются иммунофенотипирование с помощью проточной цитометрии, цитогенетические и молекулярно-генетические исследования. Диагностические критерии вариантов ОМЛ, определяемых дифференцировкой, представлены в табл. 4.17.

**Таблица 4.17.** Варианты острых миелоидных лейкозов, определяемых дифференцировкой

Название	Характеристика
ОМЛ с минимальной дифференцировкой	Бластные клетки негативны на МПО ( $< 3\%$ ), экспрессируют два и более маркера миелоидной дифференцировки (CD117, CD13, CD33)
ОМЛ без созревания	Бластные клетки позитивны на МПО ( $> 3\%$ ) любым методом (цитохимия, проточная цитометрия), два и более маркера миелоидной дифференцировки (CD117, CD13, CD33, МПО). Созревающие клетки гранулоцитарного роста $< 10\%$ ядерных клеток КМ
ОМЛ с созреванием	Бластные клетки позитивны на МПО ( $> 3\%$ ) любым методом. Созревающие клетки гранулоцитарного роста $> 10\%$ ядерных клеток КМ, клетки моноцитарного роста $< 20\%$ . Бластные клетки экспрессируют два и более маркера миелоидной дифференцировки (CD117, CD13, CD33, МПО)
Острый миеломоноцитарный лейкоз	$\geq 20\%$ моноцитов и их предшественников (монобласты и промоноциты) всех ядерных клеток КМ; $\geq 20\%$ созревающих гранулоцитарных клеток; $\geq 3\%$ бластов, положительных на МПО любым методом. Бласты и промоноциты экспрессируют два и более моноцитарных маркера, включая CD11c, CD14, CD36 и CD64, или позитивны на НЭ с подавлением NaF
Острый моноцитарный лейкоз	$\geq 80\%$ моноцитов и/или их предшественников (монобластов и/или промоноцитов); $< 20\%$ созревающих клеток гранулоцитарного роста. Бласты и промоноциты экспрессируют два и более моноцитарных маркера, включая CD11c, CD14, CD36 и CD64, или позитивны на НЭ с подавлением NaF
Острый эритроидный лейкоз	$\geq 30\%$ незрелых эритроидных клеток (проэритробластов или пронормобластов). Все клетки эритроидного ряда составляют $\geq 80\%$ всех ядерных клеток КМ. Экспрессия CD105, CD71, CD36, CD117, CD235a
Острый мегакариобластный лейкоз	Бластные клетки экспрессируют как минимум один или несколько маркеров гликопротеинов: CD41 (гликопротеин IIb), CD61 (гликопротеин IIIa) или CD42b (гликопротеин Ib)
Острый базофильный лейкоз	Бластные клетки и незрелые/зрелые базофилы демонстрируют метакромазию при окрашивании толудиновым синим. Бластные клетки негативны на миелопероксидазу (МПО), липиды и НЭ. Отсутствует высокая экспрессия CD117 (для исключения тучноклеточного лейкоза). Экспрессия CD34, HLA-DR (в отличие от зрелых базофилов), CD123, CD203c, CD11b, CD9, CD22

Варианты острых миелоидных лейкозов с определяющими генетическими аномалиями

Диагноз ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями устанавливается при пороге  **$< 20\%$**  бластных клеток. К этим вариантам относят: острый промиелоцитарный лейкоз с *PML::RARA*; ОМЛ-CBF (core binding factor): ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* и ОМЛ с *CBFB::MYH11*; ОМЛ, связанный с МДС; ОМЛ с мутацией в гене *NPM1*. Несмотря на характерные специфические морфологические особенности бластных клеток при этих вариантах ОМЛ, верификация диагноза должна осуществляться только после цитогенетического исследования.

**Острый промиелоцитарный лейкоз с *PML::RARA*** имеет ряд клинических и биологических особенностей.

Аномальные промиелоциты являются эквивалентами бластных клеток. Клиническая картина заболевания характеризуется выраженным геморрагическим синдромом, осложняется развитием ДВС. Острый промиелоцитарный лейкоз имеет два морфологических варианта — *гипергранулярный* и *гипогранулярный (вариантный)*. Особенностью аномальных промиелоцитов являются выраженный полиморфизм и гиперхромия ядер, нередко отсутствие нуклеол. В отличие от нормальных промиелоцитов, в аномальных клетках отсутствует перинуклеарная зона просветления (зона аппарата Гольджи), в цитоплазме клеток — грубая, обильная, полиморфная азурофильная зернистость. Гранулы варьируют по величине, форме. Крупные гранулы могут сливаться, образуя палочки Ауэра, иногда в виде пучков. В некоторых случаях наблюдаются разрушенные гипергранулярные промиелоциты, при этом гранулы и палочки Ауэра определяются внеклеточно или в макрофагах. При гипогранулярном варианте острого промиелоцитарного лейкоза, часто сопровождающегося гиперлейкоцитозом, клетки характеризуются складчатой, двудольчатой формой ядер, мелкой пылевидной зернистостью в цитоплазме и могут напоминать промоноциты. Для дифференциальной диагностики необходимо использовать основные цитохимические реакции (МПО, НЭ с ингибцией NaF).

## Глава 4. Лабораторная гематология

**ОМЛ-CBF** включает ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* и ОМЛ с *CBFB::MYH11*. Общий морфологический признак: палочки Ауэра в клетках гранулоцитарного роста на любой стадии созревания. Морфоцитохимическая характеристика ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* соответствует ОМЛ с созреванием, реже — острому миеломоноцитарному лейкозу или ОМЛ без созревания. Нередко в костном мозге повышено число эозинофилов, базофилов и тучных клеток. Отмечаются признаки дисплазии в клетках гранулоцитарного роста. ОМЛ с *CBFB::MYH11* характеризуется моноцитарной дифференцировкой клеток и повышенным количеством эозинофилов в КМ на разных стадиях созревания, имеющих признаки дисплазии, что отличает их от ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*.

**ОМЛ с мутацией в гене *NPM1*** свойственна миеломоноцитарная или моноцитарная дифференцировка. Бластные клетки имеют особенность — чашкообразную инвагинацию ядра (cup-like nuclear). Более 10% таких клеток среди бластной популяции характерно для мутации в генах *NPM1* и *FLT3-ITD*.

**Для ОМЛ с мутацией *CEBRA*, *BCR::ABL1* и ОМЛ**, связанного с миелодисплазией, обязательным является количество бластных клеток  $\geq 20\%$ .

Таким образом, современная диагностика разнообразных вариантов ОМЛ основана на широком комплексе лабораторных технологий, включая морфоцитохимические, иммунофенотипические, цитогенетические и молекулярно-биологические исследования.

Глава 4. Лабораторная гематология

4.6.2. Острые лимфобластные лейкозы  
ОЛЛ регистрируются в 80% случаев у детей и в 20% — у взрослых. Это гетерогенная группа заболеваний, каждое из которых имеет клинические, иммунологические и прогностические особенности. В классификации ВОЗ 2022 г. выделены варианты В-ОЛЛ/лимфомы и Т-ОЛЛ/лимфомы с акцентом на молекулярно-генетические варианты. Установление линейной принадлежности ОЛЛ возможно при использовании многоцветной проточной цитометрии и/или иммуногистохимии (ИГХ). Классические цитохимические реакции продолжают использоваться в скрининге ОЛ. Бластные клетки при ОЛЛ характеризуются негативной реакцией на МПО, хлорацетатэстеразу и положительной PAS-реакцией, выявляющейся в 3% и более клеток в виде мелких или крупных гранул, иногда сливающихся в блоки. Реакция на липиды чаще всего отрицательная, в редких случаях лимфобласты имеют положительную реакцию. Наиболее информативным и решающим методом типирования ОЛЛ является иммунофенотипическая характеристика клеток с использованием моноклональных антител, которая позволяет установить линейную направленность бластных клеток, а также стадию дифференцировки внутри каждой линии, диагностировать смешанные варианты ОЛ и мониторировать МОБ.

В-клеточные и Т-клеточные ОЛЛ классифицируют на четыре группы (табл. 4.18).  
**Таблица 4.18.** Иммунологическая классификация острых лимфобластных лейкозов (EGIL, 1995 г., в модификации AIEOP-BFM ALL 2016 г.)

Вариант ОЛЛ	Основной диагностический критерий	Примечание
<b>В-линейные</b>		
Про-В-ОЛЛ (В-I)	CD10–; sIgM–; поверхностные и цитоплазматические легкие цепи отсутствуют	Маркеры В-клеточной линейности (CD19 и/или cyCD79a и/или cyCD22)
Common В-ОЛЛ (В-II)	CD10+; sIgM–; поверхностные и цитоплазматические легкие цепи отсутствуют	Наличие маркеров В-клеточной линейности
Пре-В-ОЛЛ (В-III)	Sy IgM+; CD10+ или CD10–; поверхностные и цитоплазматические легкие цепи отсутствуют	CD10neg/low В-III часто ассоциируется с MLL-реаранжировкой
Зрелый В-ОЛЛ (В-IV)	Поверхностные и цитоплазматические легкие цепи $\kappa$ - или $\lambda$ -типа; поверхностный IgM	
<b>Т-линейные</b>		
Про-Т-ОЛЛ (Т-I)	cytCD3+, CD7+. CD2-CD5-CD8-	CD1a-TCR-
Пре-Т-ОЛЛ (Т-II)	CD7+. CD2+ и/или CD5+ и/или CD8+	CD1a-TCR-
Кортикальный Т-ОЛЛ (Т-III)	CD7+, и/или CD2+, и/или CD5+, и/или CD8+. CD1a+	TCR-
Зрелый Т-ОЛЛ (Т-IV)	CD7+, и/или CD2+, и/или CD5+, и/или CD8+. CD1a–, sCD3+	TCR $\alpha/\beta+\alpha/\beta$ -Т-ОЛЛ. TCR $\gamma/\delta+\gamma/\delta$ -Т-ОЛЛ
ЕТР-ОЛЛ (ОЛЛ из ранних Т-клеточных	Т-линейная направленность (sCD3+, CD7+).	ЕТР-ОЛЛ характеризуется особым профилем экспрессии генов и клеточных маркеров,



предшественников)	CD1a–, CD8–. CD5 менее 75%. Позитивный один из следующих маркеров: HLA-DR, CD11b, CD13, CD33, CD34, CD65, CD117	плохим ответом на химиотерапию и высоким риском рецидива
-------------------	---	--

Примечание. TCR — Т-клеточный рецептор.

Наиболее благоприятным считается В-II (*common*) вариант ОЛЛ, чаще всего встречающийся у детей.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.6.3. Острые лейкозы неопределенной линейности

В классификации ВОЗ 2022 г. объединены билинейные и бифенотипические ОЛ в ОЛ со смешанным фенотипом. В эту группу ОЛ входят следующие варианты: острый недифференцированный лейкоз, ОЛ смешанного фенотипа с *BCR::ABL1*, ОЛ смешанного фенотипа KMT2A-реаранжировкой, ОЛ смешанного фенотипа В/ОМЛ, ОЛ смешанного фенотипа Т/ОМЛ, ОЛ смешанного фенотипа неуточненный (редкие варианты). Критерии диагностики смешанно-линейных лейкозов представлены в табл. 4.19.

**Таблица 4.19.** Критерии диагностики острых лейкозов смешанного фенотипа в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения 2022 г.

<b>Миелоидная линия</b>
МПО — интенсивность флюоресценции хотя бы в части бластных клеток превышает 50% интенсивности зрелых нейтрофилов или моноцитарная дифференцировка [два или более из перечисленных маркеров: НЭ (цитохимия), CD11c, CD14, CD64 или лизоцим]
<b>Т-линия</b>
Цитоплазматическая или поверхностная экспрессия CD3 (использование моноклональных анти-CD3 к эпислон-цепи)
<b>В-линия</b>
Яркая экспрессия CD19a и один или более маркеров с сильной экспрессией: CD10, CD79a, CD22, или слабая экспрессия CD19b и двух или более антигенов с яркой экспрессией: CD10, CD22, CD79a

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.6.4. Оценка минимальной остаточной болезни при острых лейкозах

**МОБ** — состояние сохранения опухолевых клеток в крайне низких концентрациях, выявляемых только с помощью высокочувствительных методов диагностики, таких как многопараметрическая проточная цитометрия и молекулярно-генетические исследования (ПЦР и высокопроизводительное NGS), у пациентов во время или после лечения. Согласно многочисленным исследованиям, включая проведенные метаанализы, наличие МОБ у пациентов с ОЛ, достигших полной клинико-гематологической ремиссии, ассоциируется с высоким риском развития рецидива заболевания и худшим клиническим исходом по сравнению со случаями отсутствия выявляемого остаточного опухолевого клона. Показатель МОБ как при ОМЛ, так и при ОЛЛ является важным прогностическим маркером, позволяющим оценить эффективность лечения и своевременно изменить терапевтический подход с целью предотвращения развития рецидива и улучшения показателей выживаемости.

В качестве материала для оценки МОБ необходимо использовать первую порцию аспирата костного мозга объемом 1–2 мл с антикоагулянтом ЭДТА. Крайне важно избегать разбавления образца периферической кровью. Сроки транспортировки исследуемого материала не должны превышать 48 ч. В основе проточной цитометрии лежит поиск иммунофенотипических отличий между нормальными клетками КМ разных стадий созревания и опухолевыми бластами. При сравнении методов важно отметить, что проточная цитометрия обеспечивает относительно быстрое получение результата (в течение 1–2 сут), является менее дорогостоящим исследованием по сравнению с ПЦР и NGS. Оценка МОБ с помощью молекулярно-генетических методов выполняется дольше и характеризуется высокой стоимостью, однако позволяет достигать высокой чувствительности анализа.

Согласно большинству рекомендаций и протоколов лечения ОЛ, анализ МОБ проводится в контрольных точках после индукции, в ремиссии на этапах консолидации и поддерживающей терапии, до и после выполнения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), а также индивидуально в разное время в зависимости от применяемой схемы лечения.

**МОБ при ОМЛ** оценивается, как правило, многопараметрической проточной цитометрией, за исключением острого промиелоцитарного лейкоза, при котором диагностика МОБ осуществляется только с помощью молекулярно-генетического метода. Согласно рекомендациям Европейской рабочей группы по ОЛ, панель моноклональных антител должна быть не менее чем 8-цветной, при этом обязательно должны исследоваться маркеры CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR, а также желательно CD11b, CD14, CD64, CD4, CD371, CD45RA. Минимальный требуемый уровень чувствительности при оценке МОБ ОМЛ составляет  $10^{-3}$  (0,1% опухолевых клеток среди проанализированных). Молекулярно-генетические исследования МОБ ограниченно применимы при ОМЛ, поскольку надежные маркеры для поиска опухолевого клона выявляются лишь в 40–60% случаев данного заболевания. Такими мишенями являются химерные транскрипты (*PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*), а также мутации в гене *NPM1*. Чувствительность анализа МОБ при ОМЛ с помощью ПЦР составляет, как правило,  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . Метод NGS остается крайне дорогостоящим и не используется в широкой практике на сегодняшний день, при этом

характеризуется способностью анализировать большое количество генетических маркеров одновременно и возможностью достижения высокой чувствительности (вплоть до  $10^{-6}$ ).

**МОБ при острых лимфоидных лейкозах** оценивается методом многоцветной проточной цитометрии, который применим практически во всех случаях и позволяет достигать чувствительности  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . При В-ОЛЛ данный анализ стандартизован и предполагает обязательное исследование следующих маркеров: CD45, CD19, CD10, CD34, CD38, CD20, CD58. Отдельным преимуществом иммунофенотипирования является возможность оценки так называемых таргетируемых антигенов (мишеней для иммунотерапии) в рамках исследования МОБ. При Т-ОЛЛ анализ требует индивидуального подхода при составлении панели антител с учетом знаний особенностей первичного иммунофенотипа опухолевых клеток. Среди молекулярно-генетических методов поиска МОБ при ОЛЛ — аллель-специфичная ПЦР и NGS остаются трудоемкими и дорогостоящими подходами, требующими проведения исследования при первичной диагностике для подбора пациент-специфичных праймеров. ПЦР с обратной транскрипцией ограниченно применима в связи с наличием транскриптов химерных генов лишь в части случаев данного заболевания. Однако молекулярно-генетические методы остаются более чувствительными, чем проточная цитометрия.

С появлением методов оценки МОБ изменилось лечение ОЛ. МОБ-ориентированная терапия представляет собой индивидуализированный подход. Своевременное проведение ТГСК и/или применение таргетных препаратов в случаях выявления МОБ способствуют достижению молекулярной ремиссии с целью предотвращения развития рецидивов, а следовательно, улучшению показателей выживаемости при ОЛ. В этой связи актуальной задачей КЛД является дальнейшее развитие как проточной цитометрии, так и молекулярно-генетических исследований, поиск новых мишеней и увеличение чувствительности методов обнаружения остаточного опухолевого клона.

Глава 4. Лабораторная гематология

4.7. Миелодиспластические синдромы

**МДС** — гетерогенная группа приобретенных клональных заболеваний системы крови, развивающихся из стволовых кроветворных клеток. МДС характеризуется неэффективным гемопоэзом, прогрессирующей цитопенией в крови, морфологическими признаками дисплазии и риском трансформации в ОМЛ. Под термином «неэффективный гемопоэз» подразумевают несоответствие нормо- или гиперклеточного костного мозга и одно-, двух- или трехростковой цитопении в периферической крови. МДС присущи морфологические признаки дисгемопоэза в одном или более ростках кроветворения. Этиология МДС неизвестна. На момент постановки диагноза МДС средний возраст пациентов составляет 77 лет, менее 10% моложе 50 лет. До 40 лет заболеваемость МДС составляет 0,1 случая на 100 000, но прогрессивно увеличивается с возрастом от 60 до 90 лет (от 2,2 до 56,8 случая на 100 000). В соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. рекомендуемый порог дисплазии установлен на уровне  $\geq 10\%$  в одной или нескольких линиях миелопоэза при наличии соответствующих клинико-лабораторных данных (анемия, нейтропения, моноцитоз, тромбоцитопения) (**табл. 4.20**).

Таблица 4.20. Признаки дисплазии при миелодиспластических синдромах

Дизэритропоэз	Костный мозг: многоядерность, кариорексис, признаки мегалобластoidности, межъядерные мостики, асинхронизм созревания ядра и цитоплазмы, вакуолизация цитоплазмы, PAS-положительная реакция в эритрокариocyтах в гранулярной форме, кольцевые сидеробласты. Периферическая кровь: анизоцитоз, пойкилоцитоз, NRBC
Дисгранулоцитопоэз	Изменения ядер нейтрофилов: большие размеры клеток, гиперсегментация, псевдопельгеризация ядра, кольцевидные ядра, агранулярность или гипогранулярность в цитоплазме, тельца Деле, псевдогранулы Шедьяка–Хигаси
Дисмегакариоцитопоэз	Микромегакариоциты, круглоядерные (гиполобулярные) мегакариоциты любого размера, многоядерные формы

Характерные диспластические изменения обнаруживают и в гистологических препаратах, в которых отмечаются нарушение костномозговой топографии клеток миелопоэза; патологическая локализация незрелых миелоидных клеток; гемофагоцитоз, плазмоцитоз и лимфоцитоз в костном мозге, фиброз, макрофаги с гемосидерином. Поиск групп и скоплений атипично расположенных миелоидных клеток-предшественников — важная задача исследования трепанобиоптата при подозрении на МДС.

Следует отметить, что диспластические изменения клеток миелоидного ростка встречаются у здоровых лиц при токсическом лекарственном воздействии (цитостатики, колониестимулирующие факторы, иммунодепрессанты), инфекциях (ВИЧ, парвовирус В<sub>19</sub>, ВЭБ), нарушениях питания (дефицит витамина В<sub>12</sub>, фолиевой кислоты), злоупотреблении алкоголем, ПНГ, аутоиммунных заболеваниях, восстановлении гемопоэза после химиотерапии и трансплантации костного мозга и органов. В связи с этим диагноз МДС — это диагноз исключения, требующий тщательной дифференциальной диагностики со многими заболеваниями, которые сопровождаются цитопеническим синдромом и морфологической дисплазией гемопоэтических клеток. Клиническое течение заболевания определяется наличием цитопенического синдрома и связанными с ним геморрагическими и инфекционными осложнениями. Трансформация в ОМЛ регистрируется у 30% больных МДС.

В классификации ВОЗ 2022 г. МДС разделены на две подгруппы: МДС с определяемыми генетическими аномалиями и МДС, морфологически определяемые. Диагностические критерии МДС представлены в **табл. 4.21**.

**Таблица 4.21.** Классификация Всемирной организации здравоохранения (2022) миелодиспластических новообразований

МДС	Бласты	Цитогенетические аномалии	Мутации
-----	--------	---------------------------	---------

МДС с определяемыми генетическими аномалиями			
МДС с низким числом бластов и изолированной делецией 5q (MDS-5q)	<5% в КМ и <2% в ПК	Одиночная делеция 5q или в сочетании с одной другой аномалией, отличной от моносомии 7 или делеции 7q	—
МДС с низким числом бластов и мутацией SF3B1* (MDS-SF3B1)		Отсутствие 5q делеции, моносомии 7 или комплексный кариотип	SF3B1
МДС с биаллельной инактивацией TP53 (MDS-biTP53)	<20% в КМ и ПК	Обычно комплексный	Две и более мутаций TP53 или одна мутация с доказательством потери числа копий TP53
МДС, морфологически определяемые			
МДС с низким числом бластов (MDS-LB)*	<5% в КМ и <2% в ПК	—	—
МДС, гипопластический** (MDS-h)		—	—
МДС с избытком бластов	—	—	—
МДС с избытком бластов 1	5–9% в КМ или 2–4% в ПК	—	—
МДС с избытком бластов 2	10–19% в КМ, или 5–19% в ПК, или палочки Ауэра	—	—
МДС с фиброзом (MDS-f)	5–19% в КМ; 2–19 в ПК	—	—

## Глава 4. Лабораторная гематология

\* Обнаружение  $\geq 15\%$  кольцевых сидеробластов может заменить мутацию SF3B1. Приемлемая терминология: МДС с низким количеством бластов и кольцевых сидеробластов.

\*\* По определению клеточность костного мозга составляет  $\leq 25\%$  с поправкой на возраст.

Для подсчета кроветворных клеток и выявления степени дисплазии необходимо оценить 200 лейкоцитов в окрашенном мазке периферической крови, в костном мозге — не менее 500 ядросодержащих клеток.

*Сидеробласты* — это эритрокарициты, содержащие гранулы негемоглобинового железа в цитоплазме.

В соответствии с рекомендациями рабочей группы экспертов ВОЗ 2008 г. выделяют сидеробласты I–III типа.

*I тип* — <5 гранул в цитоплазме; *II тип* — >5 гранул, расположенных не вокруг ядра, и *III тип (кольцевые сидеробласты)* — >5 гранул, расположенных перинуклеарно и занимающих  $\geq 1/3$  окружности ядра. В норме в КМ содержится 23–25% сидеробластов I и II типа, кольцевые сидеробласты не определяются. Выявление кольцевых сидеробластов независимо от этиологии заболевания отражает неэффективный эритропоэз и наличие избытка железа в митохондриях. Цитохимическое исследование на сидеробласты необходимо выполнять всем пациентам при подозрении на МДС без избытка бластных клеток вне зависимости от числа эритрокарицитов КМ. Исключением являются низкая клеточность КМ и сужение эритроидного ростка менее 10%, что может привести к отсутствию возможности подсчитать 100 эритрокарицитов.

Морфологическое исследование КМ обязательно должно дополняться молекулярно-генетическими методами, включающими хромосомный анализ [кариотипирование, флюоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence in situ hybridization — FISH) и т.д.], анализ мутаций (профилирование мутаций с помощью NGS) и иммунофенотипирование.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.8. Миелопролиферативные новообразования

*Миелопролиферативные новообразования* — клональные опухоли кроветворной ткани, развивающиеся из стволовой кроветворной клетки, характеризующиеся аномальной пролиферацией в костном мозге одного или более ростков миелоидной линии (гранулоцитарного, эритроидного, мегакариоцитарного). Пролiferация клеток сопровождается относительно нормальным созреванием (эффективным гемопоэзом), что приводит к повышению числа гранулоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в периферической крови. Наиболее часто поражаются печень и селезенка, где отмечаются экстрамедуллярные очаги кроветворения, лейкозная инфильтрация и разрушение опухолевых клеток. Нередко развивается миелофиброз.

Последний пересмотр вариантов миелопролиферативных новообразований в соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. приводится в табл. 4.22.

**Таблица 4.22.** Миелопролиферативные новообразования (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

• Хронический миелолейкоз.
----------------------------

- Истинная полицитемия.
- Эссенциальная тромбоцитемия.
- Первичный миелофиброз.
- Хронический нейтрофильный лейкоз.
- Хронический эозинофильный лейкоз.
- Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз.
- Миелопролиферативные опухоли, неклассифицируемые

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.8.1. Хронический миелолейкоз

ХМЛ обусловлен опухолевой трансформацией плюрипотентной стволовой гемопоэтической клетки, характеризуется усилением пролиферации гранулоцитарного ростка без потери способности к дифференцировке, гиперплазией миелоидной ткани, миелоидной метаплазией кроветворных органов, ассоциированной с хромосомной аномалией — транслокацией  $t(9;22)(q34;q11)$ , так называемой филадельфийской хромосомы (Ph-хромосомы), в результате которой образуется химерный ген  $BCR::ABL1$ . Продукт гена  $BCR::ABL1$  представляет собой тирозинкиназу с аномально повышенной активностью, регулирующую сигналы, ответственные за клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз. В зависимости от локализации точки разрыва могут выявляться более 10 разных вариантов химерного транскрипта  $BCR::ABL1$  с различной молекулярной массой. Наиболее распространенными являются химерные транскрипты, образующиеся при слиянии 13-го или 14-го экзона гена  $BCR$  со 2-м экзоном гена  $ABL1$ . В первом случае образуется химерный транскрипт e13a2 (ранее известный как b2a2), во втором — e14a2 (b3a2). Суммарно на варианты e13a2 и e14a2 приходится более 98% случаев ХМЛ. Оба они приводят к образованию химерного белка с молекулярной массой 210 кДа, обозначаемого как p210. Остальные варианты транскриптов  $BCR::ABL1$  у пациентов с ХМЛ носят название «атипичные». Диагноз ХМЛ может быть окончательно установлен только при выявлении специфической генетической аномалии: транслокации  $t(9;22)(q34;q11)$  методом стандартного цитогенетического исследования и/или химерного гена  $BCR::ABL1$  методами ПЦР или FISH.

По мере нарастания объема опухолевой массы проявляется клиническая симптоматика, связанная с гиперплазией миелоидной ткани; в дальнейшем по мере развития генетической нестабильности возникают новые субклоны, развивается прогрессирование заболевания до фазы бластной трансформации. Аномальная хромосома обнаруживается во всех клетках миелопоэза, а также Т- и В-лимфоцитах, поэтому все потомство — гранулоциты, моноциты, лимфоциты эритрокарициты, мегакарициты — принадлежит к опухолевому клону.

ХМЛ составляет 15–20% случаев миелопролиферативных неоплазий, встречается в любом возрасте, чаще у лиц среднего и пожилого возраста. Большинство случаев заболевания диагностируется в *хронической фазе*. Клиническая картина при ХМЛ может характеризоваться бессимптомным течением, нередко признаки заболевания на момент установления диагноза представлены только изменениями в общем анализе крови. Наиболее частые симптомы — слабость, потеря массы тела, ночные поты, спленомегалия, анемия. Пролiferация опухолевых клеток чаще ограничивается гемопоэтическими органами (костный мозг, селезенка, печень, кровь).

До появления ингибиторов тирозинкиназы для ХМЛ была характерна многоступенчатая эволюция, проявлявшаяся в фазовом течении заболевания, в котором выделяли три фазы: *хроническую, прогрессирующую, или фазу акселерации, и терминальную фазу, или бластный криз*.

**Хроническая фаза ХМЛ.** В *периферической крови* наблюдается нейтрофильный лейкоцитоз (количество лейкоцитов варьирует) со сдвигом до миелоцитов, бластные клетки составляют 1–10%. Частым симптомом является увеличение абсолютного числа базофилов и/или эозинофилов. Абсолютный моноцитоз также может встречаться, особенно при обнаружении транскрипта p190  $BCR::ABL1$ , что требует дифференциальной диагностики с хроническим миеломоноцитарным лейкозом. Количество тромбоцитов в крови нормальное или повышенное (может быть и более  $1000 \times 10^9/\text{л}$ ). Тромботические осложнения возможны при гипертромбоцитозе, геморрагический синдром развивается при тромбоцитопении или гипертромбоцитозе. В редких случаях встречается гипертромбоцитоз без лейкоцитоза, что требует дифференциации с эссенциальной тромбоцитемией. В большинстве случаев отмечается незначительная анемия. Костный мозг гиперклеточный (более  $350 \times 10^9/\text{л}$ ) за счет повышенного содержания клеток гранулоцитарного ростка. Число эритрокарицитов и мегакарицитов варьирует. Чаще наблюдается редукция эритропоэза. В 30% наблюдений ХМЛ в костном мозге могут быть обнаружены псевдо-Гоше-подобные клетки и голубые гистиоциты, что рассматривается как ответ на повышенный клеточный распад.

Критериями *хронической фазы высокого риска* являются гематологические, морфологические и цитогенетические параметры, совокупность которых подтверждает эволюцию опухоли, сопровождающуюся резистентностью к терапии ингибиторами тирозинкиназы (**табл. 4.23**).

**Костный мозг** гиперклеточный. Отмечается увеличение числа базофилов, базофильных миелоцитов, бластных клеток. В клетках всех трех ростков миелопоэза могут быть признаки морфологической дисплазии.

**Бластный криз** характеризуется нарастанием количества бластных клеток в костном мозге и крови (более 20%). Для идентификации линейности бластных клеток используют цитохимические исследования и иммунофенотипирование. Диагностические критерии бластного криза ХМЛ представлены в **табл. 4.24**.

**Таблица 4.23.** Диагностические критерии хронической фазы высокого риска хронического миелолейкоза (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

- Бласты в крови и/или костном мозге — 10–19% ядерных клеток; присутствие лимфобластов даже <10% является свидетельством приближающегося бластного криза и требует дальнейшего цитогенетического исследования.
- Базофилы в крови  $\geq 20\%$ .

- Дополнительные хромосомные аномалии в Ph<sup>+</sup>-клетках, включая реаранжировку 3q26.2, моносомию 7, изохромосому 17q и комплексный кариотип.
- Скопления аномальных мегакариоцитов с мелкими ядрами сходных с таковыми при МДС, с которыми связывают развитие ретикулинового или коллагенового фиброза

Глава 4. Лабораторная гематология

Таблица 4.24. Диагностические критерии бластного криза хронического миелолейкоза (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

- Бласты в периферической крови или в костном мозге — >20% ядерных клеток.
- Экстрамедуллярные очаги кроветворения с пролиферацией бластных клеток.
- В трепанобиоптате костного мозга — крупные очаги или скопления бластных клеток.
- Повышен процент лимфобластов в периферической крови или костном мозге (даже при менее 10%)

Благодаря терапии тирозинкиназой частота прогрессирования и развития бластного криза при ХМЛ снизилась. На сегодняшний день 10-летняя общая выживаемость составляет 80–90%. Для оценки эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназы проводится регулярный мониторинг остаточной опухолевой популяции с использованием цитогенетических и молекулярно-генетических методов (FISH, ПЦР).

Глава 4. Лабораторная гематология

4.8.2. Ph-негативные миелопролиферативные новообразования

Первичный миелофиброз

Первичный миелофиброз характеризуется клональной пролиферацией стволовых клеток, аномальной экспрессией цитокинов, фиброзом костного мозга, гепатоспленомегалией как следствием экстрамедуллярного гемопоэза, симптомами опухолевой интоксикации, кахексией, лейкемической прогрессией (табл. 4.25). Заболевание встречается чаще в пожилом возрасте. Преобладает доброкачественное течение болезни с медленным увеличением селезенки. Первичный миелофиброз проходит те же стадии, что и ХМЛ.

Таблица 4.25. Диагностические критерии первичного миелофиброза (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

Основные критерии
1. Пролиферация и атипия мегакариоцитов, сочетающаяся с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом КМ. 2. Наличие мутаций JAK2, MPL, CALR или других клональных маркеров (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/2, SRSF2, SF2B1) или отсутствие реактивного фиброза. 3. Отсутствие критериев ИП, эссенциальной тромбоцитемии, BCR::ABL1+ХМЛ, МДС или других миелопролиферативных новообразований
Дополнительные критерии
• Анемия, не вызванная сопутствующим заболеванием. • Лейкоцитоз более 11,0×10 <sup>9</sup> /л. • Спленомегалия. • Повышение активности ЛДГ. • Лейкоэритробластоз

В клиническом течении первичного миелофиброза выделяют две фазы бластной трансформации, отражающие степень прогрессирования заболевания: хроническую и терминальную. Хроническая фаза диагностируется в большинстве (более 90%) случаев. Наиболее характерными признаками являются изменения ОАК (лейкоэритробластоз, сдвиг влево в лейкоцитарной формуле, признаки дисплазии в нейтрофилах). У большинства пациентов имеется нормохромная анемия. В мазках крови — анизопойкилоцитоз с преобладанием каплевидных эритроцитов (дакриоциты), NRBC, невысокий ретикулоцитоз, атипичные крупные тромбоциты. Костный мозг гиперклеточный с повышенным содержанием клеток гранулоцитарного ряда, возможно увеличение эозинофильных миелоцитов и эозинофилов, количество бластных клеток не увеличено. Содержание эритрокариоцитов чаще снижено, может быть в пределах нормы. Количество мегакариоцитов значительно повышено как в цитологических, так и в гистологических препаратах с нарушением топографического их расположения. Отмечаются атипичные формы мегакариоцитов с аномалиями дольчатости ядер. Степень выраженности фиброза в гистологических препаратах варьирует. Диагностическим критерием бластной фазы является присутствие в периферической крови или в КМ ≥20% бластных клеток. Лейкемическая трансформация наблюдается у 20–25% пациентов.

Истинная полицитемия

ИП — клональное миелопролиферативное новообразование, которое характеризуется пролиферацией эритроидного, гранулоцитарного, мегакариоцитарного ростков миелопоэза с преимущественной пролиферацией эритроидного ростка, увеличением числа эритроцитов и повышением уровня Hb, тромбоцитозом, лейкоцитозом в периферической крови (панцитоз), независимостью эритропоэза от нормальных механизмов регуляции. Основой патогенеза ИП является опухолевая трансформация клетки-предшественницы миелопоэза; доказана связь с мутацией в тирозинкиназе JAK2 (JAK2V617F), ген которой расположен на хромосоме 9. Мутация приводит к усилению функции тирозинкиназы за счет связывания внутриклеточного и поверхностного домена эритропоэтинового рецептора, что сопровождается внутриклеточной аутоэкспрессией сигнала независимо от внешней

стимуляции ЭПО и пролиферации эритроидных предшественников. Кроме того, дополнительно активируются такие киназы, как STAT5, ERK/MAP, PI3K/AKT, что способствует значительному усилению проведения сигнала от ЭПО, а также выраженной экспрессии рецепторов к ЭПО. В итоге результатом избыточной пролиферации клеток-предшественниц миелопоэза является появление эритроцитоза и тромбоцитоза.

Заболевание встречается преимущественно у лиц пожилого возраста, характеризуется относительно доброкачественным течением и большей выживаемостью в отличие от других миелопролиферативных новообразований. Для ИП характерно наличие двух основных синдромов. *Плеторический синдром* (от слова «плетора» — полнокровие) характеризуется увеличением массы циркулирующих эритроцитов, что приводит к появлению жалоб на головокружение, головные боли, ухудшение зрения, кожный зуд, приступы стенокардии. *Миелопролиферативный синдром* обусловлен гиперплазией трех ростков кроветворения, проявляется кожным зудом, потливостью, слабостью, повышенной температурой тела, болью в костях.

*Костный мозг* — клеточный с нормобластическим типом кроветворения, при развитии панмиелоза — гиперклеточный с повышенным содержанием клеток эритро- и мегакариоцитопоэза. При гистологическом исследовании КМ обнаруживается увеличение количества мегакариоцитов, часто гигантских, с расширенными дольчатыми ядрами, располагающихся скоплениями. Наблюдаются также гиперплазия эритроидного ростка, увеличение числа эозинофилов и базофилов. Признаки дисгемопоэза отсутствуют. В *периферической крови* эритроциты имеют нормальную морфологию, в случае развития дефицита железа, вследствие кровопотерь появляются гипохромия и микроцитоз. Наиболее часто в лейкограмме встречаются нейтрофилез и базофилия, реже — незрелые гранулоциты. Тромбоцитоз имеет место у 50% больных. Характерно также снижение СОЭ (до 0–1 мм/ч) и увеличение вязкости крови.

Глава 4. Лабораторная гематология

На поздних стадиях развития заболевания снижается продукция эритроцитов, нарастает спленомегалия. ИП может завершиться развитием бластного криза, постполицитемическим миелофиброзом (около 20% случаев). Лейкемическая трансформация встречается в 2–14% наблюдений в течение 10 лет и 5–19% в течение 15 лет от момента установления диагноза.

Диагноз ИП устанавливается после исключения всех возможных причин развития вторичного эритроцитоза, основывается на клинических и лабораторных данных, гистологическом исследовании костного мозга (табл. 4.26).

Таблица 4.26. Диагностические критерии истинной полицитемии (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

Основные критерии
1. Hb >165 г/л для мужчин и >160 г/л для женщин или HCT >49% (мужчины), >48% (женщины).
2. В биоптате костного мозга отмечается гиперклеточность с пролиферацией клеток всех трех ростков (панмиелоз) с полиморфными, зрелыми мегакариоцитами (МГКЦ) отличающимися размерами*.
3. Мутация V617F гена JAK2 или в экзоне 12
Минорный критерий: уровень ЭПО в сыворотке крови на субнормальном уровне

\* Критерий 2 может не требоваться в случаях: Hb >185 г/л (мужчины) и >165 г/л (женщины); HCT >55% (мужчины) и >49% (женщины) при наличии 3-го главного и минорного критерия.

Диагноз ИП подтверждается при наличии двух основных и одного минорного критерия или всех трех основных. Выявление мутации JAK2V617F позволяет установить диагноз у 95–98% пациентов ИП. Определение ЭПО в крови является дополнительным исследованием при подозрении на ИП (в 85% наблюдений уровень ЭПО ниже нормы). Субнормальный уровень ЭПО при отсутствии мутации JAK2V617F является основанием для исследования мутации гена JAK2 в 12-м экзоне. Следует отметить, что диагноз ИП возможен при уровне Hb и HCT ниже диагностического порога. Это наблюдается у молодых пациентов при наличии дефицита железа (нормальный или даже сниженный Hb при высоком уровне эритроцитов) и/или после острых кровотечений (снижение уровня Hb, эритроцитов и HCT).

Эссенциальная тромбоцитемия

Эссенциальная тромбоцитемия — клональное миелопролиферативное заболевание с неконтролируемой пролиферацией мегакариоцитов, характеризующееся повышенным числом крупных и гигантских мегакариоцитов в костном мозге, постоянным тромбоцитозом в периферической крови (>450×10<sup>9</sup>/л) и клиническими эпизодами тромбозов и/или кровотечений. Эссенциальная тромбоцитемия — редкое заболевание (1,5–2,5 на 100 000 населения). Заболевание встречается чаще у лиц пожилого возраста, реже — у лиц моложе 60 лет и у детей. Ведущими гематологическими симптомами являются гипертромбоцитоз и гиперплазия мегакариоцитов в КМ. Клиническая картина характеризуется небольшой спленомегалией, которая прогрессирует по мере развития болезни, реже — гепатомегалией, медленно нарастающей анемией. Характерны расстройства микроциркуляции (эритромелалгии, кожный зуд, головокружения, парестезии, нарушение мозгового кровообращения, стенокардия), тромбозы артериальных и венозных сосудов. Геморрагические осложнения встречаются у больных с гипертромбоцитозом более 1500×10<sup>9</sup>/л. Диагностические критерии эссенциальной тромбоцитемии представлены в табл. 4.27.

Таблица 4.27. Диагностические критерии эссенциальной тромбоцитемии (Всемирная организация здравоохранения, 2022)

Основные критерии
1. Тромбоцитоз >450×10 <sup>9</sup> /л.
2. В биоптате костного мозга пролиферация преимущественно клеток мегакариоцитарного ростка с повышенным числом крупных, зрелых мегакариоцитов с гиперлобулярными ядрами. Не отмечается значительного увеличения или

- левого сдвига в гранулоцитопозе или эритропозе, признаки фиброза минимальные (1-я степень в гистологических препаратах).
3. Отсутствие критериев ВОЗ для BCR::ABL1-позитивного ХМЛ, МДС, эритремии или других миелоидных опухолей.
4. Наличие мутаций в генах *JAK2*, *CALR* или *MPL*

**Минорный критерий: наличие других клональных маркеров или отсутствие причин развития реактивного тромбоцитоза**

Диагноз «эссенциальная тромбоцитемия» устанавливается при наличии всех четырех основных критериев или первых трех основных и минорного критерия.

В периферической крови наблюдаются гипертромбоцитоз ( $500\text{--}1500\times 10^9/\text{л}$ ), фрагменты ядер мегакариоцитов, умеренно выраженная анемия и лейкоцитоз с левым сдвигом в лейкоцитарной формуле, могут наблюдаться базофилия и эозинофилия. Морфология тромбоцитов характеризуется анизоцитозом, увеличением MPV и показателя анизоцитоза тромбоцитов (PDW), появлением гигантских и уродливых форм с псевдоподиями, гипогранулярных тромбоцитов.

*Костный мозг* — нормо- или гиперклеточный, с трехростковой гиперплазией, сокращением жировой ткани. Отмечается значительная гиперплазия мегакариоцитарного ростка. Мегакариоциты располагаются в препаратах КМ разрозненно и скоплениями. Характерна морфологическая гетерогенность клеток мегакариоцитарного ростка — гигантские мегакариоциты с многолопастными множественными ядрами без признаков атипии, возможны микроформы мегакариоцитов. Прогрессирование заболевания сопровождается фиброзом КМ.

Заболевание характеризуется медленным течением, средняя продолжительность жизни больных составляет 10–15 лет. Исходом заболевания является трансформация в ОМЛ или МДС.

Глава 4. Лабораторная гематология

4.9. Лимфопролиферативные заболевания

В основе классификации заболеваний гемопоэтической и лимфоидной ткани ВОЗ (2022 г.) лежит интеграция разных методов диагностики. Диагностика лимфопролиферативных новообразований включает выявление морфологического субстрата опухоли с использованием разных морфологических методов; определение иммунологического фенотипа опухолевых клеток с помощью ИГХ и проточной цитометрии, установление степени распространенности опухоли или стадии заболевания, выявление молекулярно-генетических изменений с использованием стандартного цитогенетического исследования, FISH-, ПЦР-исследований и NGS.

В соответствии с критериями, предложенными ВОЗ, при верификации диагноза обязательным является установление линейной принадлежности опухолевых лимфоидных клеток (Т, В или НК) и степени их дифференцировки (предшественники или зрелые клетки) и молекулярно-генетических особенностей. Этот же принцип сохранен и в 5-м пересмотре классификации ВОЗ гематолимфоидных опухолей (2022 г.). В последнем издании классификации появились новые разделы («*Лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией*», «*ВЭБ-позитивные Т- и НК-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы у детей*»), дополнены разделы В- и Т-клеточных неоплазий, ассоциированных с вирусными инфекциями, введен «пограничный» термин «лимфоидные пролиферации/лимфопролиферативные заболевания» с точки зрения осторожной клинической оценки и терапевтического подхода, несмотря на доказательство В- и/или Т-клеточной клональности (табл. 4.28).

**Таблица 4.28.** Классификация лимфоидных новообразований из зрелых В-, Т-, НК-клеток (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)

<p><b>Опухолоподобные поражения с В-клеточным преобладанием.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Реактивная, богатая В-лимфоцитами лимфоидная пролиферация, мимикрирующая под лимфому.</li><li>• IgG4-связанное заболевание.</li><li>• Уницентрический вариант болезни Кастлемана.</li><li>• Идиопатический мультицентрический вариант болезни Кастлемана.</li><li>• KSHV/HHV8 мультицентрический вариант болезни Кастлемана.</li></ul> <p><b>В-клеточные новообразования из зрелых клеток.</b></p> <p><b>Предопухолевые и опухолевые новообразования из малых лимфоцитов.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• MBKL.</li><li>• ХЛЛ/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома).</li></ul> <p><b>В-клеточные лимфомы и лейкозы селезенки.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• ВКЛ.</li><li>• Лимфома маргинальной зоны селезенки.</li><li>• Диффузная В-клеточная лимфома из малых лимфоцитов красной пульпы селезенки.</li><li>• В-клеточная лимфома / лейкоз селезенки с выраженными нуклеолами.</li></ul>	<p><b>Опухолоподобные поражения с Т-клеточным преобладанием.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Болезнь Кикучи–Фуджимото.</li><li>• Индолентная Т-лимфобластная пролиферация.</li><li>• Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром.</li></ul> <p><b>Т- и НК-клеточные новообразования из зрелых клеток.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ).</li><li>• Т-ЛБГЛ.</li><li>• Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых.</li><li>• Синдром Сезари.</li><li>• Агрессивный НК-клеточный лейкоз.</li></ul> <p><b>Первичные кожные Т-клеточные лимфомы.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Первичная кожная CD4-позитивная</li><li>• Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание из мелких и среднего размера клеток.</li><li>• Первичная кожная акральная.</li></ul> <p><b>CD8-позитивное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Грибовидный микоз.</li><li>• Первичные кожные CD30-позитивные Т-лимфопролиферативные заболевания: первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома.</li></ul>
---	---

<p><b>Лимфоплазмочитарная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Экстранодальная лимфома маргинальной зоны, ассоциированная с лимфоидной тканью (MALT-лимфома).</li> <li>• Первичная кожная.</li> <li>• Нодальная лимфома маргинальной зоны.</li> <li>• Педиатрический тип лимфомы маргинальной зоны.</li> </ul> <p><b>Фолликулярная лимфома (ФЛ).</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Фолликулярная опухоль <i>in situ</i>.</li> <li>• ФЛ.</li> <li>• Педиатрический тип ФЛ.</li> <li>• ФЛ, дуоденальный тип.</li> </ul> <p><b>Кожная лимфома из клеток фолликулярного центра.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Первичная кожная лимфома из клеток фолликулярного центра.</li> </ul> <p><b>Мантийноклеточная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лимфома мантийноклеточная <i>in situ</i>.</li> <li>• Мантийноклеточная лимфома.</li> <li>• Лейкемическая экстранодальная мантийноклеточная лимфома.</li> </ul> <p><b>Трансформации индолентных В-клеточных лимфом.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Трансформации индолентных В-клеточных лимфом.</li> </ul> <p><b>Крупноклеточная В-клеточная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, NOS.</li> <li>• Крупноклеточная В-клеточная лимфома, богатая Т-клетками/гистиоцитами.</li> <li>• Диффузная В-крупноклеточная лимфома/В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройкой генов <i>MYC</i> и <i>BCL2</i>.</li> <li>• АЛК-позитивная (позитивная на киназу анапластической лимфомы) анапластическая В-крупноклеточная лимфома.</li> <li>• Крупноклеточная В-клеточная лимфома с реаранжировкой <i>IRF-4</i>.</li> <li>• В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с абберацией <i>11q</i>.</li> <li>• Лимфоматоидный гранулематоз.</li> <li>• ВЭБ-позитивная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома.</li> <li>• Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, ассоциированная с хроническим воспалением.</li> <li>• Фибрин-ассоциированная крупноклеточная В-клеточная лимфома (новая нозология).</li> <li>• Крупноклеточная В-клеточная лимфома, ассоциированная с перегрузкой жидкостью (новая нозология).</li> <li>• Плазмобластная лимфома.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Т-клеточная панныкулитоподобная лимфома подкожной клетчатки.</li> <li>• Первичная кожная <math>\gamma</math>-<math>\delta</math>-Т-клеточная лимфома.</li> <li>• Первичная кожная CD8-позитивная агрессивная эпидермотропическая лимфома из цитотоксических Т-лимфоцитов.</li> <li>• Первичная кожная периферическая Т-клеточная лимфома, NOS.</li> </ul> <p><b>Т- и НК-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Индолентная Т-клеточная лимфома ЖКТ.</li> <li>• Индолентное НК-клеточное лимфопролиферативное заболевание ЖКТ.</li> <li>• Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией.</li> <li>• Мономорфная эпителиотропная Т-клеточная лимфома кишечника.</li> <li>• Т-клеточная лимфома кишечника, NOS.</li> </ul> <p><b>Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома.</li> </ul> <p><b>Анапластическая крупноклеточная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Анапластическая крупноклеточная лимфома, АЛК-позитивная.</li> <li>• Анапластическая крупноклеточная лимфома, АЛК-негативная.</li> <li>• Анапластическая крупноклеточная лимфома, ассоциированная с имплантатами МЖ.</li> </ul> <p><b>Нодальная Т-клеточная лимфома из фолликулярных Т-хелперов (Th) (TFH).</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нодальная TFH-клеточная лимфома, ангиоиммунобластный тип.</li> <li>• Нодальная TFH-клеточная лимфома, фолликулярный тип.</li> <li>• Нодальная TFH-клеточная лимфома, NOS.</li> </ul> <p><b>Другие периферические Т-клеточные лимфомы.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Периферическая Т-клеточная лимфома, не охарактеризованная иным способом.</li> </ul> <p><b>ВЭБ-позитивная НК-/Т-клеточная лимфома.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ВЭБ-позитивная нодальная Т- и НК-клеточная лимфома.</li> <li>• Экстранодальная НК-/Т-клеточная лимфома.</li> </ul> <p><b>ВЭБ-позитивные Т- и НК-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы у детей.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Тяжелая аллергическая реакция на укус комара.</li> <li>• Оспоподобное лимфопролиферативное заболевание.</li> <li>• Системное хроническое активное ВЭБ-заболевание.</li> <li>• Системная ВЭБ-позитивная Т-клеточная лимфома у детей</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Первичная В-крупноклеточная лимфома иммунопривилегированных органов.</li> <li>• Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома ЦНС.</li> <li>• Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома яичка.</li> <li>• Первичная кожная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, leg-тип.</li> <li>• ВЭБ-позитивная диффузная В-крупноклеточная лимфома.</li> <li>• Внутрисосудистая крупноклеточная В-клеточная лимфома.</li> <li>• Первичная медиастиальная крупноклеточная В-клеточная лимфома.</li> <li>• Медиастиальная лимфома серой зоны.</li> <li>• В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, NOS.</li> </ul> <p><b>Лимфома Беркитта.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лимфома Беркитта (рекомендации выделять ВЭБ-позитивные и ВЭБ-негативные случаи).</li> </ul>	



**KSHV/HHV8-ассоциированные В-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы.**

- Первичная лимфома серозных полостей.
- KSHV/HHV8-позитивная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома.

- KSHV/HHV8-позитивное герминотропное лимфопролиферативное заболевание.

**Лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией.**

- Гиперплазии, возникающие из иммунодефицита/дисрегуляции.
- Полиморфные лимфопролиферативные заболевания, возникающие на фоне иммунодефицита/дисрегуляции.
- ВЭБ-позитивная язва слизистых оболочек/кожи.
- Лимфомы, возникающие из иммунодефицита/дисрегуляции.
- Врожденные нарушения, связанные с иммуноассоциированными лимфоидными пролиферациями и лимфомами.

**Лимфома Ходжкина.**

- Классическая лимфома Ходжкина.
- Нодулярное лимфоцитарное преобладание лимфомы Ходжкина.

**Плазмоклеточные новообразования и другие заболевания с парапротеинами.****Моноклональные гаммапатии.**

- Болезнь холодовых агглютининов.
- IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения.
- Не-IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения.

- Моноклональная гаммапатия ренального значения.

**Болезни с отложением моноклональных Ig.**

- Ig-ассоциированный (AL) амилоидоз.
- Болезнь накопления моноклональных Ig.

**Болезни тяжелых цепей.**

- Болезнь тяжелых цепей  $\mu$ .
- Болезнь тяжелых цепей  $\gamma$ .
- Болезнь тяжелых цепей  $\alpha$ .

**Плазмоклеточные новообразования.**

- Плазмоцитома.
- Плазмоклеточная миелома.
- Плазмоклеточные новообразования, ассоциированные с паранеопластическими синдромами:
- POEMS-синдром;
- TEMPI-синдром;
- AESOP-синдром

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.9.1. В-клеточные новообразования из зрелых (периферических) клеток

**Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (МВКЛ)** является стадией ХЛЛ. Частота выявления МВКЛ увеличивается с возрастом (у лиц старше 70 лет составляет 10%), обнаруживается в 10 раз чаще у родственников больных ХЛЛ. Частота МВКЛ в семейных случаях ХЛЛ возрастает и составляет до 14%. Наблюдения за носителями МВКЛ показали, что прогрессия в В-ХЛЛ происходит в 10% случаев. Диагностика МВКЛ основана на выявлении в крови  $<5000/\text{мкл}$  клональных В-лимфоцитов при отсутствии увеличенных лимфатических узлов (ЛУ), селезенки, цитопений. В классификации ВОЗ 2022 г. выделено три типа МВКЛ: *с низким количеством клональных В-лимфоцитов*; *ХЛЛ/ЛЛ-тип*; *не-ХЛЛ/ЛЛ-тип*. Иммунофенотипические характеристики клеток МВКЛ сходны с вариантом ХЛЛ с соматическими мутациями генов вариабельных регионов ИГ, то есть с прогностически благоприятным вариантом (CD19+CD5+CD23+CD38–, слабая экспрессия CD20, CD79a, CD22, sIg).

**ХЛЛ / лимфоцитарная лимфома** составляет около 30% лейкозов у взрослых, медиана возраста на момент установления диагноза в европейских странах составляет около 70 лет, при этом менее 10% заболевших моложе 40 лет. В России ХЛЛ выявляется реже, медиана возраста на момент установления диагноза — 62 года. ХЛЛ по сравнению с другими лейкозами имеет самую высокую генетическую предрасположенность. Частота развития ХЛЛ у родственников больных в 3 раза, а злокачественных лимфом — в 10 раз выше по сравнению с общей популяцией.

ХЛЛ — опухоль, возникающая из В-лимфоцитов антигензависимых стадий дифференцировки, характеризуется накоплением в кровотоковой, лимфатической и других тканях опухолевых клеток с уникальным иммунофенотипом. В соответствии с рекомендациями ВОЗ 2022 г. обязательными диагностическими критериями являются:

- классическая морфология клеток ХЛЛ;
- абсолютный В-клеточный лимфоцитоз —  $>5000$  в 1 мкл крови;
- иммунологический фенотип по результатам проточной цитометрии крови и/или костного мозга: CD19, CD5, CD20, CD23 (вариабельный), слабая экспрессия моноклональных легких цепей;
- гистологические/иммуногистохимические данные, демонстрирующие слабую экспрессию CD20, CD5, CD23 (вариабельная), отсутствие экспрессии циклина D1.

При необходимости рекомендуется использовать дополнительные маркеры: CD200, ROR1, CD43 — позитивные на клетках ХЛЛ, в комбинации с CD10, CD81 — не экспрессирующихся при ХЛЛ, и CD79b — слабая экспрессия. При ИГХ КМ или ЛУ рекомендуется использовать дополнительные маркеры на пролиферативные центры CD23, LEF1, CD43, MUM1 (положительная экспрессия) и CD10, SOX11 (отсутствие экспрессии).

*Картина крови* при ХЛЛ в зависимости от стадии заболевания обычно представлена нормальным или незначительно повышенным количеством лейкоцитов. Как правило, анемия и тромбоцитопения отсутствуют. Основным гематологическим показателем при ХЛЛ является абсолютный лимфоцитоз. В лейкоцитарной формуле морфологически зрелые лимфоциты варьируют от 45 до 95%, встречаются единичные пролимфоциты, имеет место относительная или абсолютная нейтропения. Встречаются клетки цитолита. По мере прогрессирования опухолевого процесса нарастают лейкоцитоз, относительный и абсолютный лимфоцитоз, нейтропения, наблюдается нормохромная анемия и/или тромбоцитопения. При ХЛЛ может наблюдаться АИГА, реже — тромбоцитопения за счет образования аутоантител к эритроцитам или эритрокариотам костного мозга, тромбоцитам. В зависимости от стадии заболевания костный мозг может быть нормо- или гиперклеточным, морфология клеток аналогична таковой периферической крови.

Наиболее важными маркерами прогноза В-ХЛЛ являются мутационный статус генов вариабельных участков иммуноглобулинов (IgVH), цитогенетические aberrации del11q22-q23 (11q-), del17p13 (17p-). По влиянию на прогноз эти маркеры распределяются следующим образом: 1) 17p- — наихудший прогноз; 2) 11q- — вариант без мутаций IgVH — промежуточный прогноз; 3) вариант с мутациями IgVH — наилучший прогноз. Среди биохимических показателей независимыми факторами прогноза являются повышение уровня ЛДГ и  $\beta_2$ -микроглобулина.

Согласно рекомендациям ВОЗ 2022 г., В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз утратил свое значение, при количестве  $>15\%$  пролимфоцитов относится к прогрессии ХЛЛ и имеет неблагоприятный прогноз. Описана трансформация Рихтера (диффузная В-крупноклеточная лимфома) при ХЛЛ. Высокий риск развития вторичных опухолей, в первую очередь рака кожи и кишечника, возможно развитие ОЛЛ, лимфомы Ходжкина и других лимфом. Оценка МОБ при ХЛЛ используется как показатель глубины ответа, на основании которого можно принимать решение о прекращении или, наоборот, интенсификации терапии, проведении поддерживающей терапии. Пороговый уровень менее  $10^{-4}$  считается МОБ-негативным ответом для ХЛЛ.

В последнем пересмотре классификации ВОЗ (2022 г.) выделена группа новообразований, объединенная под названием «**В-клеточные лимфомы и лейкозы селезенки**», в которую входят:

- ВКЛ;
- лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны;
- диффузная В-клеточная лимфома из малых лимфоцитов красной пульпы селезенки;
- В-клеточная лимфома / лейкоз селезенки с выраженными нуклеолами (включает «вариантную форму» ВКЛ и случаи В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза).

## Глава 4. Лабораторная гематология

**ВКЛ** составляет 2% лимфоидных лейкозов, встречается в возрасте от 26 до 75 лет, чаще у мужчин. Начало заболевания незаметное, 20% больных не имеют классических признаков в момент установления диагноза, из диагностических признаков заболевания чаще всего встречаются спленомегалия и панцитопения, реже — гепатомегалия, лимфаденопатия.

*Костный мозг* — нормо- или гиперклеточный с диффузной лимфоидной инфильтрацией, часто отмечается выраженный фиброз, который препятствует получению аспирата костного мозга. В крови регистрируются панцитопения или двухростковая цитопения либо незначительный лейкоцитоз. В лейкограмме — абсолютный лимфоцитоз, нейтропения, моноцитопения. Среди лимфоцитов обнаруживают «волосатые или отростчатые» клетки — от 2 до 90% и более. «Волосатые» клетки характеризуются диффузно-гранулярной реакцией на КФ, не подавляемую тартратом натрия.

*Иммунофенотип*: CD19+SSC<sup>high</sup> (высокое боковое светорассеяние), яркая экспрессия всех В-клеточных антигенов (sIg, CD19, CD20<sup>high</sup>, CD22, CD200)+, CD11c, CD25, CD103, CD305, CD123. Самая высокая плотность CD20 на мембране В-лимфоцитов отмечается при ВКЛ. Достаточно редко экспрессируются CD5 (2% случаев), CD10 (15% случаев), CD23, отсутствует CD27. Для ВКЛ характерна мутация мутации V600E в гене *BRAF*, которая практически не встречается при других вариантах лимфом.

**Лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки.** Составляет около 3% лимфоидных опухолей. Заболевание чаще возникает в возрасте старше 50 лет, имеет медленное (индолентное) течение, 5-летняя выживаемость отмечается

у 80% больных. Аутоиммунные заболевания встречаются в 15% наблюдений. Около 30% случаев ассоциируется с гепатитом С. Ведущими симптомами являются выраженная спленомегалия, поражение КМ и крови без вовлечения периферических ЛУ. При гистологическом исследовании селезенки обнаруживается нодулярная инфильтрация опухолевыми клеточными элементами белой пульпы. У 1/3 больных выявляется моноклональный парапротеин IgM-типа. У 50% больных в периферической крови отмечаются умеренная анемия, тромбоцитопения и лейкоцитоз, редко превышающий  $25 \times 10^9/\text{л}$ . В лейкоцитарной формуле имеют место абсолютный лимфоцитоз и нейтропения, лимфоциты в виде виллезных клеток.

Иммунофенотип: характерна яркая экспрессия IgM, IgD, маркеров В-лимфоцитов — CD19, CD20, CD22, CD79a. В 15% случаев имеет место экспрессия CD5, в 30% наблюдений — CD38, а также CD23. Достаточно часто опухолевые клетки экспрессируют CD11c, CD25, реже CD103, однако, в отличие от ВКЛ, не экспрессируют CD123.

Экспрессия CD27 вариабельная, CD200, в отличие от ХЛЛ, не экспрессируется либо отмечается слабая экспрессия. Пролиферативная активность опухолевых клеток (Ki-67) низкая. *Цитогенетика*: делеция 7q31-32 — единственный биомаркер, который ассоциируется с этим вариантом лимфомы.

**Лимфоплазмочитарная лимфома** — В-клеточное новообразование, состоящее из малых лимфоцитов, плазмочитоидных лимфоцитов и ПК, для которого характерно вовлечение в опухолевый процесс КМ, иногда ЛУ и селезенки. МВ, согласно классификации ВОЗ 2022 г. обозначается как лимфоплазмочитарная лимфома с моноклональным IgM в крови. Выделяют два подтипа: *IgM-лимфоплазмочитарная лимфома/МВ* и *не-IgM-лимфоплазмочитарная лимфома/МВ* (около 5% лимфоплазмочитарных лимфом, чаще IgG- или IgA-). Составляет 1,5% случаев В-клеточных лимфом. Болеют преимущественно мужчины старше 60 лет. Клинические проявления МВ обусловлены пролиферацией лимфоцитов в КМ, печени, селезенке, ЛУ и накоплением в сыворотке крови моноклонального IgM ( $>30 \text{ г/л}$ ). Синдром повышенной вязкости, коагулопатии, холодовая гемагглютинация, криоглобулинемия, невропатии — наиболее частые клинические проявления МВ.

В КМ отмечается пролиферация лимфоцитов, иногда с плазматизированной цитоплазмой (более 10%), увеличение ПК, тучных клеток. У некоторых больных морфологическая картина КМ неотличима от В-ХЛЛ. Гистологическое исследование КМ выявляет диффузную, интерстициальную или паратрабекулярную пролиферацию лимфоцитов, плазмочитов и их переходных форм. В *периферической крови* — анемия, нередко лейкопения с нейтропенией, чаще количество лейкоцитов нормальное, может наблюдаться моноцитоз. По мере прогрессирования развивается тромбоцитопения. СОЭ всегда резко повышена. У пациентов регистрируется гиперпротеинемия, на электрофореграмме — М-градиент класса IgM, в моче — белок Бенс-Джонса (в 80% случаев).

*Иммунофенотип*: опухолевые лимфоциты экспрессируют IgM, В-клеточные антигены (CD19, CD20, CD22, CD79a). Клетки реже экспрессируют CD23, CD5, CD10, CD43(+/-), маркеры плазмочитарной дифференцировки (CD38, CD138). ПК (CD38+CD138+) моноклональные по типу легких цепей (κ или λ), имеют фенотип, сходный с ММ. В 93–97% МВ обнаруживают драйверную мутацию гена MYD88. Возможна трансформация в диффузную В-крупноклеточную лимфому.

**Фолликулярная лимфома (ФЛ)** — опухоль из В-клеток фолликулярного центра с различной пропорцией centroцитов и centroбластов, а также крупных трансформированных клеток. Составляет 30–40% лимфоидных опухолей, средний возраст больных — 60 лет. Возникающая на уровне ранних костномозговых предшественников лимфопоза транслокация t(14;18) приводит к постоянной экспрессии BCL-2. В герминальных центрах ЛУ клетки с гиперэкспрессией BCL-2 получают преимущество к росту, поскольку устойчивы к апоптозу. Эти клетки длительно персистируют, в них накапливаются дополнительные хромосомные aberrации, со временем возникает ФЛ. Субстрат опухоли представлен клетками зародышевого центра — centroцитами и centroбластами. В соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. выделяют четыре типа ФЛ: *классическую ФЛ (цитологический подтип 1-3A)*, *фолликулярную крупноклеточную В-клеточную лимфому (3В-тип)*, *ФЛ с необычными цитологическими признаками (центроцитоподобные клетки или клетки с бластоидной морфологией)*, *ФЛ преимущественно с диффузным ростом*.

## Глава 4. Лабораторная гематология

При ФЛ преимущественно вовлекаются в опухолевый процесс ЛУ, селезенка, кольцо Вальдейера, КМ (в 70% наблюдений). Экстранодальные очаги опухоли могут наблюдаться в ЖКТ, мягких тканях, коже. Опухоль имеет склонность к ранней генерализации, только 1/3 больных выявляется на I–II стадии заболевания. В *костном мозге* при лейкемизации процесса отмечается лимфоидная инфильтрация с вытеснением нормальных ростков кроветворения. В *периферической крови* имеют место лейкоцитоз, анемия и/или тромбоцитопения, абсолютный лимфоцитоз с клетками средних размеров, ядром неправильной формы, с глубокими расщелинами, зазубринами и узкой цитоплазмой. Опухолевые клетки экспрессируют пан-В-клеточные антигены (CD19dim, CD20, CD22, CD79a) в сочетании с IgM, IgD, IgG, ядерный белок BCL-2. В большинстве случаев выявляются экспрессия CD10 и отсутствие CD5, редко CD43. В 85% случаев классической аномалией является t(14;18) (q32;q21), которая приводит к гиперактивации BCL-2 и гиперпродукции онкопротеина BCL-2, мощного ингибитора апоптоза. Прогрессирование ФЛ сопровождается трансформацией в диффузную В-крупноклеточную лимфому и в В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности у 25–35% больных.

**Лимфома из клеток мантии** составляет 3–10% злокачественных лимфом. Выделяют мантийноклеточную неоплазию *in situ*, индолентную ненодальную лейкоэмическую мантийноклеточную лимфому с вовлечением крови, КМ и селезенки, гипермутированный статусом, SOX-11-негативную, с неопухолевым аналогом — В-клеткой памяти и нодальную мантийноклеточную лимфому с неопухолевым аналогом — наивной В-клеткой. Ненодальная лейкоэмическая мантийноклеточная лимфома имеет сходные иммунофенотипические признаки с ХЛЛ — экспрессию CD23, CD200, высокий лейкоцитоз и лимфоцитоз. Нодальная лимфома из клеток мантии SOX-11 — позитивная, характеризуется четырьмя основными морфологическими вариантами: бластоидным (напоминает

лимфобластную лимфому), мелкоклеточным (сходство с ХЛЛ/лимфоцитарной лимфомой), классическим и плеоморфным (напоминает диффузную В-крупноклеточную лимфому с крупными клетками с морфологией иммунобластов, центробластов или анапластический вариант).

*Иммунологический фенотип* крайне вариабельный. Характерна экспрессия пан-В-клеточных антигенов (CD19, CD20, CD79a) в сочетании с CD5, поверхностными IgM, нередко с коэкспрессией IgD. Экспрессия CD43 встречается в 30% случаев, значительно чаще экспрессируется CD38 (в 70%) в отсутствие CD10, CD23 и CD200. Описаны случаи CD5–CD10+ (в 10%), которые часто ассоциировались с бластоидной трансформацией. Экспрессия CD23 встречается в 25%, CD200 — в 3–5% наблюдений. Индекс пролиферации опухолевых клеток Ki-67 <30,0%, как правило, ассоциируется с благоприятным течением заболевания, при бластоидном варианте он может достигать 80–90%. Экспрессия циклина D1 обнаруживается в >95% случаев, SOX11 — в >90% наблюдений и помогает идентифицировать CD5- или циклин D1-негативную лимфому.

Глава 4. Лабораторная гематология

4.9.2. Плазмоклеточные новообразования

*Моноклональные гаммапатии.* В соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. выделяют группу моноклональных гаммапатий, в которую входят: первичная болезнь холодовых агглютининов (*впервые введена*); IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения; не-IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения; моноклональная гаммапатия ренального значения (*впервые введена*).

*IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения (MGUS)* считается предопухолевым состоянием. Обнаруживается у лиц старше 50 лет в 3%, после 70 лет — в 5% случаев. Может быть связана с заболеваниями соединительной ткани, периферической невропатией, кожными, эндокринными заболеваниями, поражением печени. Риск прогрессии в МВ составляет 1,5% в год. Отсутствуют клинические симптомы, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия, анемия.

Около 80% наблюдений моноклональных гаммапатий приходится на *не-IgM-моноклональную гаммапатию неопределенного значения* (подтипы — IgG, IgA, IgE, IgD, легкие цепи). Диагностические критерии не-IgM-MGUS (ВОЗ, 2022): М-белок в сыворотке крови <30 г/л; <10% клональных ПК в КМ и невыраженная плазмоклеточная инфильтрация в трепанобиоптате; отсутствие клинических симптомов, характерных для ММ или других лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) [амилоидоз и CRAB-синдром: С (Calcium) — гиперкальциемия (кальций >2,75 ммоль/л или на 0,25 ммоль/л выше верхней границы нормы); R (Renal) — нарушение функции почек (креатинин в сыворотке крови >2 мг/дл или >173 ммоль/л); A (Anaemia) — нормохромная нормоцитарная анемия (Hb <100 г/л или на 20 г/л меньше нижней границы нормы); B (Bone) — поражение костей скелета (очаги лизиса, тяжелая остеопения, патологические переломы, компрессия тел позвонков)]. В большинстве случаев течение заболевания стабильное, возможна прогрессия в ММ, амилоидоз, плазмцитому, риск прогрессии составляет 1% в год. До 20% наблюдений — в крови могут выявляться только свободные легкие цепи (Light chain MGUS), их соотношение (<0,26 или >1,65).

В группу *плазмоклеточных опухолей включены*: плазмцитомы; плазмоклеточная миелома; плазмоклеточные новообразования, ассоциированные с паранеопластическим синдромом (*POEMS, TEMPI и AESOP*).

**Плазмоклеточная миелома/ММ** — В-клеточное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся неконтролируемой клональной пролиферацией в костном мозге, реже — в экстрамедуллярных очагах, ПК, синтезирующих моноклональный Ig (IgG, IgA, IgD, IgE) и/или легкие цепи (κ, λ). Частота встречаемости миеломной болезни составляет в среднем 3,5 случая на 100 000 населения в год. ММ занимает 10–13% среди опухолей системы крови. Заболевание диагностируется в возрасте 40–70 лет, мужчины болеют чаще, чем женщины. Среди этиологических факторов обсуждается роль вируса герпеса 8-го типа.

Клинические проявления миеломной болезни разнообразны и определяются нарушением продукции гемопоэтических клеток (анемия, лейкопения, тромбоцитопения), высокой концентрацией моноклонального Ig (М-протеин), склонностью к инфекциям, наличием выраженных остеолитических изменений преимущественно в плоских костях скелета, нарушением функции почек. Дисфункции, обусловленные повреждением органов или тканей, обозначают как CRAB-синдром.

Выделяют следующие подтипы ММ: тлеющая (бессимптомная), симптоматическая, несекретирующая и плазмклеточный лейкоз. Диагноз ММ устанавливается при наличии критериев, указанных в **табл. 4.29**.

**Таблица 4.29.** Диагностические критерии множественной миеломы

Тлеющая миелома	Симптоматическая миелома
1. М-протеин в сыворотке крови ≥30 г/л или белок Бенс-Джонса в моче >500 мг/сут и/или клональные ПК в КМ от 10–60%. 2. Отсутствие органных повреждений (CRAB)	1. Клональные ПК в КМ более 10% или экстрамедуллярная плазмцитомы. 2. Установленные органные повреждения (CRAB). 3. Один или более биомаркеров опухолевой активности: более 60% клональных ПК в КМ; соотношение κ/λ свободных легких цепей сыворотки крови >100; более одного фокального очага поражения КМ по результатам магнитно-резонансной томографии

Многоцветная проточная цитометрия является интегральной частью лабораторных исследований, она используется в:

- диагностике ММ (выявление aberrантного фенотипа ПК, подтверждение клональности ПК);
- мониторинговании опухолевого клона при терапии (определение МОБ);
- стратификации пациентов по группам риска с использованием маркеров CD117, CD27, β2-микроглобулина;
- дифференциальной диагностике опухолевого и реактивного плазмцитоза.

Гистологическое исследование трепанобиоптата обеспечивает более надежную оценку плазмноклеточной инфильтрации. В *костном мозге* при ММ отмечается разной степени выраженности плазмноклеточная инфильтрация, характеризующаяся разной зрелостью — от плазмобластов, проплазмочитов до зрелых ПК, содержащих включения, вакуолизацию.

## Глава 4. Лабораторная гематология

Другим важным диагностическим признаком ММ является обнаружение *моноклонального Ig* в сыворотке крови и/или моче, выявляемого у 99% больных. У большинства пациентов наблюдается гипогаммаглобулинемия (снижение концентрации нормальных Ig более чем на 50%), редко — нормальные их значения. Моноклональный IgG встречается у 50%, IgA — приблизительно у 20%, моноклональные легкие цепи (белок Бенс-Джонса) — у 15%, IgD — у 2%, биклональная гаммапатия — у 2% больных. Протеинурия Бенс-Джонса обнаруживается у 75% больных.

Для определения Ig в сыворотке крови используют «золотой стандарт» — метод электрофореза с иммунофиксацией, который рекомендуют использовать и при гипогаммаглобулинемии, отсутствии М-протеина при электрофорезе сывороточных белков у пациентов с подозрением на ММ. Измерение сывороточных свободных легких цепей Ig очень важно у пациентов с несекретирующей ММ (у 2/3 обнаружено их увеличение) и у больных с низким уровнем моноклонального белка в сыворотке крови и/или моче, с солитарной плазмочитомой и тлеющей (асимптоматической) миеломой, так как выявление их патологических значений указывает на высокий риск прогрессии в симптоматическую миелому. В норме соотношение к/л равно 0,26–1,65. Концентрация свободных легких цепей в сыворотке крови и соотношение к/л коррелируют с величиной опухолевой массы. Лабораторными проявлениями ММ также являются: нормохромная нормоцитарная анемия, ретикулоцитопения, повышение СОЭ (в 70%), агрегация эритроцитов в мазке крови в виде монетных столбиков, криоглобулинемия, гиперкальциемия. Тромбоцитопения и нейтропения развиваются на поздних стадиях заболевания. ММ характеризуется выраженной геномной гетерогенностью. Данные кариологического исследования свидетельствуют о хромосомной нестабильности, проявляющейся количественными и структурными изменениями и нарушением экспрессии генов. У 30–50% больных определяются нарушения кариотипа, частота и степень которых коррелируют со стадией заболевания, прогнозом и ответом на терапию. Эволюция ММ — развитие острого плазмноклеточного лейкоза.

## Глава 4. Лабораторная гематология

### 4.9.3. Т- и НК-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы

Нами приводятся только нозологии, относящиеся к большой группе Т- и НК-клеточных лимфом.

**Периферическая Т-клеточная лимфома, без дополнительных уточнений** встречается с частотой около 30–40% среди общей группы нодальных Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, что соответствует примерно 1–1,5 случая заболевания на 1 млн населения в год. Чаще встречается у лиц старшей возрастной группы (медиана возраста — 60 лет), характеризуется высокой частотой экстранодальных поражений, в том числе кожи, агрессивным клиническим течением, сопровождается поражением костного мозга в 20–40% случаев. Опухолевые Т-лимфоциты характеризуются клеточным полиморфизмом, неправильным контуром ядер, могут встречаться крупные клетки с ядрами многодольчатого строения, напоминающие клетки Рид–Штернберга. *Иммунофенотип* варьирующ: чаще это CD4-позитивные опухоли; если клетки экспрессируют CD8 (около 15–40% случаев), то характерен цитотоксический иммунофенотип; встречаются двойные как негативные (CD4–CD8–), так и позитивные (CD4+CD8+) варианты. Среди других Т-клеточных маркеров на опухолевых клетках чаще экспрессированы CD5, CD7, реже — CD2, CD3. Лимфома чаще клональна по β-цепи Т-клеточного рецептора (TCR). Экспрессия активационного антигена CD30 характерна для данной нозологической группы, представлена в разных пропорциональных соотношениях — от низкой (менее 10%) до высокой (до 80%).

**Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ)** характеризуется клональной пролиферацией малого или среднего размера пролимфоцитов с фенотипом зрелых посттимических Т-лимфоцитов. Составляет около 2% лимфоидных лейкозов из зрелых Т-лимфоцитов, преобладает в возрасте старше 65 лет, имеет агрессивное течение. В клинической картине заболевания наблюдаются генерализованная лимфаденопатия, кожные поражения в виде эритематозных, папулезных высыпаний, гепатоспленомегалия. В *костном мозге* отмечается диффузная лимфоидная инфильтрация с преобладанием пролимфоцитов. В трепанобиоптате преобладают лимфоидные клетки среднего и малого размера, редко (в 25%) встречается мелкоклеточный вариант Т-ПЛЛ. В *периферической крови* — анемия, тромбоцитопения, гиперлейкоцитоз (часто более  $100 \times 10^9/\text{л}$ ) с лимфоцитозом более  $5 \times 10^9/\text{л}$  и фенотипом Т-ПЛЛ. Пороговые значения количества пролимфоцитов при Т-ПЛЛ отсутствуют. В ряде случаев Т-ПЛЛ имеет место полиморфизм ядер пролимфоцитов (извитые, скрученные, расщепленные, мозговидные), сходных с клетками Сезари.

Иммунофенотип: опухолевые клетки при Т-ПЛЛ имеют фенотип посттимических Т-лимфоцитов (TdT–CD1a–CD34–). Иммунологические маркеры соответствуют либо наивным Т-хелперам (Th), либо центральным Т-лимфоцитам памяти (CD45RA+/-CCR7+CD27+CD45RO+/-). Экспрессия Т-клеточных антигенов (CD2, CD3, CD5, CD7), как правило, сохраняется. Характерна гиперэкспрессия CD5 и CD7, в то время как экспрессия CD2 и CD3 может быть снижена. В большинстве случаев характерен фенотип CD4+CD8– (в 40–60% случаев); реже — CD4+CD8+ (25–41%) и CD4–CD8+ (15%). Козэкспрессия CD4+CD8+ является отличительной чертой Т-ПЛЛ, она редко встречается при других зрелых посттимических Т-клеточных опухолях. Отмечается высокая экспрессия CD52, отсутствуют признаки цитотоксичности. В 80% случаев Т-ПЛЛ происходит перестройка хромосомы 14 в виде inv (14;14), которая приводит к соединению локусов гена *TCL1* и гена *TCR*. Это вызывает гиперэкспрессию белка TCL1. Экспрессия *cutTCL1* (T-cell lymphoma break point 1) отмечается в 70–80% наблюдений и рассматривается в качестве классификационного маркера

для Т-ПЛЛ. Гиперэкспрессия онкогена *TCL1A* может быть обнаружена методами ИГХ и проточной цитометрией. В 10% случаев наблюдается t(14;14) (АКТ-активатор). Аномалии хромосомы 8 встречаются в 70–80% наблюдений. Средняя продолжительность жизни больных составляет около 7 мес.

**Синдром Сезари** — Т-клеточная лимфома кожи, которая характеризуется эритродермией, генерализованной лимфаденопатией и появлением в крови опухолевых Т-лимфоцитов (клеток Сезари). Синдром Сезари составляет 2–3% первичных кожных Т-клеточных лимфом. Болеют преимущественно люди пожилого возраста с преобладанием пациентов мужского пола, средний возраст больных составляет 60–65 лет.

*Критерии установления диагноза синдрома Сезари:* отсутствие предшествующего грибовидного микоза; генерализованная эритродермия; наличие в крови клона Т-лимфоцитов, либо увеличение абсолютного числа клеток Сезари в крови  $\geq 1000/\text{мм}^3$ , либо увеличение соотношения  $\text{CD4}/\text{CD8} \geq 10$ ;  $\text{CD4}+\text{CD7} \geq 40\%$  или  $\text{CD4}+\text{CD26} \geq 30\%$ .

*Иммунофенотип:* опухолевые клетки имеют фенотип зрелых Th памяти:  $\text{CD4}+\text{CD45RO}+\text{CD45RA}+/-\text{CCR7}+\text{CD26}-\text{CD28}^{\text{high}}\text{CD8}-$ . Достаточно часто регистрируется aberrантный фенотип с низкой экспрессией CD2, CD3, отсутствием CD7 и CD26. Могут наблюдаться полная или частичная потеря экспрессии пан-Т-клеточных антигенов CD3, CD5 и CD7, появление экспрессии цитотоксических протеинов TIA-1, гранзима В и перфорина, а также aberrантный  $\text{CD4}+/\text{CD8}+$  или  $\text{CD4}-/\text{CD8}-$  фенотип. PD1 (CD279) экспрессируется опухолевыми клетками в коже и периферической крови почти во всех наблюдениях. Клетки Сезари экспрессируют  $\text{TCR}\alpha/\beta$ , CD25, ICOS, CCR4, иногда CXCL13. NK-клеточные маркеры, такие как CD158K/KIR3DL2 и NKp46, могут также экспрессироваться.

## Глава 4. Лабораторная гематология

В костном мозге и периферической крови обнаруживают атипичные лимфоциты с мозговидными ядрами, среди которых выделяют клетки большого размера (классические клетки Сезари) и мелкие (более 1000 мкм). Ядра занимают большую часть клетки, округлой или овальной формы, с мозговидной, конвультивной структурой хроматина, чаще без нуклеол. Инфильтрация костного мозга клетками Сезари значительно варьирует. ИГХ, гистологическое и молекулярно-биологическое (определение реаранжировки гена *TCR* методом ПЦР) исследования кожи, ЛУ являются дополнительными методами в неясных диагностических ситуациях.

**Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ)** характеризуется опухолевой пролиферацией цитотоксических Т-лимфоцитов в костном мозге, крови, селезенке. Одинаково часто встречается у мужчин и женщин, средний возраст на момент установления диагноза — 60 лет. Этиология Т-ЛБГЛ неизвестна, обсуждается хроническая стимуляция Т-клеток аутоантигенами или чужеродными антигенами (возможно, вирусными). В основе таких представлений лежит тот факт, что Т-ЛБГЛ часто ассоциируется с аутоиммунными процессами. Заболевание характеризуется длительным лимфоцитозом за счет БГЛ (свыше 6 мес) без четко установленной причины. Т-клеточный лейкоз из БГЛ характеризуется доброкачественным течением процесса. Клинической картине заболевания свойственны рецидивирующие бактериальные инфекции, симптомы РА, синдрома Фелти, увеличение селезенки (15–50% случаев), поликлональная гипергаммаглобулинемия, антинуклеарные антитела (АНА). У 1/3 пациентов течение асимптоматичное. МВКЛ обнаруживается в 25% случаев Т-ЛБГЛ. В периферической крови в 80% случаев отмечается нейтропения ( $<1,5 \times 10^9/\text{л}$ ), приблизительно у 20–25% она носит тяжелый характер ( $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ ) и сопровождается инфекциями. Анемия с умеренным снижением Hb регистрируется у 48% больных, умеренная тромбоцитопения ( $<150 \times 10^9/\text{л}$ ) выявляется примерно у 20% больных. Исследование мазка периферической крови имеет большое значение в установлении диагноза. В лейкоцитарной формуле наблюдается абсолютный лимфоцитоз на фоне нормального или сниженного количества лейкоцитов. Среди лимфоцитов преобладают БГЛ (в норме в крови  $<0,3 \times 10^9/\text{л}$  БГЛ). Более 90% больных с Т-клеточным вариантом лейкоза имеют на момент установления диагноза более  $1 \times 10^9/\text{л}$  БГЛ. Постановка диагноза значительно упростилась благодаря проточной цитометрии, ИГХ, определению Т-клеточной клональности молекулярными методами, мутаций STAT3 (11–70%), STAT5b (2%). С помощью проточной цитометрии обнаруживают следующие иммунофенотипические варианты опухолевых клеток: в 80% случаев  $\text{CD3}+\text{CD8}+\text{CD57}+\text{CD45RA}+\text{TCR}\alpha\beta+$  (фенотип зрелых Т-эффекторов памяти); редкие варианты: 1)  $\text{CD3}+\text{CD4}+\text{CD8}-\text{TCR}\alpha\beta+$ ; 2)  $\text{CD3}+\text{CD4}+\text{CD8}+\text{TCR}\alpha\beta+$ ; 3)  $\text{CD3}+\text{CD4}-\text{CD8}-\text{TCR}\gamma\delta+$  (менее 10% случаев).

К обязательным диагностическим критериям Т-ЛБГЛ относят: увеличение циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов (часто  $>2 \times 10^9/\text{л}$ , но может быть и меньше); присутствие Т-лимфоцитов (обычно  $\text{CD8}+$ ) со сниженной экспрессией CD5 и/или CD7, аномальной экспрессией CD16 и NK-ассоциированных рецепторов; доказательство Т-клеточной моноклональности (или олигоклональности). Наличие двух из трех обязательных критериев и одного желательного критерия достаточно для диагноза Т-ЛБГЛ. К желательным критериям относятся интрасинусоидальная лимфоидная инфильтрация костного мозга цитотоксическими Т-лимфоцитами при иммуногистохимическом окрашивании; STAT3-мутация.

Транзиторный хронический поликлональный Т- или NK-клеточный лимфоцитоз нередко выявляется после перенесенных вирусных инфекций и при аутоиммунных заболеваниях. Олигоклональная и небольшая клональная пролиферация БГЛ описана у здоровых лиц. Кроме того, пролиферация клональных  $\text{CD3}+$ -клеток может выявляться после трансплантации органов. Решающим в дифференциальной диагностике реактивного и опухолевого Т-клеточного лимфоцитоза является динамическое наблюдение. Повторные анализы крови, определение Т-клеточной клональности молекулярными методами и детальное клиническое обследование в течение 6 мес, как правило, позволяют отличить Т-клеточную опухоль от реактивного процесса.

**НК-клеточный лейкоз из БГЛ** встречается преимущественно у пожилых лиц, как у мужчин, так и у женщин, средний возраст — 60 лет, имеет доброкачественное течение в виде изолированного бессимптомного персистирующего лимфоцитоза ( $>2 \times 10^9/\text{л}$ ) более 6 мес. НК-клеточный лейкоз из БГЛ сочетается с солидными опухолями, васкулитами,

невропатией, лейкозами, аутоиммунными заболеваниями, но значительно реже, чем Т-ЛБГЛ. В КМ и периферической крови отмечается повышение числа лимфоцитов за счет БГЛ.

*Иммунофенотип* клеток характеризуется sCD3-суtCD3ε+CD56+/-CD16+. Опухолевые клетки экспрессируют CD16 и обычно имеют низкий уровень экспрессии CD56 и CD57. Отмечается сильная экспрессия CD94, цитотоксических маркеров — гранзим В, гранзим М, TIA-1. Экспрессия CD2, CD7 снижена, в то время как CD8 — повышена. Клетки НК-клеточного лейкоза из БГЛ характеризуются аномальной экспрессией иммуноглобулиноподобных рецепторов киллеров (killer cell immunoglobulin-like receptors — KIR) — CD158a, CD158b, CD158e, CD158i, CD94, CD161. В норме Т-лимфоциты не экспрессируют CD158a-i и очень слабо экспрессируют CD94 и CD161. KIR либо отсутствуют на НК-клетках при НК-клеточном лейкозе из БГЛ, либо экспрессируется одна из изоформ CD158 (особенно часто в отсутствие экспрессии CD56). Описаны и другие аномалии НК-клеточных рецепторов — яркая экспрессия гетеродимера CD94/NKG2A, слабая или отсутствие — CD161. В большинстве случаев кариотип неизменен. Мутации STAT3 наблюдаются в 30%, TET2 — в 25–30% случаев.

## Глава 4. Лабораторная гематология

К *обязательным диагностическим критериям* НК-клеточного лейкоза из БГЛ относят: 1) увеличение циркулирующих НК-клеток (часто  $>2 \times 10^9/\text{л}$  в течение более чем 6 мес); 2) присутствие НК-клеток в костном мозге и периферической крови (обычно CD3–CD16+), обнаруженных с помощью проточной цитометрии; 3) рестриктивная экспрессия KIR-рецепторов, доказанная проточной цитометрией (либо отсутствие экспрессии, либо преобладание одной изоформы), которая принимается как суррогатный маркер клональной экспансии; 4) интрасинусоидальная инфильтрация костного мозга цитотоксическими CD8+–НК-клетками и/или присутствие мутаций *STAT3* и/или *TET2*. При наличии второго и третьего критерия диагноз «НК-клеточный лейкоз» из БГЛ может быть установлен в отсутствие первого критерия.

### Рекомендуемая литература

1. Диагностика заболеваний системы крови / Под ред. Паровичниковой Е.Н., Гальцевой И.В. М.: ИД «Практика», 2024. 559 с.
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. 5-е изд. М., 2023. 539 с.
3. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Селиванова А.В. и др. Интерпретация лабораторных исследований при анемиях. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 156 с.
4. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Морфологическая диагностика миелодиспластических синдромов. М.: Триада, 2018. 31 с.
5. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Морфология клеток костного мозга в норме и патологии. Интерпретация миелограмм. М.: Триада, 2018. 245 с.
6. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / Под ред. акад. Поддубной И.В., акад. Савченко В.Г. М.: Буки-Веди, 2018.
7. Федеральное руководство по гематологии / Под ред. С.С. Бессмельцева, С.В. Сидоркевич. СПб.: Спец. изд-во мед. книг, 2024. 572 с.
8. Хронический лимфолейкоз. Современная диагностика и лечение. 2-е изд. / Под ред. Е.А. Никитина, В.В. Птушкина. М., 2023. 476 с.
9. Alaggio R. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Leukemia. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2> 46.
10. Barbara J. Bain. Leukaemia Diagnosis. 2024. 636 p.
11. Campo E. et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee // Blood. 2022. Vol. 140. N. 11. P. 1229–1253.
12. Daniel A. Arber, Elias Campo, Elaine S. Jaffe. Advances in the Classification of Myeloid and Lymphoid Neoplasms. Virchows Archiv. 2023. Vol. 482. P. 1–9.
13. Dohner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN // Blood. 2022. Vol. 140. N. 12. P. 1345–1377.
14. Heuser M., Freeman S.D., Ossenkoppele G.J. et al. Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party // Blood. 2021. Vol. 138. N. 26. P. 2753–2767. doi:10.1182/blood.2021013626.
15. Liu Z., Li Y., Shi C. Monitoring minimal/measurable residual disease in B-cell acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry during targeted therapy // Int. J. Hematol. 2021. Vol. 113. N. 3. P. 337–343. doi:10.1007/s12185-021-03085-y.
16. Liang E.C., Dekker S.E., Sabile J.M.G. et al. Next-generation sequencing-based MRD in adults with ALL undergoing hematopoietic cell transplantation // Blood Adv. 2023. Vol. 7. N. 14. P. 3395–3402. doi:10.1182/bloodadvances.2023009856.
17. L. Jeffrey Medeiros, Amy Chadburn et al. Fifth Edition of the World Health Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: B-cell Neoplasms Mod. Pathology, 2024.
18. Patkar N., Kakirde C., Bhanshe P. et al. Utility of Immunophenotypic Measurable Residual Disease in Adult Acute Myeloid Leukemia-Real-World Context // Front Oncol. 2019. Vol. 9. P. 450. doi:10.3389/fonc.2019.00450.
19. Short N.J., Zhou S., Fu C. et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis // JAMA Oncol. 2020. Vol. 6. N. 12. P. 1890–1899. doi:10.1001/jamaoncol.2020.4600.
20. Tracy I. George Daniel A. Arber. Atlas of Bone Marrow Pathology, 2018. 293 p.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.1. Принципы цитологической диагностики

Цитологические исследования — вид морфологического анализа, основанного на изучении, оценке и интерпретации клеточных и структурных/тканевых изменений в норме и при различных поражениях с использованием микроскопических технологий. Цитологические исследования проводятся в целях диагностики опухолевых и неопухолевых изменений, стратификации обследуемых лиц по степени риска развития злокачественного процесса, определения тактики ведения пациента, мониторинга терапии.

Цитологическое исследование основывается на клеточных и архитектурных особенностях. К клеточным особенностям относятся: изменения ядра, цитоплазмы, ядерно-цитоплазматического соотношения; к архитектурным — образование структур и комплексов из клеток. Определяется характер патологического процесса, устанавливаются признаки воспалительных, реактивных, пролиферативных изменений или предопухолевых поражений, доброкачественных опухолей. Важное назначение цитологического исследования — получить ответ на вопрос о наличии или отсутствии злокачественного новообразования. Цитологическое исследование позволяет осуществлять наблюдение за характером клеточных изменений у лиц группы повышенного риска, что часто невозможно выполнить с помощью других морфологических методов. Результатом является формирование заключения в соответствии с современными терминологическими системами.

В случае невозможности проведения срочного прижизненного гистологического исследования или в дополнение к нему допустимо проведение интраоперационного цитологического исследования для уточнения характера патологического процесса и решения вопроса об абляции краев резекции и объеме хирургического вмешательства. Цитологическое исследование имеет преимущества перед другими методами в выявлении предопухолевых процессов и опухолей на ранних стадиях. Развитие эндоскопической техники, ультразвуковых методов в малоинвазивной методике в немалой степени способствовало широкому внедрению цитологического метода в диагностику новообразований практически из всех тканей организма, в том числе из внутренних органов, ранее недоступных внеоперационному морфологическому анализу.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.2. Получение материала для цитологического исследования

Наиболее ценную и корректную информацию о патологическом процессе цитологическое исследование предоставляет при тщательном соблюдении всех этапов исследования.

Очень важен долабораторный этап, на котором проводится выбор точки доступа и способов/методов получения материала. При корректном подходе к выбору доступа и способа взятия образца из патологически измененного участка вероятность получения информативного материала высокая. Правильное приготовление и окрашивание препарата непосредственно влияют на возможность адекватной интерпретации цитологической картины. Неправильная обработка или неинформативность исследуемого материала не могут быть компенсированы тщательностью последующей микроскопии.

Взятие биологического материала для цитологического исследования осуществляется врачом, обследовавшим или оперировавшим пациента, иным медицинским работником или лицом, осуществляющим уход за пациентом. Образцы биологического материала для проведения цитологических исследований подразделяют на три основные группы: эксфолиативные, пункционные и материал клеточного блока. Клеточный блок — метод приготовления цитологических препаратов, основанный на технике заливки клеточного материала (взвеси клеток) объемлющей средой с последующим изготовлением тонких срезов и нанесением их на предметное стекло (как при гистологической технике).

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.2.1. Эксфолиативные способы получения материала

Термином «эксфолиативный» обозначают самопроизвольное слущивание или принудительное инструментальное соскабливание клеток с поверхности исследуемой ткани. Эксфолиативный материал: секреты, экскреты, отделяемое и соскобы с поверхности эрозий, язв, ран, свищей, выделения из сосков МЖ, половых путей, свищей; мокрота, моча, соскобы, промывные воды, экссудаты, транссудаты и другие объекты при любой локализации патологического процесса. К эксфолиативному относится материал, полученный при любом эндоскопическом исследовании в виде мазков, отпечатков, промывных вод, отпечатков с абразивных щеток, зондов, а также биопсийный и операционный материал, взятый при хирургических вмешательствах (мазки-отпечатки биопсированных кусочков тканей, соскобы со свежего разреза удаленной ткани, жидкостное содержимое образований).

Интраоперационный соскоб получают во время операции с последующим цитологическим исследованием, которое является эквивалентом срочного морфологического исследования. Разрез уплотнения, опухоли или ЛУ необходимо проводить сухим скальпелем во избежание разрушения клеток водой. В большинстве случаев проводят соскоб с поверхности свежего разреза с помощью легкого соскабливания острым лезвием и последующим приготовлением мазка; при мягкой консистенции анализируемого объекта можно приготовить отпечатки, прикладывая предметное стекло к поверхности разреза ткани.

Правомерность срочного интраоперационного цитологического исследования обусловлена высокой точностью цитологической диагностики и вместе с тем простотой получения и обработки материала. Проводимое опытным врачом срочное цитологическое исследование опережает результаты срочного гистологического исследования замороженных срезов.



## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.2.2. Пункционные способы получения материала

Пункционный материал включает пунктаты/аспираты, полученные тонкоигльной аспирационной биопсией (ТАБ) из опухолей, опухолевидных образований, инфильтратов, серозных, суставных и других полостей, при наличии образований любой локализации: ЩЖ, слюнных желез, МЖ, ПЖ, костей и мягких тканей, легких, почек, средостения, кожи, ЛУ и других локализаций патологического процесса. К пункционному относится биоматериал, полученный при любом эндоскопическом исследовании в виде пунктатов, аспиратов, а также полученный с помощью прокола образования тонкой иглой при проведении манипуляций, хирургических вмешательств.

Различают аспирационную биопсию тонкой иглой (№ 22) и пункцию толстой иглой (№ 18–21) с получением кусочка ткани для патогистологического исследования. ТАБ под контролем визуализации — высокорезультативный метод диагностики, характеризующийся малой травматичностью, возможностью проведения в амбулаторных условиях, использования новых технологий [анализа изображения, проточной цитометрии, молекулярно-биологических и иммуноцитохимических исследований (ИЦХИ)], а также экономичностью. Достоинства метода — эффективность при диагностике злокачественных опухолей, возможность диагностики поражений небольшого размера (менее 1 см). Частота осложнений при ТАБ обычно не превышает 10%, использование сверхтонких игл значительно снижает число различного рода осложнений (менее 1%).

Противопоказания к проведению ТАБ: отсутствие четких данных о локализации процесса; предположительный диагноз сосудистого образования, подозрение на меланому; проводимая пациенту антикоагулянтная терапия.

После проведения ТАБ содержимое иглы помещают на предметное стекло и распределяют по стеклу краем шлифовального стекла или ребром иглы. Для исследования методом жидкостной цитологии образец биоматериала помещается в контейнер со специальным консервирующим раствором.

Если при проколе опухоли выделяется жидкость, то ее собирают в подставленную под иглу пробирку. Если она не стекает, можно использовать шприц, осторожно оттягивая поршень и набирая жидкость в шприц, после чего его снимают и содержимое выливают в пробирку. После удаления всей жидкости и сбора ее в пробирку (с добавлением антикоагулянта) следует тщательно пропальпировать участок, из которого она была удалена, для исключения остаточных масс, которые могли быть скрыты кистозным содержимым. Необходимо дополнительно пунктировать стенку кисты и приготовить мазки из этого материала.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.2.3. Транспортировка и регистрация материала

Цитологический материал транспортируется в лабораторию для исследования сразу после его взятия. Если получены жидкость, мокрота, моча, содержимое кист или любой кровянистый материал, то его необходимо доставить в лабораторию не позднее 24 ч. При невозможности быстрой доставки контейнеров с жидким материалом допустимо его хранение при температуре +4–8 °С, но не более 3 сут. Транспортировка цитологических препаратов должна проводиться в специализированных контейнерах для предметных стекол.

Полученная для цитологического исследования жидкость из серозных полостей доставляется в лабораторию в полном объеме. Разделение образца биологического материала для цитологического исследования на несколько проб и одновременная отправка в разные лаборатории не допускаются, так как неполноценный образец может ввести в заблуждение врача и привести к ошибочным заключениям.

После взятия материала и его нанесения на стекло цитологический препарат фиксируется в зависимости от метода окрашивания:

1) **влажная фиксация** — немедленное погружение препарата в контейнер с 95° этанолом (Этиловым спиртом<sup>▲</sup>) (допустимо использовать изобутиловый, изопропиловый спирт) с экспозицией 5 мин или немедленным нанесением специального спрея (аэрозоля для фиксации или капельного фиксатора) на стекло под прямым углом с расстояния 20 см (если предполагается окрашивание по Папаниколау);

2) **сухая фиксация** — высушивание препарата на воздухе при комнатной температуре (если предполагается окрашивание азур-эозиновыми красителями или гематоксилин-эозином).

Если цитологическое исследование предполагается проводить методом жидкостной цитологии, взятие и перенос биологического материала в консервирующую среду необходимо осуществлять в соответствии с рекомендациями производителя медицинских изделий для приготовления препаратов методом жидкостной цитологии.

Для идентификации материала на препаратах (контейнерах, виалах) указываются: фамилия, имя и отчество (при наличии) пациента/номер медицинской карты стационарного больного (или амбулаторной карты)/идентификационный номер пациента/штрихкод. Направление на цитологическое исследование должно содержать: фамилию, имя, отчество (при наличии) пациента, пол, дату его рождения, адрес регистрации, номер медицинского страхового полиса, номер медицинской карты пациента (при наличии), получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях, или номер медицинской карты стационарного больного в случае, если исследования проводятся при оказании медицинской помощи в стационарных условиях или в условиях дневного стационара; диагноз основного заболевания, код диагноза в соответствии с Международной классификацией болезней; краткий анамнез и важнейшие клинические симптомы; результаты инструментального и лабораторного исследования; данные о проводимой терапии (например, оперативном лечении, гормональной терапии, химиотерапии, лучевой терапии); локализация поражения и способ получения материала; прочие необходимые для регистрации материала и проведения исследования данные. В настоящее время используется штрихкодирование, в котором указаны перечисленные моменты или содержится информация для обращения к данным пациента по электронным сетям.

В лаборатории после доставки образцов материала для цитологического исследования проводят:

- прием, регистрацию, сортировку материала;
- проверку соответствия маркировки препарата (контейнера, вials) с маркировкой на направлении на исследование;
- проверку целостности и состояния препаратов (контейнеров, вials);
- выбраковку препаратов (контейнеров, вials) ненадлежащего качества (маркировка, целостность и состояние);
- обработку материала для получения препарата (окрашивание препаратов, приготовление препаратов методом жидкостной цитологии, центрифугирование и перенос осадка на стекло из контейнеров при исследовании биологических жидкостей);
- подготовку рабочего места, реагентов, расходного материала и оборудования для проведения цитологических исследований.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.2.4. Приготовление и окрашивание препарата

Правила приготовления препаратов едины вне зависимости от того, делает ли мазок специалист, получивший материал, или его готовят в лаборатории. Полученные при пункции жидкости в лаборатории центрифугируют, сливают верхний слой центрифугата и из осадка готовят мазки.

Готовый традиционный (классический) цитологический препарат — мазок, приготовленный с помощью размазывания образца, его фиксации и окрашивания перед исследованием. Мазок должен быть максимально тонким (приближающимся к однослойному), равномерной толщины на всем протяжении. В работе должны использоваться стандартные новые чистые стекла. Специалист, получающий материал для цитологического исследования, должен владеть навыками приготовления цитологического препарата.

Для цитологического исследования в зависимости от техники приготовления препарата, категории сложности исследуемого материала могут использоваться разные методы окрашивания цитологических препаратов: по Папаниколау, азур-эозином (по Романовскому, Лейшману, Паппенгейму и пр.), гематоксилин-эозин. В большинстве лабораторий для окрашивания используют азур-эозин на высушенном на воздухе мазке (сухая фиксация). Способы фиксации должны быть предварительно определены с лабораторией.

В практику цитологических лабораторий активно внедряется метод жидкостной цитологии. Использование метода жидкостной цитологии снижает количество неинформативного материала в связи со стандартизацией процесса пробоподготовки и окрашивания. Весь полученный материал переносится в вial или пробирку с консервирующим раствором, что позволяет сохранить материал, приготовить дополнительные препараты, а также провести дополнительные ИЦХИ и молекулярно-биологические исследования. Приготовленные методом жидкостной цитологии препараты удобны для микроскопии (клетки располагаются на небольшой площади в один слой, чистый фон препарата). Препараты, приготовленные методом жидкостной цитологии, обычно окрашивают по Папаниколау; возможно окрашивание гематоксилин-эозином.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.3. Описание цитологической картины и формулирование цитологического заключения

По результату цитологического исследования дается описание цитоморфологической картины и формулируется заключение, по возможности с указанием природы процесса (доброкачественные неопухольевые изменения или опухолевые поражения), а при наличии опухоли — с определением тканевой принадлежности и, по возможности, гистологической формы с учетом ограничений метода.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.3.1. Критерии цитологической диагностики

На основании цитологических критериев анализируют фон препарата, клеточный состав, архитектурные особенности и неклеточные компоненты и включения. По степени выраженности отклонения от нормального клеточного состава судят о природе патологического процесса.

При проведении исследования учитывают *фон препарата*, характеристика которого в ряде случаев играет большое диагностическое значение. Фоном могут быть элементы периферической крови или воспаления, сопровождающего опухолевый процесс, клеточный детрит, межклеточное вещество, капли жира, некротические массы. Фон препарата в виде межклеточного вещества может иметь диагностическое значение при определении тканевой принадлежности опухоли (например, хрящобразующие опухоли) или гистологической формы (например, муцинозная аденокарцинома).

При изучении *клеточного состава* анализируют количество, тип, размер, форму и состояние клеток; размеры, форму и расположение их ядер, структуру и особенности распределения хроматина, наличие и характеристику ядрышек, ядерно-цитоплазматическое соотношение, наличие признаков ядерного и клеточного полиморфизма. Количество клеток в препарате зависит как от объема полученного материала, так и от формы патологического процесса.

Расположение клеток в цитологическом препарате зависит от прочности межклеточных связей и обилия стромы. При опухолях (особенно в низкодифференцированных новообразованиях) клетки теряют тесную связь друг с другом, что приводит к появлению в препарате обильного клеточного состава (гиперклеточность). Вместе с тем при ряде

опухолей может отмечаться скудный клеточный материал, иногда с наличием единичных клеток (например, при остеогенной саркоме, дольковом раке МЖ).

Размеры клеток обычно оценивают, исходя из параметров нормальных клеток того же типа. Размеры ядер обычно сравнивают с размером эритроцита (в норме достаточно стабильным, примерно 7 мкм). Если размер ядра меньше эритроцита, его считают мелким, если в 1–1,5–2 раза больше эритроцита — средним, в 3–6 раз — крупным, в 7 раз и более — гигантским. При оценке соотношения размера ядра и цитоплазмы учитывают степень отклонения этого параметра от нормальной клетки того же типа.

При исследовании **архитектурных особенностей** отмечают особенности расположения клеток: разрозненно, в виде структур с оценкой их характеристик (например, сосочкоподобные, ацинарные, розеткоподобные, ветвистые), в группах, скоплениях, комплексах, пластах. Для доброкачественных поражений характерны правильное, упорядоченное расположение клеток с сохранением их полярности, одинаковое расстояние между ними, сходные размеры клеток и ядер, образующих структуры. Для разных вариантов злокачественных опухолевых поражений характерны патогномоничные структуры и комплексы.

**Неклеточные компоненты** иногда имеют большое диагностическое значение в зависимости от локализации процесса и с учетом цитологических критериев (например, фибромиксоидная строма с ассоциированными с ней неэпителиальными клетками, консистенция коллоида, псаммомные тельца).

**Признаки доброкачественных и злокачественных поражений.** При реактивных процессах и фоновых поражениях чаще всего увеличены размеры и количество клеток (пролиферация), увеличен размер ядер, часто отмечается их более интенсивная окраска (гиперхромия). В некоторых ядрах (особенно характерно для железистого эпителия) отмечаются ядрышки увеличенного размера. При некоторых состояниях отмечаются изменения цитоплазмы в виде вакуолизации и изменения окрашивания.

При предопухолевых поражениях размер ядер значительно увеличен, ядро деформировано, контуры его неровные, ядерная мембрана неравномерно утолщена. Хроматин распределен неравномерно, часто петлистый, тяжистый с чередованием мелких и крупных участков уплотнения. Могут быть видны множественные мелкие ядрышки или увеличенные в размере относительно таковых в неизмененных клетках, встречаются многоядерные клетки. В отличие от злокачественной опухоли в разных клетках изменения однотипные.

К общим цитологическим изменениям, характерным для злокачественных опухолей, относятся: клеточный и ядерный полиморфизм; образование комплексов из клеток и/или структур, отличных от нормальных, опухолевый диатез — реакция соединительной ткани на инвазию (проращение опухоли): зернистые массы, обилие гранулоцитов, эритроцитов, что создает вид «грязного» фона.

В злокачественной опухоли можно увидеть две противоположные тенденции: к атипии («дедифференцировка», анаплазия, катаплазия) и к дифференцировке. Дифференцировка опухолевых клеток всегда неполная, атипичная и афункциональная, но в ряде случаев можно установить тканевую принадлежность опухоли, а часто и ее гистогенез.

В случае отсутствия определенной дифференцировки говорят о недифференцированных опухолях. Для низкодифференцированных опухолей характерны резко выраженный полиморфизм клеток, ядер и ядрышек, гиперхромия ядер, часто с «комковатым» нерегулярным хроматином, полиплоидия, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения за счет укрупнения ядер, часто обилие митозов с преобладанием среди них патологических.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.3.2. Цитологическое заключение

Цитологическое заключение оформляется с учетом комплекса клинико-анамнестических данных (клиническая картина, важные особенности анамнеза жизни и заболевания), а также результатов других лабораторно-инструментальных исследований. Цитологическое заключение формулируется в соответствии с существующими морфологическими классификациями (клиническими рекомендациями, стандартами лечения) на основе международных терминологических систем оценки цитологических изменений.

При отсутствии возможности получения материала для гистологического исследования целесообразно до начала терапевтических манипуляций или оперативного вмешательства подкреплять цитологическое заключение дополнительными методами (например, молекулярно-генетическими, ИЦХИ).

Проведение цитологического исследования должно быть клинически обоснованным, осуществляться с учетом преимуществ и ограничений метода. Следует избегать гипердиагностики во избежание излишних инвазивных вмешательств в отношении пациента, а также необоснованной, зачастую агрессивной терапии.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.3.3. Ограничения цитологической диагностики

Несмотря на достижения цитологической диагностики, ошибки неизбежны даже у опытных специалистов. Ошибки бывают объективные, субъективные и технические.

**Основные причины объективных ошибок:**

- отсутствие патогномоничных признаков злокачественности;
- недостаточная изученность некоторых вариантов патологии (например, редко встречающиеся и малоизученные опухоли);
- многообразие цитологической картины злокачественных и доброкачественных процессов;

- отсутствие гарантии того, что исследуемый материал получен из патологического очага, а не из окружающей ткани.

#### **Основные причины субъективных ошибок:**

- недостаточная профессиональная подготовка специалиста, выполняющего цитологическое исследование;
- отсутствие клинико-анамнестических данных и результатов других диагностических исследований;
- недостаточная подготовка (опыт и квалификация) врача-клинициста, получающего материал для цитологического исследования;
- неправильная трактовка врачом-клиницистом результатов цитологического исследования.

Даже при соблюдении стандартных условий получения, приготовления и окрашивания препаратов могут возникать трудности, связанные с различной интерпретацией клеточного состава разными специалистами. В клинической цитологии, помимо широкого спектра стандартных методов окрашивания препарата, используют дополнительные методики, позволяющие определять различные компоненты клеток (ДНК, РНК, гемосидерин, меланин, слизь, гликоген, липиды, пероксидазу, НЭ, КФ и ЩФ). Следует активно применять дополнительные методы диагностики, например молекулярно-биологические, ИЦХИ.

Существует несколько организационных форм работы цитологической службы: размещение в составе КДЛ, цитологической лаборатории онкологического диспансера и научно-исследовательского института, централизованной цитологической лаборатории. Поскольку результаты цитологической диагностики постоянно проходят гистологическую верификацию, у цитологов есть мощный стимул к регулярному профессиональному развитию. Повышению качества цитологической диагностики способствуют:

- непрерывное профессиональное образование, внутренний и внешний контроль качества цитологических исследований;
- консультации экспертов по сложному диагностическому материалу.

В большой лаборатории консультирование обычно происходит в пределах коллектива, однако при некоторых сложных случаях даже опытным специалистам необходимо посоветоваться с коллегами с опытом диагностики редких и сложных опухолей в других учреждениях. В связи с этим существует традиционная практика очных консультаций и/или обсуждения на заседаниях круглого стола. Вместе с тем активно внедряются технологии телемедицины.

## **Глава 5. Клиническая цитология**

### **5.4. Комплексирование цитологии с высокотехнологичными лабораторными исследованиями**

#### **5.4.1. Иммуноцитохимические исследования**

ИЦХИ — метод обработки образцов биологического материала, основанный на реакции «антиген–антитело», с целью идентификации и установления локализации в клетках разнообразных молекулярных структур и соединений: Ig, гормонов и их рецепторов, ферментов, рецепторов поверхностных мембран. При ИЦХИ исследуется нативный материал, что обеспечивает доступность антигенов для взаимодействия с антителами. Окрашивается комплекс «антиген–антитело». ИЦХИ используют для:

- определения характера процесса (доброкачественный или злокачественный);
- выявления предопухолевых состояний (дисплазий);
- установления формы злокачественного поражения (гистогенеза, тканевой принадлежности), особенно при опухолях мягких тканей и лимфопролиферативных заболеваниях;
- выявления микрометастазов в ЛУ;
- трактовки первично-множественных поражений;
- верификации первичного очага при метастатических поражениях;
- определения наличия рецепторов для адресной (таргетной) терапии.

Для установления прогноза опухолевого процесса используют: маркер пролиферативной активности Ki-67, онкопротеин C-erbB-2, белок p53, рецепторный статус, факторы роста эндотелия сосудов, металлопротеиназы и другие маркеры опухолевого роста.

#### **Краткая характеристика некоторых онкомаркеров для иммуноцитохимического исследования**

**Экспрессия белка Ki-67** (маркера пролиферации) присутствует в ядрах клеток на всех стадиях жизненного цикла, за исключением G0 (с середины G1 увеличивается, достигает пика в метафазе и уменьшается в анафазу; после выхода клетки из митоза антиген не выявляется). Высокий пролиферативный индекс свидетельствует о высокой агрессии опухоли.

**Рецептор эпидермального фактора роста онкопротеин C-erbB-2 (Her2/neu)** локализуется в 17-й хромосоме и кодирует трансмембранную тирозинкиназу рецептора ростового фактора. Придает клеткам свойство неограниченного деления, служит фактором риска рецидива заболевания. Наличие экспрессии коррелирует с плохим прогнозом: у 2/3 больных в первые 3 года появляются отдаленные метастазы. При отсутствии экспрессии 10-летняя выживаемость у пациенток при раке МЖ составляет 85%. В случае высокой экспрессии рекомендована таргетная и интенсивная химиотерапия.

**Белок p16INK4a — ингибитор циклинзависимой киназы** — регулирует переход клеток из G1 в S-фазу. На конечном этапе дифференцировки эпителиальных клеток определяется в очень малых количествах. Повышенная экспрессия p16INK4a, связанная с активностью онкопротеина E7 вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска,

является индикатором нарушения регуляции клеточного цикла и, соответственно, индикатором присутствия цервикальной неоплазии.

**Рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR), рецепторы HER-2 Neo** в пунктатах при раке МЖ должны быть выполнены у каждой больной для определения лечебной тактики. Определение HER-2-статуса важно не только при раке МЖ, но и при раке желудка. **Трастузумаб (Герцептин<sup>®</sup>)** является рекомбинантным моноклональным антителом, связывающимся с рецепторами 2-го типа человеческого эпидермального фактора роста HER-2/neu на поверхности опухолевых клеток. При HER-2-позитивных опухолях МЖ и желудка применение **трастузумаба (Герцептина<sup>®</sup>)** высокоэффективно, что обусловлено как прямой цитотоксичностью, так и непосредственным блокированием пролиферации, стимуляцией апоптоза, антиангиогенной активностью. Гиперэкспрессия протеина HER-2/neu при инвазивном раке МЖ встречается в 10–30% наблюдений с плохим прогнозом, но эти опухоли поддаются лечению.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.4.2. Молекулярно-генетические исследования

Молекулярно-генетические исследования при злокачественных опухолевых поражениях открыли многие ключевые механизмы развития новообразований и присущие опухолевой клетке свойства, что позволило создать новые ЛС — таргетные препараты, действующие на конкретную мишень. Для диагностики и определения чувствительности к таргетной терапии злокачественных опухолей встают задачи определения повышенной экспрессии белка и выявления увеличенного количества соответствующего гена или участка хромосомы, определения транслокаций генов или точечных мутаций. Мутации принято подразделять на геномные, хромосомные и генные. Цитологический материал является предпочтительным для проведения молекулярно-генетических исследований. В цитологическом материале лучше сохраняются ДНК и РНК. Методики хромогенной гибридизации *in situ* (CISH), FISH, ПЦР-РВ и секвенирования с использованием цитологического материала позволяют исследовать функционирование генома клетки, определять наличие в ней мутаций или чужеродной ДНК. Для CISH возможно использование как окрашенных, так и неокрашенных цитологических мазков, но лучше применять жидкостные монослойные неокрашенные препараты. Для метода ПЦР-РВ и секвенирования возможно использовать цитологические мазки, замороженные осадки жидкостей и цитологический материал в консервирующем растворе.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5. Диагностическое значение цитологических исследований

#### 5.5.1. Цитологические исследования при патологии органов дыхания

Органы дыхания — нос, ротовая полость, носоглотка, гортань, трахея, главные бронхи, ветвящаяся система бронхов, бронхиолы, альвеолы. Эти органы выстланы эпителием, изменения которого несут важную диагностическую информацию при цитологическом исследовании.

Полость носа выстлана многорядным мерцательным эпителием, полость рта — многослойным плоским неороговевающим эпителием. Такой же эпителий выстилает гортань и голосовые связки. Трахея представлена многорядным мерцательным эпителием, в состав его входят базальные клетки, мерцательные (реснитчатые) клетки, слизистые клетки (при накоплении слизи — бокаловидные), вставочные клетки, нейроэндокринные клетки [другое название — клетки системы захвата и декарбоксилирования предшественников аминов (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation — APUD)]. С каждым разветвлением бронхов уменьшается рядность и высота эпителия, постепенно исчезают бокаловидные клетки. В бронхиолах эпителий однорядный и содержит, помимо вышеперечисленных клеток, клетки Клара, секретирующие сурфактант, благодаря которому бронхиолы и альвеолы находятся в расправленном состоянии. Альвеолы выстланы пневмоцитами первого типа (крупные уплощенные клетки, участвующие в газообмене) и пневмоцитами второго типа (крупные округлые клетки, также секретирующие сурфактант). В альвеолах содержатся альвеолярные макрофаги — органоспецифичные клетки моноцитарной природы.

#### Материал для цитологического исследования

**Мокрота** — эксфолиативный материал, цитологическое исследование которого представляет собой классический метод оценки доброкачественных заболеваний, выявления предопухолевых изменений (клетки с признаками дисплазии), скрининга центрально расположенного рака легких. Метод легко воспроизводимый, неинвазивный и недорогой. Однако цитологическое исследование мокроты обладает наименьшими показателями ДЧ и ДС при диагностике опухолевых поражений. Клетки в мокроте подвержены дегенеративным изменениям, из-за чего интерпретация клеточного состава при цитологическом исследовании мокроты может быть затруднена. Метод применяют как скрининговый при отсутствии данных о злокачественном поражении, а также при предположительном диагнозе опухоли у тяжелых пациентов, отягощенных другой соматической патологией. Исследование мокроты важно в выявлении туберкулеза и оппортунистических инфекций.

В специализированных отделениях торакального профиля предпочтение отдают комплексному использованию инструментальных методов получения материала для цитологического исследования, в первую очередь применяемых при бронхоскопии. При бронхоскопии можно получить БАЛ, браш-биопсию (соскоб щеткой), биоптат, с которого делают отпечаток для цитологического исследования.

**БАЛ** используется при цитологической диагностике диффузных и диссеминированных поражений легких, показан при альвеолите, протеинозе легкого и при других неопухолевых поражениях как диагностическая манипуляция. Материал получают при фибробронхоскопии путем введения через носовые дыхательные пути эндоскопа стерильного, подогретого до 38 °С изотонического раствора натрия хлорида (50–250 мл) с pH 7,2–7,4. Процедура проводится под

местной анестезией. Введенный раствор после введения аспирируется из дыхательных путей. Процедуру повторяют 5–6 раз, собирая каждую порцию лаважа в специальную емкость. За исключением первой порции, содержащей обильную примесь слизи, остальные порции БАЛ должны немедленно транспортироваться при комнатной температуре; если доставка в лабораторию занимает более 30 мин после получения, образцы следует хранить и транспортировать при 4 °С. Одну часть материала отфильтровывают и используют для подсчета числа клеток и жизнеспособности макрофагов. Остальной материал центрифугируют в течение 10 мин в режиме 1500 об/мин, из осадка готовят препараты.

При исследовании БАЛ удается идентифицировать грибы, пневмоцисты, выявить признаки цитопатического эффекта вирусов, диагностировать оппортунистическую инфекцию у иммунокомпрометированных пациентов (ВИЧ-инфицированных и при трансплантации органа), интерстициальные поражения легких, гранулематозы, гиперчувствительную пневмонию, асбестоз. БАЛ не является диагностическим материалом опухолевых поражений, характеризуется низкой ДЧ и ДС.

**Браш-биопсия бронхов** позволяет выявлять около 60–70% эндобронхиальных неоплазий, но демонстрирует низкую чувствительность выявления подслизистых новообразований, в частности карциноидных опухолей. Образцы браш-биопсии получают одноразовой стерильной щеткой, заключенной в оболочку катетера. Кисточка прислоняется к поверхности пораженного участка, захваченные клетки наносят на предметное стекло либо помещают в среду для жидкостных препаратов или клеточного блока. Браш-биопсия бронхов позволяет с помощью щетки соскоблить с поверхности подозрительного очага трудноотделяемые клетки. Поверхность поражения предварительно очищается, а клетки лучше сохраняют морфологические признаки по сравнению с клетками, которые отделились в просвет бронхов. Браш-биоптат — более адекватный диагностический образец в сравнении с БАЛ.

**ТАБ** представляет собой метод получения образцов биологического материала из очага поражения с помощью тонкой иглы (трансторакальный, трансbronхиальный или транспищеводный доступ) под контролем визуализирующих методов (УЗИ). При трансbronхиальных и транспищеводных ТАБ во время эндоУЗИ для повышения эффективности цитологического исследования используют быструю оценку на месте [Rapid on-site evaluation (ROSE)]. ТАБ используется для диагностики периферических поражений легкого, недоступных для других методов получения материала, выполняют при косвенных признаках перибронхиального поражения или поражения паратрахеальных, бифуркационных или других ЛУ, выявленных лучевыми и/или эндоскопическими методами. Параметры диагностической точности цитологической диагностики опухолевых поражений легких по материалу ТАБ значительно выше, чем таковые при исследовании образцов БАЛ и браш-биопсии бронхов. В материале БАЛ и браш-биопсии присутствуют поверхностные эпителиальные клетки, при ТАБ материал получают из глубины поражения, поэтому он содержит большое количество жизнеспособных диагностически важных клеток.

## Глава 5. Клиническая цитология

Для оформления результата цитологического исследования по материалу из бронхолегочной системы используют систему отчетности в респираторной цитопатологии, разработанную ВОЗ в 2022 г. (The World Health Organization Reporting System for Lung Cytopathology), которая включает следующие категории.

**1. Недостаточный/неадекватный/недиагностический материал.** Термины «недостаточный» или «неадекватный» используются для образцов, которые трудно интерпретировать из-за низкой клеточности, плохой пробоподготовки, а также избыточной примеси в препаратах крови, воспалительного материала. К «недиагностическому» материалу относят также образцы с достаточным количеством неизмененных клеток, если цитологическая картина не коррелирует с клинико-инструментальными данными, указывающими на наличие опухолевого поражения.

В протоколе исследования указывают причину отнесения материала к данной категории. Если в материале обнаружены признаки атипии, то материал независимо от количества клеточного материала классифицируется как атипичный в соответствии с категориями. Риск злокачественности в данной категории составляет 40–60%.

**2. Доброкачественные изменения.** Образцы с признаками, характерными для неопухолевого процесса или доброкачественного новообразования. Материал содержит нормальные компоненты легочной ткани вне зависимости от полученных результатов инструментальных исследований. К этой категории относят не только неопухолевые изменения, но и доброкачественные опухолевые поражения, такие как гамартома легкого, склерозирующая пневмоцистома, одиночная трахеобронхиальная папиллома, новообразования типа опухолей слюнных желез, веретенноклеточные опухоли, менингиомы, зернистоклеточная опухоль, эктопия тканей щитовидной железы и парашитовидных желез. Риск злокачественности — 20–40%.

**3. Атипичные изменения.** Образцы материала с признаками клеточной или архитектурной атипии, количественно или качественно недостаточной для точной диагностики поражения. Риск злокачественности — 50–60%.

**4. Изменения, подозрительные в отношении злокачественности.** Образцы с подозрительными цитологическими признаками, указывающими на злокачественную трансформацию, но количественно и качественно недостаточными для утвердительного заключения о наличии опухолевого поражения. Риск злокачественности — 54–90%.

**5. Злокачественные изменения.** Образцы, демонстрирующие полный набор цитоморфологических признаков злокачественности и отсутствие других противоречивых признаков. Риск злокачественности — 90–100%.

### Доброкачественные изменения в бронхолегочной системе

Отмечаются при целом спектре неопухолевой патологии: пневмонии (возбудители — пневмококки, гемофильная палочка, микоплазма, хламидии, вирусы, золотистый стафилококк), грибковые заболевания (возбудители — *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*), паразитарные заболевания (возбудители — пневмоцисты, амебы и др.), бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмокониозы, интерстициальные заболевания легких, туберкулез, саркоидоз.

Типовыми цитологическими изменениями при неопухолевых доброкачественных заболеваниях являются следующие.

1. **Реактивные и дегенеративные изменения** — укрупнение клеток и ядер, появление многоядерного мерцательного эпителия, в ядрах — признаки гидропической дегенерации — чередование петель хроматина с «пустотами», ядра с признаками кариолизиса, кариорексиса. Нарушение целостности ядерной мембраны и структуры хроматина, вакуолизация и разрушение цитоплазмы, появление фрагментов разрушенных клеток, «голых» ядер, цilioцитотрофия (отрыв апикальной части цитоплазмы реснитчатого эпителия с образованием отдельного скопления ресничек), потеря ресничек, терминальной полосы.

2. **Пролиферация** — увеличение числа клеточных элементов, а также их размера (увеличение клетки и ядра при сохранении нормального ядерно-цитоплазматического соотношения). Пролиферация лежит в основе гиперплазии — увеличения объема ткани. При воспалительных процессах и воздействии агрессивных экзогенных и эндогенных факторов могут образовываться дефекты, которые заполняются благодаря процессам пролиферации и регенерации. При этом в цитологических препаратах можно отметить псевдопапиллярные структуры из укрупненных клеток мерцательного эпителия с крупными ядрами, плотные скопления из укрупненных базальных клеток, а также увеличение числа и размера бокаловидных клеток, пневмоцитов.

3. **Метаплазия** — замена одного вида ткани на другой. При метаплазии происходит появление клеток, не свойственных данной локализации и отличающихся от нормальных клеток морфологически и функционально, — отмечается при разных заболеваниях. В бронхиальном эпителии из метапластических состояний наиболее часто встречается плоскоклеточная метаплазия бронхиального эпителия. При **плоскоклеточной метаплазии** обнаруживают метаплазированные клетки небольшого размера, округлой, овальной, иногда полигональной формы, с плотной блестящей цитоплазмой; клетки располагаются разрозненно или в скоплениях. Ядро небольшого размера, округлое, хроматин распределен равномерно, мембрана четкая, ровная на всем протяжении.

Кроме клеточных вариаций на фоне доброкачественных неопухолевых заболеваний, при цитологическом исследовании можно обнаружить специфические инфекционные агенты (грибы, пневмоцисты, амёбы), изменения, характерные для конкретных патологических состояний (например, спирали Куршмана и кристаллы Шарко–Лейдена при бронхиальной астме, признаки гранулематозного воспаления при туберкулезе и саркоидозе).

## Глава 5. Клиническая цитология

### Злокачественные опухолевые поражения респираторного тракта

В легком могут развиваться первичные и метастатические опухоли. Подавляющее большинство составляют два подтипа немелкоклеточного рака: плоскоклеточная карцинома и аденокарцинома, реже встречаются мелкоклеточный рак, карциноидные и крупноклеточные опухоли. К редким опухолям легкого относится ряд различных гистологических вариантов злокачественных новообразований (саркоматоидные опухоли, плеоморфная карцинома, NUT-карцинома, новообразования по типу опухолей слюнных желез). Кроме того, в легком могут развиваться метастазы опухолей разных органов, диссеминирующие гематогенным путем.

**Плоскоклеточная карцинома.** Наиболее часто встречающаяся гистологическая форма среди опухолей легкого.

Клетки плоского эпителия с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, часто причудливой формы («клетки-головастики»), с плотной, часто веретенообразной цитоплазмой, имеющей четкие контуры; крупные гиперхромные ядра, расположенные центрально, иногда в части клеток могут просматриваться ядрышки. Клетки могут располагаться разрозненно, в пластах, синцитиоподобных скоплениях, в виде «жемчужин» и «булыжной мостовой».

При плоскоклеточной карциноме с орогованием — неравномерное орогование цитоплазмы, выраженный опухолевый диатез.

Опухоль классифицируется как плоскоклеточная при отсутствии четких морфологических признаков других опухолей и экспрессии характерных маркеров [положительная экспрессия p40, цитокератина 5/6 (CK5/6), K903, p63, отрицательная — цитокератин 7 (CK7), TTF-1].

**Аденокарцинома.** В материале присутствуют клетки с железистой дифференцировкой с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, большими эксцентрически расположенными ядрами неправильной формы, с неровным ядерным контуром, неравномерным распределением хроматина, в ядрах часто просматриваются ядрышки. Характерны структуры — железистоподобные, сосочкоподобные, шаровидные, палисадообразные, папилляроподобные, ацинарные, гнездные структуры из опухолевых железистых клеток. В структурах часто отмечается нагромождение клеток и напластование ядер. Цитоплазма опухолевых клеток зернистая или пенистая, с мелкими и крупными цитоплазматическими вакуолями, заполненными слизью.

Для аденокарциномы характерна положительная экспрессия CK7 и TTF-1.

**Нейроэндокринные опухоли (НЭО) легкого** — гетерогенная группа новообразований из нейроэндокринных клеток, которые подразделяются на подтипы: низкой степени злокачественности (типичный карциноид), средней степени злокачественности (атипичный карциноид), высокой степени злокачественности (мелкоклеточный рак и крупноклеточный нейроэндокринный рак). Одним из важных критериев высокой и низкой степени злокачественности является экспрессия маркера пролиферации Ki-67, однако морфологические особенности играют не менее важную роль.

**Мелкоклеточный рак.** Встречается в 15–20% случаев рака легкого, характеризуется высокой скоростью роста, ранним развитием метастазов. Обнаруживают мелкие мономорфные клетки различной формы с крупными гиперхромными ядрами и узким ободком цитоплазмы, ядрышки обычно не просматриваются; дегенеративные изменения клеток способствуют появлению скоплений «голых» полиморфных ядер в виде цепочек и тяжей. Характерно наличие «фасеток» — клетки в структурах подстраиваются друг к другу, образуя вдавления на соседних; реже образуют розеткоподобные, трабекулярные и иные структуры. Часто определяется «краш-феномен» за счет деформации опухолевых клеток и появления тяжелой ядерной субстанции.

Для мелкоклеточного рака легкого характерна положительная экспрессия нейроэндокринных маркеров (NSE, синаптофизин, CD56, хромогранин, TTF-1).

**Карциноидные опухоли.** Составляют около 1–2% случаев рака легкого, морфологически характеризуются высокой клеточностью. Клетки мономорфные, мелкие, чаще округлые или веретенообразные, ядра округлые или овальные, встречаются двухядерные клетки; хроматин с характерной мелкозернистой структурой в виде «соли и перца» (точечный, с мелкими глыбками), в цитоплазме сохранных клеток иногда просматриваются мелкие гранулы. Опухолевые клетки расположены преимущественно разрозненно, но могут встречаться рыхлые скопления, розеткоподобные и палисадообразные структуры, некроз отмечают редко. При ИЦХИ положительная реакция на Ki-67, NSE, S-100 протеин, хромогранин, синаптофизин.

**Метастатические опухолевые поражения.** Дифференцировать метастатические опухоли от первичных по цитологическим препаратам без использования вспомогательных тестов затруднительно, а чаще — невозможно. Например, большинство внелегочных аденокарцином имеют сходные цитологические признаки с первичной аденокарциномой легкого, отличить их друг от друга практически невозможно. Для эффективной диагностики метастатических опухолей цитологу необходимо учитывать клинико-анамнестические данные, результаты инструментальных и иных дополнительных исследований, в том числе ИЦХИ.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.2. Цитологические исследования при патологии органов пищеварительной системы

Пищеварительная система включает органы пищеварительного канала, органы, вырабатывающие пищеварительный секрет. Пищеварительный канал состоит из ротовой полости, глотки, пищевода, желудка, тонкого и толстого кишечника.

#### Полость рта

Слизистая оболочка полости рта покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием, на ее поверхности открываются протоки слюнных желез. На границе полости рта и глотки располагается лимфатическое плотное кольцо — скопление лимфоидной ткани, окружающее вход в дыхательные и пищеварительные пути.

В цитологической диагностике наиболее часто используют эксфолиативный материал, полученный с помощью цитощетки или смывов с полости рта; в случае необходимости выполняют ТАБ новообразований. Цитологически можно диагностировать воспалительные поражения, герпес, пузырчатку (ротовая полость часто является местом первоначальной диагностики пузырчатки), опухоли (плоскоклеточный рак, лимфомы).

#### Слюнные железы

Цитологическая диагностика опухолей слюнных желез (СЖ) выполняется в соответствии с Миланской классификацией 2017 г. и второго пересмотра 2023 г. Она состоит из шести диагностических категорий, включая категории «неопухолевые поражения» и «опухоли», которые подразделяются на доброкачественные опухоли и опухоли СЖ с неопределенным злокачественным потенциалом. ТАБ с последующим цитологическим исследованием широко признана в качестве эффективного теста первой линии в диагностике поражений СЖ, поскольку исключает потенциальные осложнения трепанобиопсии: повреждения лицевого нерва и контаминацию опухоли вдоль биопсийного следа.

Клеточный состав слюнных желез достаточно разнородный.

**Базальные клетки** — мелкие с округлыми ядрами, эухромной цитоплазмой. Иногда встречаются в тканевых фрагментах или в трехмерных клеточных структурах, располагаясь по периферии в виде частокола.

**Ацинарные клетки** — крупные с серозным или муцинозным цитоплазматическим содержимым и мелкими ядрами. В цитоплазме часто видны зимогенные (проферментные) гранулы. Важно найти протоковые клетки, связанные с ацинарными; если протоковые клетки отсутствуют, а обнаружены только ацинарные структуры, то нельзя исключить высокодифференцированный ацинарно-клеточный рак. **Протоковые клетки** обычно располагаются в виде маленьких структур типа пчелиных сот, ядра расположены центрально, цитоплазма гомогенная. **Миоэпителиальные клетки** могут быть плазмацитоидными или эпителиоидными с удлинённой цитоплазмой. Они аспирируются вместе с ацинарными клетками, могут прикрепляться к фрагментам протоковых клеток. Форма ядер варьирует от овальных к округлым, цитоплазма при окрашивании по Романовскому — розовая.

**Недиагностическая категория I.** Средний риск злокачественности составляет 25%. Недиагностический аспират СЖ — это аспират, непригодный для качественного и/или количественного анализа материала и предоставления информативного заключения. Определены следующие цитологические критерии этой категории: редкие или отсутствующие клетки, менее 60 измененных клеток в цитологическом мазке, плохо приготовленные мазки с артефактами, которые не позволяют оценить клеточный компонент, неопухолевые (нормальные) элементы СЖ в условиях клинически или рентгенологически определяемой опухоли; немучинозная жидкость из кисты без эпителиального компонента относится к подкатегории «недиагностическая, только кистозная жидкость». Исключения составляют любые аспираты с выраженной атипией в единичных клетках, которые относят к атипии неопределенного значения (Atypia of Undetermined Significance — AUS). Мучинозные кисты без клеток, присутствие большого количества элементов воспаления без эпителия следует интерпретировать как адекватный материал и относить ко II категории по Миланской классификации диагностики опухолей слюнных желез.

**Неопухолевая категория II.** Средний риск злокачественности аспиратов, примерно 10%. Обозначение «неопухолевый» предназначено для использования в сочетании с доступными клиническими и радиологическими данными и применяется для пунктов, в которых выявлены доброкачественные неопухолевые изменения, в том числе связанные с острым или хроническим воспалением, со структурными изменениями и инфекциями. К неопухолевым относятся сиалоадениты, сиалолитиаз, сиалоаденоз, онкоцитоз.



**Сиалоаденит** является наиболее распространенным неопухолевым поражением и может клинически имитировать новообразование из-за наличия отчетливой припухлости. Острый сиалоаденит обычно возникает в результате бактериальной инфекции. При остром сиалоадените редко назначается ТАБ из-за его типичной клинической картины. Цитологические критерии: обилие нейтрофилов, часто выявляются бактерии; гистиоциты (гнойная стадия), грануляционная ткань (поздние стадии). Хронический сиалоаденит может быть вызван причинами, которые приводят к обструкции слюнных протоков, чаще всего это сиалолитиаз, но в некоторых случаях может быть связан с системными причинами, такими как аутоиммунное заболевание. Цитологические критерии: мазки гипощеллюлярные, небольшие группы протоковых клеток могут быть базалоидными или метапластическими, отсутствие или скудное количество ацинарных клеток, элементы хронического воспаления (включая лимфоциты и ПК); встречаются фиброзные стромальные фрагменты.

## Глава 5. Клиническая цитология

Гранулематозный сиалоаденит СЖ встречается редко. Больные обычно жалуются на медленно растущую опухоль. Цитологические критерии: гипощеллюлярные (скудные ацинарные и протоковые клетки) мазки, рыхлые группы эпителиоидных гистиоцитов, разное количество клеток воспалительного инфильтрата, многоядерные гигантские клетки, лимфоциты, элементы некроза.

**Сиалолитиаз** — образование протоковых камней, часто ассоциируется с увеличением СЖ и болью, клинические симптомы могут имитировать новообразование. Сиалолитиаз встречается преимущественно в подчелюстной железе, реже — в околоушной железе и очень редко — в подъязычных железах. При компьютерной томографии точно обнаруживается локализация камней. Цитологические критерии: гипощеллюлярный аспират, скудные или отсутствующие ацинарные клетки, группы доброкачественных протоковых клеток и/или метапластических плоскоклеточных, реснитчатых или муцинозных клеток, воспалительный фон, муцин, кальцинаты.

**AUS, категория III.** Средний риск злокачественности тонкоигольных аспиратов, классифицируемых как AUS, составляет 20%. Диагностическая категория AUS применяется к аспиратам СЖ, у которых отсутствуют качественные или количественные цитоморфологические признаки, позволяющие достоверно диагностировать неопухолевые или опухолевые поражения. Категория AUS может быть использована в следующих случаях: реактивная и репаративная атипия, а также плоскоклеточные, онкоцитарные или другие метапластические изменения, недостаточные для определения опухоли, а также образцы с низкой клеточностью, клинически предполагающие наличие опухоли, но не позволяющие диагностировать ее, муцинозно-кистозные поражения с отсутствующим или очень скудным эпителиальным компонентом, ЛУ СЖ или лимфоидные поражения, которые являются подозрительными на наличие лимфопролиферативного заболевания.

**Доброкачественные опухоли слюнной железы, категория IVA.** Средний риск злокачественности аспиратов, классифицируемых как доброкачественные опухоли СЖ, составляет 5%. В основном доброкачественные новообразования возникают в околоушной СЖ. Плеоморфная аденома (ПА) у взрослых составляет около 50–70% опухолей СЖ. Опухоль Уортина является второй по распространенности доброкачественной опухолью.

**ПА** — смешанная опухоль, доброкачественное двухфазное новообразование, цитологически состоящее из различного количества эпителиальных клеток протоков, миоэпителиальных клеток и фибриллярного матрикса. Характерный хондромиксоидный матрикс в ПА лучше всего оценивается при окрашивании по Романовскому как ярко-пурпурный фибриллярный/перистый фон; в препаратах, окрашенных по Папаниколу, цвета от серого до полупрозрачного зеленого. Миоэпителиальные клетки имеют разнообразный вид и форму (многоугольные, плазмцитоподобные, округлые, веретенообразные и светлоклеточные), часто являются преобладающими в ПА. Эпителиальные клетки протоков в ПА имеют невыраженные ядерные особенности, располагаются небольшими группами, повторяющими структуры протоков. Цитограмма классической ПА имеет умеренную клеточность с легко идентифицируемым, обильным фибриллярным матриксом, наличием нежных протоковых эпителиальных и миоэпителиальных клеток.

**Опухоль Уортина** развивается на 7–9-м десятилетии жизни, при этом пациенты обычно курильщики. Опухоль рыхлая, безболезненная, размеры варьируют. Цитологические критерии опухоли Уортина представлены грязным белково-кистозным фоном, лимфоцитами и скоплениями онкоцитов. Онкоциты — эпителиальные клетки с обильной однородной гранулярной цитоплазмой с четко очерченными границами. Ядра в онкоцитах круглые, расположены в центре, с выступающим ядрышком. Фон препарата составляет смешанная популяция лимфоцитов, в которой преобладают мелкие зрелые клетки.

**Опухоли слюнной железы с неопределенным потенциалом злокачественности, категория IVB.** Средний риск злокачественности аспиратов, классифицируемых как категория IVB опухолей СЖ с неопределенным потенциалом злокачественности, составляет 35%. Категория используется в тех случаях, когда нельзя исключить высокодифференцированную злокачественную опухоль, включает три подкатегории: базалоидную опухоль, онкоцитарную/онкоцитоподобную опухоль, опухоль со светлоклеточными признаками. Категория опухоли СЖ с неопределенным потенциалом злокачественности с подкатегорией «базалоидная опухоль» применяется только в случае, когда невозможно поставить конкретный диагноз, при этом дифференциальный диагноз включает как доброкачественные, так и злокачественные опухоли.

**Базалоидные опухоли** характеризуются преобладающей популяцией клеток со скудной цитоплазмой, что придает им незрелую, «базалоидную», цитоморфологию. Цитограмма представлена мономорфной популяцией базалоидных клеток с минимальной ядерной атипией, связанных с фибриллярным матриксом. Митозы не определяются.

**Онкоцитарная/онкоцитоподобная опухоль** — клеточный аспират представлен пролиферирующими опухолевыми клетками с онкоцитарными признаками: умеренное количество зернистой цитоплазмы, округлые или овальные с отчетливыми ядрышками ядра, расположенные эксцентрически. Онкоцитарные опухолевые клетки лишены таких

качественных клеточных характеристик, как выраженная ядерная атипия, высокая митотическая активность и некроз. Проллиферирующие опухолевые клетки с онкоцитарными признаками расположены в рыхлых группах.

**Опухоль со светлоклеточными признаками.** В аспирате присутствует пролиферирующий эпителиальный компонент, но отсутствуют характерные признаки конкретной опухоли. Опухолевые клетки светлые, с прозрачной, пенистой, зернистой или вакуолизированной цитоплазмой или любая их комбинация, при этом особенности, характерные для истинных онкоцитов, не визуализируются. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в опухолевых клетках — от низкого до среднего. Отсутствуют такие признаки, как некроз, выраженная ядерная атипия, митотическая активность, то есть цитологическая картина светлоклеточной опухоли без выраженных признаков злокачественности. Дифференциальный диагноз включает ПА и миоэпителиому, однако не исключается эпителиально-миоэпителиальная карцинома (ЭМК).

## Глава 5. Клиническая цитология

**Подозрение на злокачественную опухоль, категория V.** Средний риск злокачественности при подозрении на злокачественную опухоль составляет 60%. Цитологическая картина ТАБ СЖ классифицируется как подозрение на злокачественную опухоль, когда присутствуют не все критерии для конкретного диагноза злокачественной опухоли и все же общие цитологические признаки указывают на злокачественность. При отнесении аспирата из СЖ к V категории цитограмму следует описать как подозрительную на первичную злокачественную опухоль или подозрительную на метастаз или лимфому. Значительная часть случаев подозрений на злокачественную опухоль СЖ приходится на злокачественные опухоли высокой степени дифференцировки. Чаще всего цитологическое заключение о подозрении на злокачественную опухоль связано со скудными мазками низкого качества.

**Злокачественная опухоль, категория VI.** Средний риск злокачественности аспиратов, установленных цитологически как злокачественная опухоль, составляет 90%. Аспираты СЖ, классифицируемые как злокачественные, содержат комбинацию цитоморфологических признаков, которые сами по себе либо в сочетании с дополнительными исследованиями характерны для злокачественной опухоли. К высокодифференцированным карциномам (низкой степени злокачественности) относят ацинарно-клеточную карциному (АКК), секреторную карциному (СК) и ЭМК. **АКК** составляет примерно 10–15% злокачественных новообразований эпителия СЖ и является второй по распространенности злокачественной опухолью после мукоэпидермоидной карциномы. В детской возрастной группе она составляет около трети карцином СЖ. АКК чаще встречается у женщин, отмечен широкий возрастной диапазон; средний возраст постановки диагноза — 50 лет. Большинство АКК представляют собой подвижные, мягкие или твердые, четко очерченные образования размером 1–4 см. Опухоли обычно бессимптомные и медленно растущие; боль, фиксация к окружающим тканям и поражение лицевого нерва считаются плохими прогностическими признаками и могут указывать на высокую степень злокачественной трансформации. АКК может метастазировать в шейные ЛУ, а местные рецидивы опухоли могут наблюдаться в 35%. Цитологически в мазках при АКК наблюдается монотонная популяция эпителиальных клеток, имеющих полигональную форму, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, обильную, базофильную, вакуолизированную цитоплазму. В цитоплазме могут быть гранулы; опухолевые клетки расположены в основном разрозненно либо в рыхлых скоплениях также вокруг капилляров. Ядра опухолевых клеток имеют округлую форму и содержат ядрышко, ядерный полиморфизм не выражен. Фон препарата чистый или пенистый, обнаруживаются голые ядра, лимфоциты, редко — псаммомные тельца.

**СК** является аналогом СК МЖ, представляет собой недавно описанную опухоль СЖ низкой степени злокачественности, выделенную как отдельный гистологический вариант в Классификации ВОЗ 2017 г. опухолей СЖ. Подобно секреторному раку МЖ, СК экспрессирует белок S100, маммаглобин, виментин и несет в себе транслокацию t(12;15) (p13;q25), которая приводит к слиянию генов *ETV6-NTRK3*. Опухоль чаще всего обнаруживается в околоушной железе, за ней следуют малые СЖ и подчелюстная железа. Большинство опухолей возникают у взрослых и имеют равное гендерное распределение; возраст пациентов — от 14 до 78 лет. Размер опухоли — от 1 до 4 см. СК характеризуется вялым течением, умеренным риском местного рецидива (15%), метастазами в ЛУ (20%) и низким риском отдаленных метастазов (5%). Цитологически мазки представлены опухолевыми клетками, расположенными разрозненно либо в тубулярных, фолликулярных или папиллярных скоплениях. Опухолевые клетки имеют кубическую, полигональную форму с низким ядерно-цитоплазматическим отношением, обильной вакуолизированной эозинофильной цитоплазмой и отсутствием гранул. Ядра мономорфные, округлые, с ровными контурами, тонким хроматином, четким ядрышком, локализуются эксцентрически.

**ЭМК** — редкое злокачественное новообразование низкой степени злокачественности. На его долю приходится менее 5% злокачественных новообразований СЖ. Примерно 75% ЭМК возникает в околоушной СЖ. ЭМК — это заболевание пожилых людей 6–7-го десятилетия, не имеющее гендерной предрасположенности. Пациенты обычно имеют локализованное медленно растущее образование. ЭМК — двухфазная опухоль, имеющая характерное морфологическое строение с внутренним слоем кубических протоковых клеток и внешним слоем более крупных прозрачных миоэпителиальных клеток. Опухолевые клетки расположены в псевдопапиллярных группах, пластах. Обнаруживаются голые ядра стромальных клеток. Преобладает популяция светлых миоэпителиальных клеток. Менее выражена популяция протоковых клеток со скудной цитоплазмой. Наличие в ЭМК двух компонентов может быть доказано с использованием ИЦХИ с применением цитокератинов 8/18, которые экспрессируют эпителиальные протоковые клетки, и маркеров, таких как p63, гладкомышечный актин, калпонин, которые экспрессируют миоэпителиальные клетки.

К низкодифференцированным карциномам (высокой степени злокачественности) относят протоковую, лимфоэпителиальную, мелкоклеточную нейроэндокринную, мукоэпидермоидную карциному.

**Протоковая карцинома СЖ** — злокачественная опухоль СЖ высокой степени злокачественности, первоначально описанная как опухоль, аналогичная протоковой карциноме МЖ. Протоковая карцинома СЖ может возникать *de novo*,

но в 50% случаев представляет собой злокачественную трансформацию существующей ПА (карцинома на фоне ПА). Протоковая карцинома СЖ составляет примерно 10% злокачественных опухолей СЖ, встречается у пожилых людей с пиком заболеваемости на 7-м десятилетии, и гораздо чаще у мужчин. Околоушная железа является наиболее частой локализацией протоковой карциномы СЖ (80%). Протоковая карцинома СЖ представляет собой быстрорастущую опухоль, часто с симптомами поражения нервов. Опухоли обычно большие и имеют инфильтративный характер роста с очагами некроза. Цитологически опухоль представлена пластами, объемными и крибриформными скоплениями опухолевых клеток с выраженными признаками злокачественности. Опухолевые клетки имеют размеры от средних до крупных, полигональную форму, хорошо определяемые границы, обильную эозинофильную цитоплазму. Ядра опухолевых клеток увеличенные, округлой либо овальной формы с выраженным полиморфизмом, гиперхромией и хорошо определяемыми ядрышками. Могут выявляться митозы. Фон может быть некротическим, имеются увеличенные голые ядра.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Лимфоэпителиальная карцинома** (недифференцированная карцинома, сопровождающаяся неопухоловой лимфоплазмочитарной стромой). Это редкая опухоль СЖ, составляющая менее 1% случаев рака СЖ. Характерна для Арктического региона, Южного Китая и Японии. Опухоли в эндемичных популяциях демонстрируют более высокую частоту поражения околоушных желез, у женщин встречаются несколько чаще и почти в 100% случаев связаны с ВЭБ. У пациентов обычно наблюдается увеличение околоушной или подчелюстной железы с сопутствующей шейной лимфаденопатией. Опухоли обычно имеют размер от 1 до 10 см и часто инфильтрируют окружающую паренхиму. Цитологически в мазках обнаруживаются синцитиальные комплексы полигональных или веретеновидных клеток со скудной цитоплазмой. Опухолевые клетки содержат полиморфные ядра с ядрышками. Фон препарата составляют лимфоциты и ПК, которые определяются в большом количестве.

**Мелкоклеточная нейроэндокринная карцинома** — редкое заболевание, имеющее морфологическое сходство со своими гораздо более распространенными аналогами в легких и коже (карцинома из клеток Меркеля). Средний возраст пациентов на момент обращения составляет 5–6-е десятилетие. Мелкоклеточная нейроэндокринная карцинома может поражать как большие, так и малые СЖ, но околоушная железа является преимущественным местом поражения. У пациентов обычно диагностируют быстрорастущую опухоль с сопутствующей шейной лимфаденопатией и симптомами поражения лицевого нерва. Мелкоклеточные нейроэндокринные карциномы представляют собой плохо очерченные опухоли, которые обычно имеют большие размеры (2–5 см) и плохой долгосрочный прогноз. В цитологических мазках опухолевые клетки небольших размеров со скудной цитоплазмой расположены разрозненно или мелкими скоплениями. Опухолевые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, с овальными гиперхромными ядрами и незаметными ядрышками. Встречаются слепки ядер. Обнаруживаются митозы, некроз, апоптотические тела. В мазках наблюдаются краш-феномен и «дорожки» из слепленных ядер. «Дедифференцировка» определяется как трансформация высокодифференцированной опухоли (низкой степени злокачественности) в злокачественное низкодифференцированное новообразование (высокой степени злокачественности), в котором отсутствуют отчетливые гистологические характеристики исходного новообразования. Это явление было описано для АКК, аденокистозной карциномы, ЭМК, полиморфной аденокарциномы, миоэпителиальной карциномы и СК. Первичные карциномы слюнных желез с высокой степенью трансформации протекают особенно агрессивно.

К карциномам с неопределенной или различной степенью злокачественности относят мукоэпидермоидную, аденокистозную, миоэпителиальную карциномы, карциному на фоне ПА.

**Мукоэпидермоидная карцинома** — наиболее частая первичная злокачественная опухоль СЖ как у взрослых, так и у детей с пиком заболеваемости во 2-м десятилетии жизни. Чаще всего мукоэпидермоидные карциномы возникают в околоушной железе, за ней следуют малые СЖ, особенно при локализации в нёбе. Клеточность цитологических мазков вариабельна и зависит от степени дифференцировки опухоли. Цитограмма представлена муцинозными (бокаловидными клетками), промежуточными и эпидермоидными клетками. В опухолях с низкой степенью злокачественности преобладают муцинозные клетки, а в опухолях с высокой степенью злокачественности — эпидермоидные. Клеточная атипия более выражена в опухолях с высокой злокачественностью. В цитограмме отмечается вариабельное присутствие онкоцитов, светлых и столбчатых клеток. Кистозный фон представлен обильным экстрацеллюлярным муцином. Лимфоциты присутствуют примерно в 20% случаев.

**Аденокистозная карцинома** — это первичная злокачественная опухоль СЖ, которая составляет менее 10% опухолей СЖ, с пиком заболеваемости в 4–6-м десятилетиях жизни. Аденокистозная карцинома относится к злокачественной базалоидной опухоли, состоящей из эпителиальных и миоэпителиальных клеток. Это заболевание взрослого населения, пик заболеваемости приходится на возраст 40–60 лет при незначительном преобладании женщин. Обычно аденокистозная карцинома представляет собой медленно растущую плотную опухоль, которая может быть ограничена или без четкой границы. Учитывая склонность опухоли к поражению нервов, больные часто жалуются на паралич лицевого нерва или боль. Аденокистозные карциномы характеризуются длительным клиническим течением с медленным прогрессированием, множественными рецидивами и поздними метастазами. Цитограмма при аденокистозной карциноме характеризуется вариабельной клеточностью. В цитологических мазках обнаруживаются плотные группы базалоидных клеток, расположенных в небольших синцитиальных пластах с неровными краями, иногда с микрокистозными пространствами, со скоплениями, с «цилиндрами» и каналцами. Однородные мелкие базалоидные опухолевые клетки с высоким ядерно-цитологическим соотношением. Опухолевые клетки имеют скудную нечеткую цитоплазму, гладкие, овальные или угловатые гиперхромные ядра с нечеткими ядрышками. Митозы и некрозы редки при отсутствии трансформации. Бесклеточный однородный матрикс с четкими границами, который лучше всего визуализируется при окрашивании по Романовскому (пурпурный цвет): матрикс

полупрозрачный и, следовательно, плохо визуализируется в мазках, окрашенных по Папаниколау, и может отсутствовать или быть редким в со`лидном варианте.

**Миоэпителиальная карцинома** — злокачественный аналог миоэпителиомы, встречается редко и составляет менее 1% карцином СЖ. Нет никаких возрастных или гендерных отличий. Большинство миоэпителиальных карцином образуются в околоушной железе, где они могут возникать *de novo* или как компонент карциномы из ПА. Опухолевые клетки в цитологических мазках при наличии миоэпителиальной карциномы располагаются одиночно, небольшими скоплениями, пластами и плотными группами. Метахроматический стромальный материал представлен в виде небольших глобул, полос и сфер. В опухолевых клетках наблюдается варибельная ядерная атипия (полиморфизм, ядрышки, митозы, гиперхромия). Опухолевые клетки разнообразны и могут иметь плазмоцитойдную, веретенообразную, светлоклеточную или эпителиоидную морфологию. В ядрах опухолевых клеток встречаются внутриядерные псевдовключения. Опухолевые клетки содержат умеренное количество богатой гликогеном цитоплазмы.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Карцинома из предсуществующей ПА** составляет 3,6% опухолей СЖ и около 12% злокачественных новообразований СЖ. Обычно карцинома из ПА возникает в период с 6-го по 7-е десятилетие, примерно на 10 лет позже, чем ПА, и немного чаще у женщин. Большинство карцином из ПА встречаются в околоушной железе. Пациенты обычно обращаются с давно существующим узлом и отмечают недавний быстрый рост. Чаще всего карциномы из ПА представляют собой карциномы высокой степени злокачественности, поэтому у пациентов может наблюдаться паралич лицевого нерва или опухолевое поражение кожи. Цитологически на фоне ПА обычно встречаются элементы протоковой карциномы СЖ.

### Пищевод

Слизистая оболочка пищевода представлена многослойным плоским эпителием. Любые ее повреждения, особенно изъязвления, вызывают реактивные (репаративные) изменения эпителия, характеризуются наличием в цитологических препаратах рыхлых однослойных структур из клеток с мономорфными укрупненными ядрами, равномерно распределенным сглаженным хроматином, ровным контуром ядерной мембраны, мономорфными одиночными ядрышками, наличием элементов воспаления.

**Кандидоз** с поражением грибами рода *Candida* является самой частой причиной инфекционного эзофагита. В этом случае на слизистой оболочке пищевода появляется характерная белая пленка. В цитологических мазках обнаруживают почкующиеся дрожжевые клетки округлой или вытянутой формы и толстые двухконтурные нити псевдомицелия, которые, в отличие от истинного мицелия, представляют собой вытянутые дрожжевые клетки.

**Вирус простого герпеса** часто поражает пищевод. При эзофагоскопии на слизистой оболочке обнаруживают язвы, имеющие характерный «штампованный» вид. Цитопатический эффект герпесвирусной инфекции проявляется появлением крупных клеток с укрупненными ядрами, четким утолщенным контуром ядерной мембраны и характерной гомогенной, размытой (в виде «матовых часовых стекол») структурой хроматина. Цитоплазма плотная, блестящая. Появляются многоядерные клетки, в которых ядра как бы приспосабливаются друг к другу, образуя вдавления в близлежащих ядрах.

### Предопухолевые заболевания пищевода

**Пищевод Барретта** — поражение пищевода, при котором происходит замещение нормального плоского эпителия железистым на участке, расположенном выше желудочно-пищеводного соединения. Это защитная реакция слизистой оболочки пищевода, которая развивается как осложнение у пациентов с хроническим желудочно-пищеводным рефлюксом. При этом нормальный многослойный плоский эпителий дистального отдела пищевода, устойчивый к механическим воздействиям, замещается на цилиндрический эпителий желудка, который, в свою очередь, устойчив к химическому воздействию желудочного содержимого. Именно эпителий кишечного типа обладает наибольшим злокачественным потенциалом. Причиной подавляющего большинства аденокарцином пищевода (более 90%) является пищевод Барретта. Цитологическая диагностика при пищеводе Барретта включает идентификацию бокаловидных клеток (проявление кишечной метаплазии), исключение дисплазии (атипической гиперплазии) и злокачественного новообразования. Бокаловидные клетки имеют эксцентрически расположенное ядро, обильную, бледную, пенистую, несколько выпуклую (из-за большого количества муцина) цитоплазму. По форме напоминают бокал, суженный у основания, широкий и округлый в верхней части. Располагаются в группах среди призматического эпителия, иногда разрозненно.

### Опухоли пищевода

**Плоскоклеточный рак** — наиболее распространенная злокачественная опухоль пищевода.

**Плоскоклеточный рак с ороговением (высокодифференцированный)**. В цитологических препаратах выражен клеточный и ядерный полиморфизм. Размеры клеток варьируют от мелких до гигантских. Форма клеток разнообразна — от округлых до причудливых в виде «ракетки», «головастика», «ленты», «змеи». Ядра гиперхромные, разных размеров, округлой, овальной, треугольной, неправильной, причудливой, палочковидной формы. Структура хроматина неравномерная, крупноглыбчатая, ядрышки чаще едва заметны или не видны. Цитоплазма клеток — гомогенная, непрозрачная, уплотненная («стекловидная»), четко контурирована, ярко окрашена (за счет накопления кератогиалина). Располагаются преимущественно разрозненно; могут встречаться структуры в виде «жемчужин», «булыжной мостовой». Опухолевый диатез резко выражен, фон мазка, как правило, некротический, зернистый.

**Плоскоклеточный рак без ороговения (низкодифференцированный)**. При плоскоклеточном раке без ороговения комплексы образуются чаще, чем при плоскоклеточном раке с ороговением. Характерны многослойные структуры неопределенной формы, состоящие из полиморфных округлых и полигональных клеток с центрально расположенными ядрами, неровным контуром ядерной мембраны, относительно четко контурированной цитоплазмой,

а также присутствие «вытянутых» ядер по периферии структур. Ядра клеток имеют более различимую, чем при плоскоклеточном раке с ороговением, неравномерную, грубую, крупноглыбчатую структуру хроматина; крупные полиморфные ядрышки. Цитоплазма менее плотная и менее четко контурирована, чем при плоскоклеточном раке с ороговением, однако более плотная по сравнению с аденокарциномой. Пикнотичные гиперхромные ядра нехарактерны для плоскоклеточного рака без ороговения. Опухолевый диатез по сравнению с плоскоклеточным раком с ороговением выражен не так резко.

При ИЦХИ для плоскоклеточного рака характерно отсутствие экспрессии СК7 и СК20, в отличие от аденокарциномы, где типична положительная реакция на СК7, а экспрессия СК20 вариабельна. Как правило, при плоскоклеточном раке отмечается положительная экспрессия высокомолекулярных цитокератинов 34E12(СК903) и СК5/6 (цитоплазмальная реакция), а также p63 (ядерная).

**Аденокарцинома** чаще всего располагается в средней или дистальной части пищевода и, вероятнее всего, возникает из метаплазированного эпителия кишечного типа пищевода Барретта. В цитологических препаратах клеточный состав обильный; присутствуют железистоподобные, папиллярные, палисадообразные, розеткоподобные структуры с беспорядочным нагромождением клеток, потерей полярности расположения клеток в структурах, разным расстоянием между клетками, расположением клеток в виде «перьев» по периферии структур. В клетках отмечается клеточный и ядерный полиморфизм. Клетки разного размера и формы, ядра гиперхромные вытянутой, сигарообразной формы с неровным контуром ядерной мембраны, грубым, неравномерно распределенным хроматином, полиморфными ядрышками. Цитоплазма с вакуолями разного размера (может быть как обильная, так и скудная). Встречаются полиморфные «голые» ядра неправильной формы. Выражен опухолевый диатез.

## Глава 5. Клиническая цитология

Для аденокарциномы пищевода при ИЦХИ характерна положительная экспрессия цитокератина СК7; экспрессия СК20 может быть вариабельна; примерно в 50% случаев экспрессируется CDX2.

### Желудок

**Покровно-ямочный эпителий** покрывает слизистую оболочку желудка, это однослойный призматический железистый эпителий, который обладает свойством выделять мукоидный секрет (слизь). Покровно-ямочный эпителий полностью обновляется в течение 3 сут. В цитологических мазках, полученных при браш-биопсии, представлен крупными плотными однослойными группами, пластами, соотоподобными структурами с четкими внешними границами.

Межклеточные связи в группах сохранены, поэтому полярность расположения клеток не нарушена. Клетки находятся на одинаковом расстоянии, практически не наслаиваются друг на друга; границы клеток определяются четко. Ядра мелкие, округлые или слегка овальные, окрашены бледно. Хроматин мелкозернистый, ядрышки обычно не просматриваются. Цитоплазма имеет зернистый или пенистый вид. По краям структур призматическая форма клеток может быть более заметна, поскольку они могут располагаться в виде частокола с базальным расположением ядер.

**Главные клетки** располагаются преимущественно в области дна и тела фундальных желез желудка, не имеют четких границ. Ядра этих клеток округлой формы, расположены центрально. В цитоплазме содержатся базофильные секреторные гранулы диаметром 0,9–1 мкм. Главные клетки секретируют пепсиноген — профермент, который в присутствии соляной кислоты превращается в активную форму — пепсин.

**Обкладочные (париетальные) клетки** сосредоточены главным образом в области тела и шейки железы. Они крупнее главных, неправильной округлой формы, с центрально расположенными ядрами, обильной оксифильной цитоплазмой. Париетальные клетки вырабатывают соляную кислоту.

**Добавочные (слизистые клетки)** располагаются в теле и шейке железы, имеют относительно небольшие размеры, призматическую форму, уплотненное ядро, смещенное в базальную часть, светлую цитоплазму со множеством секреторных гранул.

**Эндокринные клетки** находятся в небольшом количестве среди эпителиальных клеток желез желудка.

### Доброкачественные неопухолевые заболевания

**Воспалительные заболевания желудка** (гастрит, язвенная болезнь) связаны с жизнедеятельностью микроорганизма *Helicobacter pylori*, хотя у 90% носителей *H. pylori* симптомы заболевания отсутствуют.

Воспаление слизистой оболочки после прикрепления *H. pylori* к клеткам желудочного эпителия развивается за счет выделения микроорганизмом растворимого белка, активирующего нейтрофилы. Морфологически такое воспаление сопровождается инфильтрацией слизистой оболочки нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами, макрофагами, ПК; формированием не свойственных желудку лимфоидных фолликулов, повреждением эпителия. Эндотоксин VacA, вырабатываемый *H. pylori*, вызывает гибель клеток эпителия желудка, а ферменты муциназа, протеаза и липаза растворяют защитный слой слизи. В результате соляная кислота и пепсин получают доступ к «оголенной» слизистой, вызывая химический ожог, воспаление и изъязвление. На фоне инфицирования *H. pylori* может развиваться кишечная метаплазия, дисплазия эпителия желудка. Установлена взаимосвязь *H. pylori* с аденокарциномой и экстранодальной лимфомой маргинальной зоны, ассоциированной с лимфоидной тканью (MALT). В цитологических и гистологических препаратах *H. pylori* — изогнутые в виде «летающих чаек» палочки длиной 1–3 мкм. Чувствительность цитологического метода в диагностике *H. pylori* — 80–90%, специфичность — 100%.

**Гастрит** — термин, используемый для обозначения воспалительных и воспалительно-дистрофических изменений слизистой оболочки желудка. **Язвенная болезнь** — локальный дефект слизистой оболочки желудка (иногда с захватом подслизистого слоя), вызывающий на этом участке трофические нарушения. Эти заболевания имеют сходную цитологическую картину: присутствуют нейтрофилы, гистиоциты, лимфоциты, слизь, нити фибрина, грануляционная ткань (сосуды, фибробласты). Эпителий может быть с реактивными, дегенеративными, репаративными изменениями, кишечной метаплазией. Часто встречаются элементы гриба рода *Candida*.

**Гиперпластический полип** представляет собой разрастание клеток покровно-ямочного эпителия желудка и не является истинной опухолью. На поверхности полипа имеются глубокие крипты, выстланные зрелым, очень высоким призматическим покровно-ямочным эпителием. Как правило, в окружающей ткани имеются признаки хронического гастрита, с которым связывают развитие гиперпластического полипа. В силу законченной морфологической дифференцировки клетки гиперпластического полипа практически не трансформируются в рак. Гиперпластический полип не имеет отличительных цитологических признаков от гиперплазии покровно-ямочного эпителия, поэтому цитологический диагноз может быть установлен в предположительной форме при условии, если материал получен с поверхности «плюс ткани». Основная задача цитологического исследования — не столько дать заключение о гиперпластическом полипе, сколько исключить аденому. При гиперпластическом полипе клетки покровно-ямочного эпителия располагаются в обширных, «стекающихся» структурах, напоминающих чешую змеи. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в клетках не нарушено, хроматин распределен равномерно. Часть желез гиперпластического полипа может быть кистозно расширена, поэтому встречается уплощенный эпителий — клетки полигональной формы с четкими межклеточными границами и сохраненным ядерно-цитоплазматическим соотношением. Постоянно травмирующаяся поверхность полипа часто изъязвляется, поэтому в препаратах нередко присутствуют элементы воспаления.

## Глава 5. Клиническая цитология

### Эпителиальные опухоли

**Аденома** — доброкачественная опухоль желудка, представляющая собой тубулярные, папиллярные или тубулопапиллярные разрастания железистого эпителия с различной степенью клеточной атипии и высоким риском злокачественной трансформации в аденокарциному. Аденома и дисплазия (атипическая гиперплазия) железистого эпителия имеют сходные морфологические характеристики, поэтому уверенная цитологическая верификация аденомы невозможна. Предположительный диагноз аденомы устанавливается, если материал взят из участка «плюс ткани»; если же эпителий с признаками атипической гиперплазии был получен с плоской, ровной поверхности слизистой, дается заключение о дисплазии. Для аденомы характерны клетки, напоминающие кишечный эпителий, — призматической формы с гиперхромными, вытянутыми, овальными ядрами без видимых ядрышек. Ядра разной степени зрелости. Клетки расположены в плотных структурах. Могут встречаться структуры с веерообразным расположением клеток, а также напоминающие кишечную метаплазию, но с более гиперхромными ядрами и базофильной цитоплазмой. Для тубулярной аденомы характерно наличие структур в виде «трубочек» с ориентацией ядер по периферии. Цитоморфологическая картина аденомы зависит от степени выраженности клеточной атипии. Аденому с атипической гиперплазией по типу тяжелой дисплазии трудно отличить от высокодифференцированной аденокарциномы.

**Аденокарцинома** — злокачественная опухоль из клеток железистого эпителия, составляет от 90 до 95% новообразований желудка. К факторам риска развития рака желудка относятся хронический атрофический гастрит, кишечная метаплазия. Существенную роль играют генетическая предрасположенность, инфицирование *Helicobacter pylori*, характер питания. Гастроскопия позволяет визуализировать патологический очаг и получить материал для морфологического исследования.

Цитоморфологические признаки аденокарциномы желудка похожи на цитологическую картину аденокарциномы пищевода. Клеточный состав, как правило, обильный. Встречаются железистоподобные, папиллярные структуры из клеток с выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом. Ядра полиморфные, гиперхромные с неровным контуром ядерной мембраны, грубым, неравномерно распределенным хроматином, крупными ядрышками. Цитоплазма разных размеров, может быть вакуолизированной либо зернистой. Значительное число разрозненно расположенных клеток разной формы и размеров, много «голых» ядер с атипией. Выражен опухолевый диатез.

### Неэпителиальные опухоли

**Гастроинтестинальная стромальная опухоль** (Gastrointestinal Stromal Tumor — GIST) — группа мезенхимальных опухолей ЖКТ, развитие которых связано с мутацией *c-kit* и/или *PDGFRα*-генов. GIST составляет менее 3% злокачественных новообразований ЖКТ, однако это наиболее распространенная неэпителиальная опухоль пищеварительного канала. Чаще всего поражаются желудок и двенадцатиперстная кишка. GIST развивается из предшественников клеток Кахаля (*c-kit*-положительных клеток, координирующих автономную перистальтику ЖКТ). Установить диагноз GIST, используя лишь цитоморфологические критерии, не представляется возможным, поэтому до развития методов молекулярной диагностики эта патология принималась за ряд других морфологически сходных неэпителиальных опухолей (лейомиому, лейомиосаркому, нейрофибром). Как правило, GIST располагается субмукозно или интрамурально, поэтому методом выбора получения материала при эндоскопии является ТАБ.

В зависимости от гистологического строения выделяют шесть типов GIST: веретенноклеточный, эпителиоидный, плеоморфный, перстневидно-клеточный, мезотелиомоподобный и онкоцитарный. Наиболее часто встречаются веретенноклеточный (70%) и эпителиоидный (20%) варианты.

Цитоморфологические критерии GIST зависят от типа опухоли. Клеточный состав, как правило, обильный. Клетки располагаются разрозненно, в виде рыхлых скоплений, синцитиоподобных, палисадообразных структур. Ядра вытянутые, сигарообразные с тупыми концами, мелкозернистым хроматином. Цитоплазма светлая, вытянутой формы. Значительное число «голых» овальных ядер. При эпителиоидном типе встречаются полигональные клетки с округлыми ядрами, мелкозернистым хроматином.

При установлении диагноза GIST решающее значение имеет выявление мутации генов и иммунофенотип опухоли: экспрессия тирозинкиназного рецептора *c-kit* (CD117), DOG-1, CD34.

**Злокачественная неходжкинская лимфома (MALT-лимфома)** — первичная злокачественная неходжкинская лимфома, ассоциированная со слизистыми оболочками, составляет 5% злокачественных опухолей желудка, занимает второе место по частоте возникновения после аденокарциномы и является самой часто встречающейся экстранодальной лимфомой. MALT-лимфома чаще встречается в желудке, но может поражать любой участок, где есть слизистая оболочка. Имеет низкий злокачественный потенциал, часто дает ответ на антибактериальную терапию. В цитологических препаратах для MALT-лимфомы характерна лимфоидная инфильтрация из клеток среднего и мелкого размера с атипией, расположенных исключительно разрозненно, без образования клеточных структур. Цитоплазма клеток узким ободком окружает ядро.

Окончательный диагноз MALT-лимфомы устанавливается с помощью дополнительных методов исследования — ИЦХИ и проточной цитометрии. Большинство MALT-лимфом являются злокачественными В-клеточными лимфомами маргинальной зоны и имеют иммунофенотип с экспрессией ассоциированных с В-лимфоцитами антигенов CD19, CD20, CD22, CD79a.

## Глава 5. Клиническая цитология

### Кишечник

Ворсинки слизистой оболочки **тонкого отдела кишечника** выстланы однослойным цилиндрическим каемчатым эпителием. В его состав входят каемчатые, бокаловидные, эндокринные клетки. Собственная пластинка слизистой тонкой кишки состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой много ретикулярных волокон, лимфоидных фолликулов, сосудистых сплетений. Здесь же находятся крипты (трубчатые углубления эпителия). В клеточный состав крипт входят столбчатые, бокаловидные, камбиальные, эндокринные клетки, клетки Панета (продуцируют лизоцим).

**Толстый отдел кишечника** имеет много складок и крипт слизистой оболочки и не имеет ворсинок. В ободочной кишке поверхность крипт выстилает однослойный каемчатый эпителий; в столбчатой зоне прямой кишки — многослойный кубический, в промежуточной зоне — многослойный плоский неороговевающий, в кожной зоне — многослойный плоский ороговевающий эпителий. Собственная пластинка слизистой имеет строение, аналогичное тонкому кишечнику, но очень глубокие крипты. Их состав отличается большим количеством бокаловидных клеток, малым числом клеток Панета; в эпителии много лимфоцитов.

### Колоректальный рак

Колоректальный рак — общее название опухолей толстого кишечника и прямой кишки. Получение материала для цитологического исследования при колоноскопии с помощью промывных вод применяется редко, в основном в тех случаях, когда патологический процесс в кишечной стенке резко деформирует и обтурирует просвет кишки. В мазках из осадка промывных вод можно обнаружить опухолевые клетки. Однако применение щеточек при взятии материала для цитологического исследования более целесообразно, так как этим методом можно приготовить два-три мазка с большой концентрацией клеток.

Цитологическая картина реактивных изменений, аденомы, аденокарциномы, плоскоклеточного рака кишечника сходны с их аналогами в желудке.

### Поджелудочная железа

ТАБ с последующим цитологическим исследованием — один из важных методов диагностики при солидных и кистозных поражениях ПЖ. При этом методе исследования практически не бывает серьезных осложнений. Во время эндоскопического и ультразвукового обследования иглу продвигают через желудок или двенадцатиперстную кишку в ткань ПЖ под контролем ультразвукового изображения в реальном времени. Как только она оказывается в зоне поражения, зонд извлекают и проводят аспирацию с помощью шприца. При ТАБ ПЖ во время проведения эндоУЗИ для повышения эффективности цитологического исследования используют метод ROSE.

**Система терминологии и классификации панкреатобилиарной цитологии под редакцией ВОЗ** опубликована в 2022 г. — совместный проект ВОЗ, Международного агентства по изучению рака и Международной академии цитологии. В данной системе используется актуальная гистологическая терминология, приводятся риски злокачественности, тактика дальнейшего обследования, рекомендации по иммуноморфологическим и молекулярно-генетическим методикам.

**Категория 1. Недостаточный/неадекватный/недиагностический материал.** Образец по количественным или качественным параметрам не позволяет диагностировать пунктируемое образование. В мазках обнаруживается нормальный эпителий ПЖ при данных визуализационных методов за наличие образования — недиагностический материал. Возможно использование категории 2 с примечанием о несоответствии цитологии и данных визуализации. Риск злокачественного новообразования — 5–25%. Рекомендуется повторить ТАБ.

**Категория 2. Отсутствие признаков злокачественности.** Включает как неопухолевые процессы, так и доброкачественные опухоли. Однозначно трактуемые характеристики доброкачественных поражений: неопухолевые процессы (панкреатит), доброкачественные опухоли (серозная цистаденома, лимфангиома, шваннома), нормальный эпителий ПЖ при отсутствии четко визуализируемого образования. Предполагаемый риск злокачественного новообразования — 0–15%. Коррелирует с клиническими данными. В цитологических мазках определяются клетки паренхимы ПЖ (включая ацинарные, эндокринные и протоковые), эпителий ЖКТ.

**Нормальные ацинарные клетки ПЖ.** Обычно расположены в небольших округлых группах (ацинусах) с просветом в центре; могут встречаться единичные разрозненно лежащие клетки, иногда фрагменты ткани, прикрепленные к фиброваскулярной строме. Ацинарные клетки имеют обильную зернистую цитоплазму, нечеткие границы, небольшое, эксцентрически расположенное округлое ядро с равномерно распределенным, мелкозернистым хроматином и практически незаметным, слабо визуализирующимся ядрышком.

**Клетки эпителия выводных протоков** имеют кубическую или цилиндрическую форму, округло-овальные ядра, равномерно распределенный мелкозернистый хроматин, четко определяющиеся границы немучинозной цитоплазмы, слабоазметные ядрышки. Клетки располагаются равномерно в однослойных соотоподобных структурах. Часть цилиндрических клеток протокового эпителия образует палисадообразные структуры с базально расположенными ядрами. В материале, полученном из общего выводного протока, могут присутствовать бокаловидные клетки. ПЖ находится недалеко от двенадцатиперстной, поперечно-ободочной кишки, печени, желудка, селезенки и почек, поэтому в материале ТАБ могут встречаться нормальные элементы этих органов.

## Глава 5. Клиническая цитология

При **панкреатитах** цитологический материал представлен клеточным детритом, жировым некрозом, клетками с выраженными дегенеративными изменениями, элементами воспаления (преимущественно нейтрофилы), гистиоцитами.

**Аутоиммунный панкреатит** представляет собой диффузный или очаговый фибровоспалительный процесс двух типов: тип 1, связанный с IgG4-панкреатитом; и тип 2, связанный с гранулоцитарными поражениями эпителия. При аутоиммунном панкреатите цитологические признаки варьируют в зависимости от продолжительности воспаления. В начале заболевания клеточный состав обильный, представлен смешанным лимфогистиоцитарным инфильтратом. При затяжном течении цитологические препараты малоклеточные. Отмечается относительное преобладание эндокринных клеток панкреатических островков, обусловленное атрофией ацинарного эпителия и обширным фиброзом паренхимы. Как при остром, так и при хроническом панкреатите протоковый эпителий может иметь признаки воспалительной атипии. Скудный клеточный состав, отсутствие или небольшое число изолированных клеток с признаками атипии, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение свидетельствуют в пользу реактивных изменений.

**Псевдокисты ПЖ** составляют большинство (75%) кист ПЖ и представляют собой заполненные жидкостью пространства, лишенные эпителиальной оболочки, развиваются на фоне острого или хронического панкреатита и являются результатом аутолиза паренхимы. Цитологические особенности: «грязный» белковый фон, часто с некрозом, смешанное воспаление с преобладанием лимфоцитов и гистиоцитов, макрофаги, насыщенные гемосидерином, эритроциты, желто-коричневый гематоидиноподобный пигмент, кристаллы холестерина, кальцинированные остатки и клеточный детрит, отсутствие эпителиального компонента, за исключением контаминированного эпителия ЖКТ; в редких случаях могут присутствовать фрагменты грануляционной ткани. Уровень РЭА и СА125 низкий, а уровень амилазы и липазы, как правило, высокий.

**Серозная цистаденома:** малоклеточный и геморрагический цитологический материал, часто не поддающийся диагностике. Встречаются доброкачественные опухолевые клетки в виде рыхлых мелких фрагментов ткани или однослойных пластов. Чистый или зернистый фон без внеклеточного муцина, макрофаги, насыщенные гемосидерином. Кубические клетки обычно имеют нечеткие клеточные границы и зернистую или прозрачную цитоплазму, могут присутствовать «голые» ядра. Ядра мелкие, круглые, с грубым хроматином и нечеткими ядрышками. Отсутствие митотической активности или ядерной атипии. Преобладающей находкой могут быть гиалинизированные фрагменты стромы, по краям которых расположены лишь крошечные полосы серозного эпителия. При ИЦХИ: положительная экспрессия  $\alpha$ -ингибина, панцитокератина, GLUT1. Цитоплазматический гликоген дает положительный результат на PAS. Анализ жидкости из кисты показывает низкие или неопределяемые уровни РЭА и СА19-9, а также низкие уровни амилазы. Уровни РЭА <5 нг/мл и амилазы <250 Ед/мл помогают исключить муцинозную кисту и псевдокисту соответственно. Уровни белка VEGF также повышены в жидкости кисты. При серозной цистаденоме имеются изменения в гене **VHL**, которые не обнаруживают при других кистах ПЖ. В жидкости кисты серозной цистаденомы определяются мутации **VHL** (3p25) или потеря гетерозиготности. Другие изменения включают анеуплоидию хромосомы 3p.

**Категория 3. Атипия.** Степень атипии недостаточна, чтобы отнести образец к категориям новообразования панкреатобилиарной системы низкого (PaN-low) или высокого (PaN-high) риска или же к злокачественной опухоли. Но атипия слишком выражена, чтобы уверенно отнести образец к доброкачественной категории. Риск злокачественного новообразования — 30–40%. Рекомендуется повторить ТАБ.

**Категория 4. Новообразования панкреатобилиарной системы низкого риска — PaN-low.** Образцы, в которых присутствуют характеристики внутрипротоковой и/или кистозной опухоли со слабой и умеренной атипией. Подавляющее большинство опухолей в данной категории — это внутрипротоковое сосочковое муцинозное новообразование ПЖ низкой степени, однако сюда же входят и муцинозно-кистозное новообразование низкой степени злокачественности, интраэпителиальная неоплазия ПЖ низкой степени, билиарная интраэпителиальная неоплазия и веретенчатые поражения низкой степени. Риск злокачественного новообразования — 5–20%. Необходима наблюдательная тактика и корреляция с клиническими данными.

**Интраэпителиальная неоплазия ПЖ низкой степени злокачественности** представляет собой микроскопическое инвазивное новообразование эпителия ПЖ с дисплазией легкой или умеренной степени. Интраэпителиальная неоплазия ПЖ распространена среди пожилых людей, присутствует у  $\geq 80\%$  пациентов с неоплазией протоков ПЖ, примерно у 60% пациентов с панкреатитом и примерно у 30% пациентов без панкреатита. Заболевание протекает бессимптомно и не обнаруживается с помощью визуализирующих исследований. Однако, поскольку интраэпителиальная неоплазия ПЖ низкой степени связана с фиброзом ПЖ, мультифокальные поражения могут быть обнаружены при эндоскопической ультрасонографии (EUS) по изменениям паренхимы, таким как мультифокальная атрофия паренхимы. **Цитологические особенности:** низкая клеточность атипичных протоковых клеток на фоне нормальных ацинусов ПЖ или признаков панкреатита, отсутствие ядерной атипии (легкая дисплазия) с незначительно



увеличенными ядрами минимально неправильной формы (умеренная дисплазия), повышенное ядерно-цитоплазматическое соотношение (дисплазия умеренной степени), фонового некроза нет.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Внутрипротоковое сосочковое муцинозное новообразование ПЖ низкой степени** — продуцирующее муцин эпителиальное новообразование главного и/или ответвленных протоков ПЖ с дисплазией низкой степени злокачественности. Заболевание протекает бессимптомно. **Цитологические особенности:** обычно низкая клеточность, муцин плотный или нежный, часто бесклеточный или с гистиоцитами и редким эпителием, цилиндрические эпителиальные клетки размером с энтероцит двенадцатиперстной кишки в небольших фрагментах ткани, которые могут быть сосочковыми или встречаться в виде отдельных клеток, поляризованные ядра, расположенные равномерно или с легкой атипией, или псевдострагифицированные и с умеренной атипией: могут быть видны внутриядерные включения, цитоплазматический муцин от умеренного до обильного, ядра округлой или яйцевидной формы с легким или умеренным увеличением ядер и атипией, но в целом ядерные мембраны гладкие, равномерный хроматин, ядрышки отсутствуют или незаметны, фонный некроз отсутствует или скудный.

**Муцинозно-кистозное новообразование низкой степени** — эпителиальное новообразование, образующее кисты и продуцирующее муцин, с характерной субэпителиальной стромой, подобной яичниковой, и дисплазией низкой степени злокачественности. Заболевание чаще встречается у женщин среднего возраста и поражает преимущественно тело или хвост ПЖ или внутрипеченочную желчевыводящую систему. **Цитологические особенности:** обычно низкая клеточность, различное количество нежного или плотного муцина с гистиоцитами, доброкачественные или слегка атипичные эпителиальные клетки в небольших пластах и фрагментах ткани или поодиночке, столбчатые или кубические клетки, которые могут содержать или не содержать цитоплазматический муцин, круглые или овальные ядра с гладкими или слегка неправильной формы ядерными мембранами, равномерно распределенным хроматином и незаметными ядрышками, фонный некроз отсутствует, но может присутствовать в кисте с дегенерированными клетками.

**Категория 5. Новообразования панкреатобилиарной системы высокого риска — Pan-high.** Внутрипротоковое тубулопапиллярное новообразование, внутрипротоковое сосочковое муцинозное новообразование высокой степени, муцинозно-кистозное новообразование высокой степени, внутрипротоковое онкоцитарное папиллярное новообразование, интраэпителиальная неоплазия высокой степени. Риск злокачественного новообразования — 60–95%. Хирургическая резекция.

**Интраэпителиальная неоплазия ПЖ высокой степени** определяется как <5 мм, неинвазивная, плоская или микропапиллярная муцинозная эпителиальная неоплазия с выраженной атипией, ограниченная протоками ПЖ.

**Цитологические особенности:** протоковый компонент на фоне доброкачественной ацинарной ткани, компактные протоки и небольшие плотные фрагменты сосочковой ткани без фиброваскулярных стержней, клетки небольшие, с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, плотной, четко ограниченной цитоплазмой, центральными ядрами, скученность ядер с умеренной ядерной атипией и небольшими мономорфными ядрами (~10 мкм), хотя могут быть замечены редкие клетки с крупными ядрами размером >15 мкм, местами неровная ядерная мембрана и гиперхромия, редкие ядрышки, очаговая дискогезия клеток или ее отсутствие, выраженный анизонуклеоз и формирование ядер отсутствуют или ограничены двумя или тремя фрагментами ткани на предметном стекле, то есть менее 12 фрагментов, чистый фон, без значительного некроза, кистозных изменений, дискогезии клеток, плеоморфизма или обилия коллоидоподобного муцина.

**Внутрипротоковое сосочковое муцинозное новообразование ПЖ высокой степени** обычно выявляется случайно, на его долю приходится большинство «случайных» кист ПЖ. Ключевые цитологические особенности: гиперклеточность по сравнению с внутрипротоковым сосочковым муцинозным новообразованием ПЖ низкой степени, мелкие клетки (размером менее 12 мкм), увеличенное ядерно-цитоплазматическое соотношение, аномалии ядерной оболочки, аномальный рисунок хроматина, который может быть гипохроматическим или гиперхроматическим, выступающие ядрышки изменчивы, переменное количество остаточного цитоплазматического муцина, фонный некроз в большинстве случаев, переменное количество элементов фонового воспаления.

**Муцинозно-кистозное новообразование высокой степени** — кистозное эпителиальное новообразование, продуцирующее муцин, с характерной субэпителиальной стромой яичникового типа и тяжелой эпителиальной дисплазией и даже возможной ассоциацией с инвазивной карциномой. **Цитологические особенности:** клеточность от низкой до умеренной, различное количество густого, похожего на коллоид внеклеточного муцина, атипичные эпителиальные клетки в виде скученных пластов, фрагментов сосочковой ткани и в виде отдельных клеток, плеоморфные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, содержащие различное количество цитоплазматического муцина, увеличение ядер, нарушения ядерной мембраны, гипохромия или гиперхромия и частые митозы, строма яичникового типа обычно на ТАБ не видна, часто присутствует фонный некроз.

**Внутрипротоковое онкоцитарное папиллярное новообразование** представляет собой внутрипротоковое эпителиальное новообразование главного и/или ответвлений протоков ПЖ и желчных протоков, которое включает сложные сосочки, выстланные богатым митохондриями онкоцитарным эпителием с дефицитом муцина.

**Цитологические особенности:** гиперклеточный материал, сложные пласты и сосочки с разветвляющимися сосудисто-волокнистыми ядрами, полигональные клетки, напоминающие онкоцитарные клетки ЩЖ, клетки имеют четко очерченные границы, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, ядра круглой или овальной формы и отчетливо зернистую пурпурную цитоплазму, уровень внутриклеточного муцина минимален, ядра от овальной до неправильной формы с крупными ядрышками, аномальные митозы, дегенеративная атипия, признаки некроза.

**Внутрипротоковое тубулопапиллярное новообразование** — внутрипротоковое эпителиальное новообразование ПЖ и желчных протоков с протоковой дифференцировкой и тяжелой дисплазией, при которой отсутствует выраженная

выработка муцина. **Цитологические особенности:** гиперклеточные мазки без густого фонового муцина, ветвящиеся пласты или фрагменты ткани из перекрывающихся клеток с решетчатыми пространствами, представляющими каналцы; опухолевые клетки представляют собой увеличенные кубические клетки с анизонуклеозом, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и ядрами округлой или овальной формы, мембраны ядер неровные, часто выраженные ядрышки, цитоплазма базофильная, цитоплазматические гранулы в ней отсутствуют, бокаловидные клетки не встречаются, в клеточных блоках каналцы, образующие решетчатые образования, выстланные обедненными муцином кубическими клетками с атипией.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Категория 6. Подозрение на злокачественность.** В образце присутствуют некоторые цитологические признаки, по которым можно предположить злокачественное новообразование, но эти признаки недостаточны по качеству или количеству для однозначного заключения. Риск злокачественности — 80–100%. При корреляции с результатами инструментальных методов пациенту предстоит хирургическое вмешательство.

**Категория 7. Злокачественный.** Образцы демонстрируют однозначные цитологические признаки злокачественности. Опухоли, включенные в эту категорию, могут быть как первичными, так и метастатическими. В категорию включены нейроэндокринная опухоль (НЭО) и солидная псевдопапиллярная опухоль. Риск злокачественности — 99–100%. Показано хирургическое лечение, за исключением НЭО менее 2 см.

**Протоковая аденокарцинома** представляет собой инвазивное эпителиальное новообразование ПЖ с железистой и протоковой дифференцировкой. Протоковая аденокарцинома является наиболее распространенной опухолью ПЖ и составляет 85–90% всех панкреатических новообразований. Встречается преимущественно у лиц в возрасте 60–80 лет. Чаще всего поражается головка ПЖ. В **цитологических препаратах** клеточный состав обильный либо умеренно обильный. Опухолевые клетки крупнее нормальных, имеют отчетливые ядрышки. Для протоковой аденокарциномы характерна потеря полярности расположения клеток в структурах («пьяные соты»), что отличается от упорядоченных сотовидных структур доброкачественных клеток. Выраженное отличие формы и размеров ядер в пределах одного пласта, неровные контуры ядерной мембраны, неравномерное распределение хроматина являются ключевыми признаками аденокарциномы. При высокодифференцированной аденокарциноме клетки часто имеют обильную вакуолизированную цитоплазму, при умеренно и низкодифференцированной — менее обильную. Низкодифференцированная аденокарцинома встречается реже, характеризуется выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом, большим числом разрозненно расположенных клеток. Выделяют несколько подтипов протоковой аденокарциномы ПЖ: это аденосквамозная, коллоидная, недифференцированная анапластическая, недифференцированная саркоматоидная, недифференцированная карцинома с остеокластоподобными гигантскими клетками. Характерны экспрессия p53, отсутствие или слабоочаговая экспрессия CDX-2, отсутствие экспрессии SMAD4. Напротив, при хроническом панкреатите отмечается положительная экспрессия SMAD4, а экспрессия p53 и CDX-2 отсутствует. Для нормального кишечного эпителия характерны выраженная экспрессия CDX-2, положительная экспрессия SMAD4, отсутствие экспрессии p53.

**АКК** — злокачественное эпителиальное новообразование ПЖ с ацинарной дифференцировкой клеток.

В **цитологических препаратах** клеточный состав обильный, состоит из плотных трехмерных комплексов опухолевых клеток и единичных разрозненных клеток. Комплексы опухолевых клеток имеют дольчатую, трабекулярную или ацинарную структуру. Опухолевые клетки имеют пирамидную или эпителиоидную форму, но могут встречаться и другие по морфологии клетки, которые включают онкоцитарные, перстневидные клетки, веретенообразные клетки и гипогранулярные. Ядра опухолевых клеток имеют большие размеры, грубый хроматин, ядрышки характерны, но не всегда присутствуют. Мелкозернистая синяя цитоплазма с нечеткими контурами; видны гранулы зимогена. Зернистый фон в мазках — из-за высыпания гранул зимогена из разрушенной цитоплазмы. ИЦХИ: трипсин, химо трипсин и BCL10 являются чувствительными маркерами, индексы Ki-67 обычно составляют от 10 до 50%. Разрозненные клетки экспрессируют синаптофизин и хромогранин, диффузная экспрессия указывает на НЭО, нейроэндокринную карциному или смешанную ацинарно-нейроэндокринную карциному. При АКК можно увидеть очаговую экспрессию ядерного  $\beta$ -катенина, что отражает случайные мутации CTNNB1 и APC, но выраженное диффузное ядерное окрашивание — в пользу солидного псевдопапиллярного новообразования. Слияния BRAF или RAF1 встречаются в 25% случаев и могут быть обнаружены с помощью FISH.

**НЭО ПЖ** представляют собой высокодифференцированные эпителиальные опухоли с нейроэндокринной дифференцировкой. НЭО обычно наблюдаются у пациентов в возрасте 40–60 лет и в основном являются спорадическими поражениями. НЭО подразделяются на три типа: G1 (Ki-67 <3%), G2 (Ki-67 в пределах 3–20%) и G3 (Ki-67 >20%) в зависимости от их индекса пролиферации, определяемого при исследовании ИГХ (Ki-67) и/или митотической активности: G1 (<2/мм<sup>2</sup>), G2 (2–20/мм<sup>2</sup>), G3 (>20/мм<sup>2</sup>). **Цитологические особенности НЭО:** обычно мазки с высоким содержанием преимущественно разрозненных клеток, иногда трехмерные фрагменты тканей и рассеянные отдельные клетки, эпителиоидные или плазматоидные клетки, иногда с минимальным количеством цитоплазмы, ядра округлые или яйцевидные, реже — угловатые. Гладкие, плотные ядерные мембраны, структура хроматина «соль и перец», ядрышки могут присутствовать, цитоплазма плотная, иногда отмечается мелкая зернистость, фон чистый, без некроза. НЭО экспрессируют нейроэндокринные маркеры хромогранин А и синаптофизин.

**Нейроэндокринная карцинома ПЖ** представляет собой высокодифференцированное злокачественное эпителиальное новообразование с нейроэндокринной дифференцировкой. **Цитологические особенности нейроэндокринной карциномы из мелких клеток:** материал с высоким содержанием клеток, рыхлые скопившиеся фрагменты ткани, которые иногда имеют трехмерный вид, и/или рассеянные отдельные клетки, некроз и раздавленные клетки с «размазыванием» хроматина встречаются часто, угловатые плеоморфные ядра, гиперхромный грубый хроматин,

скудные ядрышки, цитоплазма от минимальной до незаметной, рассеянные митотические фигуры и апоптотические тельца. **Цитологические особенности нейроэндокринной карциномы из крупных клеток:** мазки с высоким содержанием клеток, рыхлые скопившиеся фрагменты ткани, которые иногда имеют трехмерный вид, и/или рассеянные отдельные клетки, отмечен анизонуклеоз, утолщенная, относительно гладкая ядерная мембрана, заметно увеличенные ядра с грубыми хроматином и выступающими ядрышками; в мазках, окрашенных по Папаниколау, ядра везикулярные, эозинофильная цитоплазма от умеренной до обильной, часто встречается некроз. Нейроэндокринная природа этих опухолей должна быть подтверждена ИГХ-исследованием, наиболее часто наблюдается экспрессия синаптофизина. Хромогранин А может экспрессироваться менее диффузно, и может потребоваться поиск очаговой цитоплазматической положительной экспрессии. Индекс Ki-67 по определению составляет более 20%, но обычно он превышает 50%.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Панкреатобластома** — редкое злокачественное эпителиальное новообразование, характеризующееся трехлинейной (то есть ацинарной, нейроэндокринной или протоковой) дифференцировкой и плоскоклеточными гнездами. Панкреатобластома чаще всего наблюдается у детей, но в 30% случаев встречается у взрослых. **Цитологические особенности:** гиперклеточный материал с фрагментами ткани и единично рассеянными клетками, могут быть видны ветвящиеся сосочки, напоминающие плотное псевдопапиллярное новообразование, два отличительных типа клеток (бластоподобные опухолевые клетки и плоскоклеточные гнезда, или морулы), бластоподобные клетки небольшие (в 1,5–2 раза больше диаметра эритроцита), с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, скудной темно-синей цитоплазмой и круглыми или овальными мономорфными ядрами, напоминающими лимфоциты, с нежным мелкозернистым незрелым хроматином и ядрышками; может присутствовать формирование ядер, плоскоклеточные гнезда состоят из закрученных плоских клеток с увеличивающейся цитоплазмой в центре, веретенообразные клетки, незрелая мезенхима и фрагменты стромы в некоторых опухолях.

**Со`лидное псевдопапиллярное новообразование** — злокачественная опухоль ПЖ низкой степени злокачественности, состоящая из слабо связанных эпителиальных клеток, образующих со`лидные и псевдопапиллярные структуры, в которых отсутствует определенная линия дифференцировки эпителия ПЖ. **Цитологические особенности:** высококлеточные мазки с ветвящимися сосочковыми структурами и одиночными клетками, три слоя в папиллярных пластах (в центре — сосуды), окруженные миксоидной стромой с внешним слоем опухолевых клеток, миксоидная строма, шарообразные структуры миксоидной стромы с ободком опухолевых клеток или без него, мономорфные, полигональные или плазмцитоподобные неопластические клетки среднего размера с плохо очерченными клеточными границами и часто вакуолизированной цитоплазмой, разрозненные клетки с длинными тонкими цитоплазматическими хвостиками, ядра округлой или овальной формы с гладкими ядерными мембранами или извитые или почковидные ядра с ядерными бороздками (ядра типа кофейных зерен), мелкозернистый хроматин, выступающие ядрышки, скудная, плохо очерченная цитоплазма в большинстве клеток с околядерными вакуолями, PAS-позитивные, устойчивые к диастазе и Конго-красный-негативные цитоплазматические гиалиновые шары, редкие митозы, остатки кисты с некрозом, многоядерными гигантскими клетками, кальцификатами, холестериновыми щелями и псаммомными тельцами. Со`лидное псевдопапиллярное новообразование при ИГХ-исследовании демонстрирует ядерную экспрессию  $\beta$ -катенина, отражая точечные мутации в экзоне 3 CTNNB1. Другие часто экспрессируемые маркеры включают CD10, виментин, синаптофизин, CD56, NSE и PR. Окрашивание на хромогранин А обычно отрицательное. Солидное псевдопапиллярное новообразование может экспрессировать цитокератины AE1/AE3 (экспрессия может варьировать от слабой до сильной) и CAM5.2 в зависимости от используемого метода извлечения антигена. CK7 и CK19 обычно отрицательны.  $\alpha$ 1-Антитрипсин положителен в гиалиновых глобулах со`лидного псевдопапиллярного новообразования. CD99 демонстрирует точечный парануклеарный тип окрашивания, уникальный для со`лидного псевдопапиллярного новообразования. Возможна экспрессия меланоцитарных маркеров, таких как S100, HMB45 и melan-A (MART1). Также сообщалось об окрашивании на SOX11, TFE3, LEF1, AR и клаудин-5. Было обнаружено, что комбинация  $\beta$ -катенина, LEF1 и TFE3 в биопсийном материале обладает ДЧ 100% и ДС 91,9%. Высокий индекс Ki-67 связан с агрессивным поведением.

**Лимфома ПЖ** — экстра nodальная лимфома, при которой основная часть заболеваний локализуется в ПЖ.

**Цитологические особенности:** гиперклеточность с рассеянным монотонным рисунком, разрозненные клетки, фоновые фрагменты лимфоидной цитоплазмы (лимфогландулярные тельца) с некрозом или без него, атипичные лимфоидные клетки или анапластические признаки, ядра различаются в зависимости от подтипа лимфомы, могут присутствовать кариорексис и митозы, фоном могут быть более мелкие лимфоциты и другие элементы воспаления. Неопластические клетки при В-клеточных лимфомах экспрессируют В-клеточные антигены, включая CD19, CD20, CD22, CD79a и PAX5. Экспрессия CD10 присутствует во многих случаях с зародышевым центром, а IRF4 (MUM1) обычно экспрессируется в активированных подтипах В-клеток; BCL6, FOXP1 и другие маркеры могут быть применены для дальнейшей классификации. Экспрессия антигенов CD5, MYC и/или BCL2 может привести к ухудшению прогноза. Рекомендуются оценить индекс пролиферации Ki-67. Для установления окончательного диагноза и дальнейшей классификации лимфомы ПЖ требуется дополнительное тестирование, в частности проточная цитометрия. В условиях ограниченных ресурсов маркеры, включая CD45, CD20, CD3 и BCL2, могут помочь установить диагноз лимфомы, а CD5, CD10, CD23, циклин D1 и Ki-67 могут дополнительно классифицировать многие неходжкинские лимфомы.

**Метастазы в ПЖ** представляют собой вторичное поражение ПЖ злокачественным новообразованием из другой локализации. Любые цитологические изменения, необычные для протоковой аденокарциномы ПЖ, должны вызывать подозрение на метастазирование, включая моноклеточный рисунок, грязный фон, крупные, выступающие ядрышки и отсутствие муцинозной дифференцировки цитоплазмы.

## Печень

Материалом для цитологического исследования могут быть пунктаты, полученные методом ТАБ, мазки-отпечатки с кусочков ткани. В мазках могут присутствовать гепатоциты, эпителий желчных протоков, клетки Купфера.

Гепатоциты — крупные полигональные клетки с обильной зернистой цитоплазмой, центрально расположенными округлыми или овальными ядрами, единичными мономорфными ядрышками. Гепатоциты могут располагаться разрозненно либо в рыхлых однослойных пластах.

Клетки эпителия желчных протоков мельче гепатоцитов, кубической формы; располагаются в плотных пластах и «сотоподобных» структурах. Клетки Купфера по морфологии сходны с макрофагами, имеют вакуолизированную цитоплазму, часто содержат гранулы пигмента, как правило, гемосидерина.

## Неопухолевые поражения печени

**Цирроз** — хронический прогрессирующий диффузный процесс с некрозом гепатоцитов, формирующийся при заболеваниях, характеризующихся обширным фиброзом паренхимы и образованием структурно-аномальных узлов из регенерирующих гепатоцитов, окруженных соединительной тканью, с признаками функциональной недостаточности печени и портальной гипертензии. Узловая трансформация отличает цирроз от гепатита.

## Глава 5. Клиническая цитология

В цитологических препаратах гепатоциты могут иметь разные размеры — от нормальных до значительно укрупненных, с крупными ядрами, ядрышками, характерен пестрый клеточный состав с одновременным присутствием в мазках нормальных гепатоцитов и клеток с признаками атипии. Встречаются двухъядерные клетки и клетки с признаками жировой дистрофии. При циррозе повышен риск развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР).

## Злокачественные опухоли печени

**ГЦР** составляет 90% первичных эпителиальных опухолей печени. Поражение печени может быть узловым, многоузловым, диффузным. При цитологическом исследовании для ГЦР характерен обильный клеточный состав. Опухолевые клетки полигональной формы; располагаются разрозненно либо в виде полосок, рыхлых скоплений, пластов, трубочек. Ядра крупные, округлые, с полиморфными нуклеолами; расположены центрально. Встречаются внутриядерные включения цитоплазмы. Ядерно-цитоплазматическое соотношение увеличено. Цитоплазма зернистая, в некоторых клетках с голубыми каплевидными включениями желчи или гиалина. Характерно присутствие веретенообразных клеток эндотелия сосудов, окружающих многослойные полосы опухолевых гепатоцитов.

Встречаются крупные «голые» ядра с атипией. Низкодифференцированный ГЦР сложно отличить от холангиоцеллюлярного рака и метастаза рака других локализаций, особенно в тех случаях, когда ГЦР имеет тубулярное строение. Опухолевым маркером ГЦР является  $\alpha$ -фетопrotein (АФП), глипикан-3, аргиназа-1.

В дифференциальной диагностике используют ИЦХИ (маркеры HerPar1, BerEP4) и окрашивание специальными красителями; отрицательная реакция с муцикармином говорит в пользу ГЦР.

**Холангиоцеллюлярный рак** — злокачественная опухоль желчных протоков (внутри- и внепеченочных). Встречается редко и не связан с циррозом. В цитологических препаратах опухолевые клетки преимущественно кубической и цилиндрической формы со скудной цитоплазмой; располагаются в многослойных пластах, структурах ацинарного строения, разрозненно. Ядра укрупнены, разной формы и размеров. В отличие от ГЦР нет ни внутрицитоплазматических включений желчи, ни сосудов, разделяющих группы клеток. При проведении дифференциальной диагностики с ГЦР помогает положительная реакция с муцикармином и ИЦХИ.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.3. Цитологические исследования при патологии органов мочевыделительной системы

Для цитологического исследования используют свободно выпущенную мочу, смывы с мочевого пузыря, соскобы щеткой при цистоскопии. Свободно выпущенная моча — простой, легко повторяемый метод, однако большое количество плоского эпителия у женщин и наличие остаточной мочи с выраженными дегенеративными изменениями клеток при обструктивных процессах у мужчин может затруднять просмотр препаратов. В смывах с мочевого пузыря и в моче, полученной при катетеризации, клеточные элементы хорошо сохраняются, нет посторонних элементов. Однако это инвазивный метод, для него должны быть клинические показания; кроме того, клочки из клеток, слущенные катетером, могут напоминать папиллярные структуры опухоли. При проведении цистоскопии можно сделать соскоб с помощью специальной цитощетки. Преимуществом данного вида исследования является хорошая сохранность клеточных элементов и возможность получения материала из определенной области. Клетки, полученные этим способом, как правило, располагаются в пластах.

Полученную мочу помещают в пробирку, центрифугируют, из осадка делают тонкие мазки. Для лучшей адгезии клеточного материала рекомендуется использовать стекла с адгезивным покрытием или добавить в осадок мочи несколько капель сыворотки. Окрашивать препараты мочи можно любыми красителями, которые используют для цитологической диагностики.

Для улучшения взаимодействия между цитопатологами и урологами была разработана Парижская система отчетности для цитологических исследований уринарной патологии (TPS) (2016 г. и второй пересмотр в 2022 г.). Основной целью TPS является снижение количества неопределенных категорий, в частности атипии, и обеспечение максимальной ДС и ДЧ для уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (HGUC).

TPS 2.0 включает шесть диагностических категорий. В версии TPS 2.0 уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности была переведена в категорию «Отсутствие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности» (NHGUC). В основе TPS 2.0 лежит определение ядерно-цитоплазматического соотношения (N/C) уротелиальных клеток, наличие признаков атипии в них, количество клеток с атипией.

**I. Категория «недиагностический/неадекватный материал»** используется, когда получен полностью бесклеточный материал, когда уротелиальные клетки закрыты элементами крови или воспаления и для тех случаев, когда материал хранился более 4 ч без соблюдения температурного режима и консервации и клетки подверглись лизису.

**II. Отсутствие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (NHGUC)** — классифицируется, если в адекватно подготовленном препарате отсутствуют какие-либо цитоморфологические признаки HGUC. На долю случаев NHGUC приходится до 90% образцов мочи.

В материале присутствуют доброкачественные уротелиальные клетки разных слоев: поверхностные («зонтичные»), промежуточные и базальные. Поверхностные уротелиальные клетки — крупные клетки с одним или несколькими крупными, расположенными в центре ядрами округлой или овальной формы, ровной ядерной мембраной, обильной цитоплазмой, цитоплазматическими вакуолями в некоторых клетках, а также низким ядерно-цитоплазменным соотношением ( $<0,5$ ). Промежуточные уротелиальные клетки среднего размера, с округло-овальными ядрами, ровной ядерной мембраной и нежным хроматином, с меньшим количеством цитоплазмы, чем у поверхностных клеток, и низким ядерно-цитоплазменным соотношением ( $<0,5$ ). Глубокие (базальные) уротелиальные клетки — небольшие клетки с круглыми ядрами, содержащие равномерно распределенный мелкозернистый хроматин, скудную цитоплазму и высокое ядерно-цитоплазменное соотношение.

Уротелиальные клетки могут располагаться разрозненно, в виде пластов или в виде папилляроподобных фрагментов, без фиброваскулярных стержней и цитологической атипии. В материал исследования могут попадать клетки плоского эпителия из уретры. Железистые клетки могут быть обнаружены в образцах мочи из почечных канальцев, при эндометриозе, кистозном/железистом цистите, кишечной метаплазии и из предстательной железы. Они могут быть представлены в виде одиночных клеток или скоплений столбчатых клеток с маленькими ядрами и вакуолизированной или зернистой цитоплазмой.

При **острых воспалительных заболеваниях** мочевыводящих путей, интоксикациях, при мочекаменной болезни может наблюдаться усиленное слущивание уротелиальных клеток.

Для **цистита** характерны обильный клеточный состав, большое количество элементов воспаления — нейтрофильные лейкоциты, гистиоциты, макрофаги, бактерии. В уротелиальных клетках отмечаются признаки реактивных изменений: клетки с укрупненными гиперхромными ядрами, гиперхромной цитоплазмой. Хроматин в таких клетках распределен равномерно, контуры ядерной мембраны ровные, что подтверждает их доброкачественный характер.

**Вирусные цитопатические эффекты** могут наблюдаться при инфекциях полиомавирусом, вирусом простого герпеса (обычно II или I типа), ЦМВ и ВПЧ.

Для **мочекаменной болезни** характерна гематурия. Могут встречаться элементы воспаления, папиллярные (сосочкоподобные) структуры из уротелиальных клеток с выраженными реактивными изменениями, клетки с увеличенными гиперхромными ядрами, высоким ядерно-цитоплазменным соотношением, ядрышками. Иногда атипия настолько выражена, что необходимо дальнейшее обследование для исключения злокачественного новообразования.

## Глава 5. Клиническая цитология

Изменения уротелия, связанные с последствиями **лучевой терапии**, вызывают цитомегалию, нуклеомегалию, многоядерность, образование ядерных и цитоплазматических вакуолей, мелкозернистый/нечеткий хроматин и цитоплазматическую полихромазию. Ядерно-цитоплазменное соотношение сохраняется на низком уровне.

**Уротелиальная неоплазия низкой степени злокачественности (LGUN).** Диагноз LGUN может быть поставлен только в том случае, если фрагменты ткани содержат уротелиальные клетки и фиброваскулярные стержни.

Дифференциальный диагноз LGUN включает уротелиальную папиллому, уротелиальную пролиферацию неизвестного злокачественного потенциала (UPUMP), папиллярное уротелиальное новообразование с низким злокачественным потенциалом (PUNLMP) и low-grade (низкой степени злокачественности) папиллярную уротелиальную карциному (LGPUC).

При **поражениях паренхимы почек** при гломерулонефрите характерным признаком является появление клеток почечного эпителия в моче. Клетки почечного эпителия имеют, как правило, округлую форму и небольшие размеры (в 1,5–2 раза больше лейкоцита). Ядра в почечном эпителии занимают большую часть клетки. В цитоплазме могут встречаться признаки дегенеративных изменений — зернистость, вакуолизация. Клетки почечного эпителия располагаются разрозненно, в виде групп, скоплений, цепочек.

**III. Атипичные уротелиальные клетки** со слабо выраженными или умеренными цитологическими изменениями, возможными при HGUC, классифицируются как атипичные уротелиальные клетки. Случаи атипичных уротелиальных клеток составляют до 5,6% образцов мочи. Диагностические критерии для определения атипичных уротелиальных клеток включают обязательный основной критерий: ядерно-цитоплазменное соотношение  $\geq 0,5$ , но  $<0,7$ ; и один из второстепенных критериев: гиперхромия ядра, неровные контуры ядерной мембраны, неровный, грубый и комковатый хроматин. К категории атипичных уротелиальных клеток также относят образцы с выраженными дегенеративными изменениями клеток, характер и степень которых не поддаются точной характеристике. В связи с этим возникают опасения по поводу HGUC. Для дифференциальной диагностики в данной категории рекомендуется использовать FISH/UroVision.

**IV. Подозрение на уротелиальную карциному высокой степени злокачественности (SHGUC)** — категория используется только в случаях наличия атипичных уротелиальных клеток, количество которых не позволяет поставить утвердительный диагноз HGUC. Для образцов нижних отделов мочевыводящих путей — не менее 5–10 клеток с атипией, для образцов верхних отделов мочевыводящих путей —  $\geq 10$  клеток. Случаи SHGUC составляют до 1,6% общего количества образцов мочи. Диагностические критерии для SHGUC включают основной критерий: ядерно-

цитоплазматическое соотношение  $\geq 0,7$ ; и два из трех признаков: гиперхромия от умеренной до выраженной, неравномерное распределение хроматина, нарушение структуры ядерной мембраны.

**V. Уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности (HGUC).** Основная цель TPS — получение максимальной положительной прогностической ценности для HGUC. Число случаев HGUC составляет 1,9% количества образцов мочи. Для диагностики HGUC в образцах нижних отделов мочевыводящих путей нужно обнаружить не менее 5–10 злокачественных клеток, а в образцах верхних отделов — не менее 10 клеток. Необходимым критерием для диагностики HGUC является ядерно-цитоплазматическое соотношение  $\geq 0,7$ , а также: гиперхромия от умеренной до тяжелой, неровная ядерная мембрана, грубный/комковатый хроматин. В общей сложности 14 гистологических вариантов HGUC были включены в классификацию опухолей мочевыделительной системы, принятую ВОЗ в 2022 г. Диагностировать некоторые варианты HGUC с помощью цитологического исследования мочи по-прежнему чрезвычайно сложно.

**VI. Неуротелиальные злокачественные новообразования и другие поражения** в образцах мочи встречаются редко и составляют 0,1%. К ним относятся: первичная плоскоклеточная карцинома, первичная аденокарцинома, первичные НЭО, вторичные злокачественные эпителиальные новообразования, неэпителиальные злокачественные новообразования, нефрогенная аденома.

#### **Дополнительные исследования для цитологического исследования мочи**

Существует несколько дополнительных тестов для дополнительных исследований уринарной патологии. FISH, тесты на мутации на основе ПЦР и NGS для выявления мутаций или эпигенетических изменений при уротелиальной карциноме.

Для FISH можно использовать окрашенные по Папаниколу предметные стекла, приготовленные из любого образца мочи. FISH содержит четыре одноцепочечных ДНК-зонда, три хромосомных зонда для определения числа хромосом (CEPs), которые нацелены на перичентромерные области хромосом 2, 7 и 17, и еще один локус-специфический идентификатор (LSI), который нацелен на локус 9p21. После окрашивания предметные стекла анализируются с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного ртутной лампой мощностью 100 Вт или светодиодным источником света и соответствующими фильтрами для обнаружения многоцветных флуоресцентных сигналов, а увеличение варьирует от 600× до 1000×. Количество сигналов для всех четырех зондов должно быть подсчитано и зарегистрировано как аномальное при наличии усиления (двух и более сигналов) для двух или более хромосом 3 (красная), 7 (зеленая) и 17 (бирюзовая) или при потере обеих копий 9p21 (золотая), как рекомендовано производителем. Тест считается положительным, если в  $\geq 4$  из 25 проанализированных клеток наблюдается увеличение для двух или более хромосом или  $\geq 12$  из этих 25 клеток имеют нулевые сигналы 9p21. FISH обладает ДЧ 89–100% и ДС 60–100%.

## **Глава 5. Клиническая цитология**

### **5.5.4. Цитологическое исследование при патологии молочной железы**

Диагностика заболеваний МЖ основывается на трех методах исследования, так называемом тройном тесте, включающем клиническое обследование, данные маммографии/УЗИ, цитологическое исследование. Если все показатели этой триады свидетельствуют о доброкачественном характере процесса — вероятность того, что изменения в МЖ доброкачественные, составляет 99%. В том случае, если все три параметра указывают на злокачественное поражение, вероятность ошибки не более 1%.

**Материалом для исследования** может служить пунктат МЖ — ТАБ, выделения из соска, материал с эрозированных поверхностей, отпечаток с биоптата, соскоб с ткани (или опухоли) МЖ, удаленной во время операции.

**Пункционный материал.** Угол направления иглы при ТАБ не должен быть перпендикулярен ребрам, что особенно важно при маленькой МЖ. При небольшом подкожном узле можно несколько наклонить иглу; при этом опухоль на игле сместится, что ощущается пальцами и подтверждает правильность положения иглы. Полученный материал распределяется по стеклу краем шлифовального стекла или ребром иглы.

**Отделяемое из МЖ.** Для приготовления препарата капля отделяемого из МЖ наносится на предметное стекло, и готовится мазок. Выделения из соска малоинформативны для диагностики злокачественных новообразований МЖ, за исключением внутрипротокового рака.

**Мазок-отпечаток с эрозированной поверхности.** К месту поражения прикладывается предметное стекло, на котором остается некоторое количество клеточных элементов и отделяемого. Материал можно также получить с помощью ватного тампона и наносить на предметное стекло в виде отпечатков.

**Биопсийный материал.** Отпечатки со столбика ткани выполняются с помощью аккуратного перемещения биоптата иглой по стеклу; при этом нужно стараться не травмировать биопсированный кусочек.

**Операционный материал.** Операционный материал получают с помощью соскоба скальпелем с поверхности разреза удаленной опухоли или другого участка ткани. Если консистенция ткани мягкая, делают отпечаток, прикладывая предметное стекло к поверхности разреза пораженного участка.

Материал для цитологического исследования МЖ можно окрашивать любым из красителей, используемых в цитологической диагностике.

#### **Клеточный состав молочной железы**

**Клетки протоков и ацинусов** располагаются в виде небольших групп или в структурах типа «пчелиных сот», в виде трубочек, ацинусов. Границы клеток неровные; ядра овальные, ядерная мембрана ровная, ядрышки мелкие, хроматин плотный, распределен равномерно; цитоплазма скудная, тонким ободком окружает ядро. При доброкачественных поражениях разрозненно лежащие эпителиальные клетки с сохранившейся цитоплазмой практически не встречаются; отделившись от структур, они обычно теряют цитоплазму и располагаются в виде округлых или овальных «голых» ядер. Размер «голых» ядер примерно такой же, как и размер ядер, сохранившихся в структурах клеток.

**Миоэпителиальные клетки** обнаруживают среди эпителиальных; ядра овальные, плотные, компактные, цитоплазма скудная. Если миоэпителиальные клетки лежат отдельно от структур, они теряют цитоплазму. «Голые» ядра миоэпителиальных клеток вытянутые, несколько суженные по краям.

**Апокринные клетки** — секреторирующие клетки эпителия МЖ: сравнительно крупные, диаметром 6–12 мкм; могут располагаться разрозненно или в скоплениях. Форма клеток одинаковая, границы четкие, ядра расположены центрально; обильная базофильная цитоплазма может содержать большое количество гранул.

**Пенистые клетки (клетки типа молочивных телец)** имеют разный размер — крупные, мелкие или средние, округлую или неправильную форму. Границы клеток чаще неровные, «кружевные», ядра округлые, мелкие, хроматин мелкозернистый, мембрана четкая. Цитоплазма нежная, вакуолизированная, вакуоли имеют разные размеры. Включения, которые могут присутствовать в цитоплазме, являются признаками фагоцитоза.

**Гигантские многоядерные клетки** могут встречаться при беременности, травмах, мастите, туберкулезе, в ранний послеродовой период, после лучевой терапии. Ядра небольшого размера, мономорфные, хроматин распределен равномерно.

**Жировые клетки** крупные, располагаются в структурах, бо́льшую часть клетки составляет цитоплазма — большая жировая вакуоль. Ядра мелкие, темные, пикнотичные; отеснены к периферии жировой вакуолю.

**Фиброциты** — клетки веретенообразной формы, имеют отростки, вытянутые по полюсам; ядра округлые или вытянутые, расположены центрально.

#### **Июкогамская система интерпретации цитологических изменений в молочной железе по материалу тонкоигольной аспирационной биопсии (IAC Yokohama System Breast FNAB)**

Июкогамская система включает пять категорий, классифицированных по риску развития злокачественного новообразования (risk of malignancy — ROM):

- C1 Недостаточный/неадекватный материал (ROM 2,6–4,8%);
- C2 Доброкачественные изменения (ROM 1,4–2,3%);
- C3 Атипия, вероятнее всего, доброкачественная (ROM 13–15,7%);
- C4 Подозрение на злокачественное новообразование (ROM 84,6–97,1%);
- C5 Злокачественное новообразование (ROM 99–100%).

## **Глава 5. Клиническая цитология**

**C1. Недостаточный/неадекватный материал.** Термин «недостаточный/неадекватный материал» используется для малоклеточных, плохо приготовленных или недостаточно зафиксированных препаратов. В соответствии с Июкогамской системой адекватным для цитологической диагностики рекомендуется считать материал ТАБ, где имеется не менее семи скоплений, каждое из которых содержит 20 и более клеток эпителия МЖ. В некоторых ситуациях, если данные цитологического исследования коррелируют с клиническим обследованием и результатами маммографии/УЗИ, материал может быть признан адекватным и без наличия эпителиальных клеток. К таким случаям относится большое число нейтрофильных лейкоцитов при абсцессе МЖ; белковый фон с наличием/отсутствием гистиоцитов, соответствующий содержанию кисты (в случае, если киста полностью дренирована под контролем маммографии/УЗИ и не имеет остаточной жидкости при пальпации); олеогранулема (жировой некроз); фрагменты жировой ткани, соответствующие липоме или узлу из жировой клетчатки. При получении материала категории C1 рекомендуется повторить ТАБ под контролем УЗИ.

**C2. Доброкачественные изменения.** При доброкачественных поражениях в материале ТАБ МЖ присутствуют однозначно доброкачественные цитологические признаки. Основную часть доброкачественных изменений составляют доброкачественные неопухолевые поражения [воспалительные; пролиферативные — фиброзно-кистозная болезнь (ФКБ), киста] и доброкачественные опухоли (фиброаденома, доброкачественная филоидная опухоль, внутрипротоковая папиллома).

**Хронический мастит.** Причиной хронического мастита может быть недолеченное воспаление, абсцесс, некоторые формы мастопатии или системные факторы: аутоиммунные процессы, снижение иммунитета. Цитологические признаки: бесструктурное вещество, фибрин, клетки типа молочивных телец, элементы продуктивного воспаления (фиброциты, макрофаги).

**Туберкулез МЖ.** Микобактерии туберкулеза могут проникать через млечные протоки, гематогенным путем, а также по лимфатическим путям. К цитологическим признакам, позволяющим предположить наличие туберкулеза, относятся: эпителиоидные клетки вытянутой и полигональной формы со светлой цитоплазмой, нежными овальными ядрами с четкими границами, равномерно распределенным петлистым хроматином. В цитограмме могут присутствовать гигантские многоядерные клетки типа Пирогова–Лангханса с хаотично расположенными палочковидными ядрами, петлистым, губчатым хроматином.

Возникновение **олеогранулем (липогранулем, жирового некроза)** может быть связано с травмой, разрывом протока при эктазии протока или кисты при ФКБ. Олеогранулема также может развиваться на месте послеоперационного рубца. Цитологические признаки: пенистые макрофаги (ксантомные клетки) — крупные клетки с небольшим округлым гиперхромным ядром, обильной мелкоячеистой цитоплазмой, содержащей мелкие капли жира. Характерным признаком липогранулемы являются гигантские многоядерные клетки с гиперхромными, иногда укрупненными ядрами и мелкоячеистой цитоплазмой.

**ФКБ** — сборная группа пролиферативных поражений МЖ, включающая гиперпластические и/или атрофические процессы паренхимы и стромы. Гистологические особенности при ФКБ включают кистозное расширение протоков, апокринную метаплазию протокового эпителия, внутридолевой и внутридольковый фиброз, аденоз (увеличение ацинарных структур с пролиферацией концевых отделов желез), внутрипротоковую пролиферацию эпителия

различной степени выраженности. В материале ТАБ в большинстве случаев судить о конкретной гистологической форме ФКБ не представляется возможным. К типичным цитологическим признакам, позволяющим установить диагноз ФКБ по материалу ТАБ, относятся: необильный клеточный состав, небольшие скопления клеток неопределенной формы или в виде сотоподобных структур, апокриновая метаплазия протокового эпителия, единичные миоэпителиальные клетки, единичные «голые» ядра разрушенных клеток округлой или овальной формы; могут встречаться пенистые клетки.

Выделения из соска при ФКБ встречаются достаточно часто. В цитологических препаратах обнаруживают бесструктурные массы, чешуйки плоского эпителия, клетки типа молозивных телец, эпителий протоков, иногда капли жира.

**Киста** — как правило, клеточный состав мазков из материала кисты бывает скудным: единичные «пенистые клетки», небольшое число структур и клеток уплощенного и/или апокринного эпителия кистозной выстилки.

**Фиброаденома** — доброкачественная опухоль МЖ с пролиферацией и нарушением соотношения эпителиального и стромального компонентов. Это самая распространенная опухоль МЖ у женщин. При цитологическом исследовании отличить фиброаденому от ФКБ достаточно проблематично, однако некоторые признаки позволяют предположить наличие этой опухоли. Для фиброаденомы характерны обширные ветвистые многослойные структуры, в которых встречаются округлые участки просветления из одного ряда клеток, обилие «голых» овальных ядер, клочков фибромиксоидной стромы с заключенными в ней фиброцитами.

**Филлоидные опухоли** — особая группа опухолей, для которых характерна пролиферация и стромального, и эпителиального компонента с образованием своеобразных листовидных структур. Различают доброкачественную (филлоидную фиброаденому), пограничную и злокачественную филлоидную опухоль. Предположить доброкачественную филлоидную опухоль по материалу ТАБ позволяют следующие цитологические признаки: обильный клеточный состав, структуры больших размеров из эпителиальных клеток, расположенные в тесной связи с фрагментами стромы малинового цвета с фиброцитами либо отдельно; большое число клеток стромы.

**Внутрипротоковая папиллома** чаще развивается у женщин в пременопаузе или в менопаузе и является наиболее частой причиной появления выделений из соска бурого или кровянистого цвета. Цитологические признаки внутрипротоковой папилломы в выделениях из соска включают триаду: клетки эпителия в виде сосочкоподобных структур (ядра располагаются эксцентрически, цитоплазма обильная), эритроциты, макрофаги с гемосидерином. При С2-категоризации дальнейшее ведение пациентки зависит от конкретной нозологической формы поражения, если клинические данные и данные УЗИ/маммографии не вызывают сомнений в доброкачественности процесса. В случае, если результаты ТАБ не согласуются с клиническими данными и/или результатами визуализирующих методов исследования (которые могут быть сомнительными либо подозрительными), требуется проведение трепанобиопсии.

## Глава 5. Клиническая цитология

**С3. Атипия, вероятнее всего, доброкачественная.** Категория С3 по материалу ТАБ МЖ устанавливается при наличии цитологических признаков, присутствующих преимущественно при доброкачественных состояниях, но с особенностями, которые при доброкачественных изменениях наблюдаются редко и могут встречаться также и при злокачественных поражениях. К изменениям, вызывающим наибольшие трудности в интерпретации, относятся: спектр атипической протоковой гиперплазии при фиброаденоме, внутрипротоковой папилломе, фиброзно-кистозных изменениях; дольковая неоплазия; пограничная листовидная опухоль, пролиферация стромальных веретенообразных клеток. При С3-категоризации требуется обязательная корреляция с клиническими данными и результатами маммографии/УЗИ. Если результаты визуализирующих методов исследования или клинические данные сомнительны/подозрительны, предпочтительно проведение трепанобиопсии под контролем УЗИ. При отсутствии возможности выполнить трепанобиопсию рекомендуется повторить ТАБ. Если клинические и визуализирующие данные являются доброкачественными, следует рассмотреть возможность повторения ТАБ. При получении доброкачественных результатов ТАБ «тройной тест» можно повторить через 3–6 мес.

**С4. Подозрение на злокачественное новообразование.** Термин «подозрение на злокачественное новообразование» при ТАБ МЖ определяется как наличие цитоморфологических особенностей, которые обычно обнаруживаются при злокачественных поражениях, но с недостаточными количественными/качественными признаками злокачественности для того, чтобы поставить уверенный диагноз злокачественного новообразования. По возможности следует указать нозологическую форму предполагаемого злокачественного новообразования. К изменениям, вызывающим наибольшие трудности в интерпретации, относятся пролиферативные поражения МЖ с высокой клеточностью и наличием разрозненно расположенных эпителиальных клеток с атипией, атипическая протоковая гиперплазия, дольковый рак *in situ* и инвазивный дольковый рак. Выраженный некроз с кальцинатами или без них и небольшое количество эпителия с выраженными признаками атипии: возможен протоковый рак высокой степени злокачественности *in situ*; высокая клеточность с наличием крибриформных и папиллярных структур: возможен протоковый рак низкой степени злокачественности *in situ*; инвазивный рак низкой степени злокачественности, включая протоковый рак неспецифического типа низкой степени злокачественности и тубулярный рак.

**С5. Злокачественное новообразование.** Категория С5 устанавливается при наличии в материале ТАБ МЖ однозначных цитологических признаков злокачественного новообразования. По возможности следует указать нозологическую форму. Около 90% злокачественных опухолей МЖ приходится на рак.

**Инвазивный рак неспецифического типа (NST)** — самая частая форма рака, составляет около 75% эпителиальных опухолей МЖ. Общие цитологические признаки включают обильный клеточный состав, клеточный и ядерный полиморфизм, нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения, отсутствие упорядоченности расположения клеток в структурах (комплексах), разрозненное расположение клеток с сохранившейся цитоплазмой, дегенеративные изменения клеток.



**Инвазивный дольковый рак** составляет 10–15% случаев эпителиальных опухолей МЖ. Для него характерно разрозненное расположение относительно мелких опухолевых клеток с нерезко выраженными признаками полиморфизма, компактными округлыми ядрами, незначительно отличающимися размерами. Другие гистологические варианты рака МЖ (муцинозный, медулярный, тубулярный, Педжета, папиллярный), а также злокачественные фиброэпителиальные и злокачественные неэпителиальные (мезенхимальные) опухоли встречаются редко. Если C5-категоризация при ТАБ не согласуется с клиническими данными и результатами маммографии/УЗИ, необходимо выполнить трепанобиопсию МЖ под контролем УЗИ. При отсутствии возможности выполнить трепанобиопсию проводится эксцизионная биопсия. В случае если диагноз злокачественного новообразования подтверждается результатами «тройного теста», необходимо на материале клеточного блока определить прогностические и предиктивные маркеры (экспрессию ER и PR, протоонкогена HER-2/neu/CerbB-2, маркера пролиферации, Ki67), чтобы перейти к окончательной терапии для конкретной нозологии. Одновременное определение ER, PR, HER-2 при ИЦХИ позволяет на дооперационном этапе установить важнейшие факторы прогноза опухолевого процесса и скорректировать схемы лечения. ER+ и PR+ в инвазивном протоковом раке неспецифического типа составляет 70–80%; инвазивный дольковый рак в 70–95% случаев экспрессирует ER, в 60–70% — PR. Рецептор-положительные опухоли МЖ имеют более высокую дифференцировку и более благоприятный прогноз. Гиперэкспрессия протоонкогена HER-2/neu/CerbB-2, придающего клеткам свойство неограниченного деления, служит фактором риска рецидива. В случае ER-, PR-отрицательной опухоли МЖ при одновременной гиперэкспрессии HER-2 более вероятен неблагоприятный прогноз с наступлением раннего рецидивирования. В случае ER-, PR-положительной опухоли и отсутствия гиперэкспрессии HER-2 неблагоприятный прогноз менее вероятен.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.5. Цитологические исследования женских половых органов

#### **Влагалище**

Влагалище выстлано многослойным плоским неороговевающим эпителием. Неопухолевые поражения влагалища в основном связаны с дисбиозом или воспалением. Во влагалище могут развиваться лейкоплакия, эрозивные поражения, эндометриоз, кондиломы.

**Рак влагалища** составляет около 2% злокачественных опухолей женской половой сферы. Чаще рак бывает плоскоклеточным неороговевающим, поражающим преимущественно верхнюю треть задней стенки. Развитию рака предшествует внутриэпителиальная неоплазия. Цитологические критерии неопухолевых состояний, внутриэпителиальной неоплазии (Vaginal Intraepithelial Neoplasia — VIN) и инвазивного рака в связи с одинаковым строением эпителия схожи с соответствующим процессом в шейке матки (ШМ).

#### **Шейка матки**

Во влагалищной порции ШМ доминирует многослойный плоский неороговевающий эпителий, в цервикальном канале — цилиндрический эпителий. При плоскоклеточной метаплазии в зоне трансформации присутствует метаплазированный эпителий, при резервно-клеточной гиперплазии — резервные клетки. Многослойный плоский неороговевающий эпителий содержит клетки четырех типов: поверхностные, промежуточные, парабазальные и базальные.

**Поверхностные клетки** плоского эпителия — крупные, диаметром около 50 мкм, полигональной формы, ядра мелкие (5–6 мкм), овальные, темные, пикнотичные, структура хроматина не просматривается. Наиболее зрелые поверхностные клетки располагаются преимущественно разрозненно, цитоплазма — с нечетко выраженными складками. При окрашивании по Папаниколау цитоплазма, как правило, светлая: эозинофильная или слабо цианофильная. При окрашивании по Романовскому цитоплазма светло-голубая, при окрашивании гематоксилин-эозином — светло-розовая.

**Промежуточные клетки** в зависимости от степени созревания могут иметь разные размеры и форму. Размер ядра больше 6 мкм, мембрана четкая, хроматин распределен равномерно (пузырьковидные ядра). Зрелые промежуточные клетки (препикнотичные) — крупные (40–50 мкм) полигональной формы. Менее зрелые промежуточные клетки округло-овальной формы, меньшего размера, ядра имеют такую же структуру, как и в зрелых клетках, цитоплазма более плотная, иногда края ее заворачиваются (навикулярные, ладьевидные клетки). Цитоплазма в препаратах, окрашенных по Папаниколау, может быть эозинофильной, цианофильной; при окрашивании по Романовскому — светло-голубого или сиреневого цвета.

**Парабазальные клетки** мелкие (диаметр — 20–30 мкм), овальные, ядро относительно крупное, хроматин нежно-зернистый, распределен равномерно, могут быть видны ядрышки. Клетки не подвержены бактериальному цитолизу, однако в них могут развиваться аутолитические процессы. Это приводит к дегенеративным изменениям, в препаратах появляются клетки с пикнотичными ядрами или «голые» ядра разрушенных клеток. Цитоплазма при окрашивании по Папаниколау обычно цианофильная, при окрашивании по Романовскому — базофильная или светлая.

**Базальные клетки** располагаются на базальной мембране в один ряд и практически не попадают в цитологические мазки, так как покрыты несколькими слоями парабазальных клеток и не слущиваются с поверхности.

**Клетки цилиндрического эпителия** в норме располагаются небольшими группами, в виде сотовидных структур, полосок, скоплений. Форма клетки вытянутая: зауженная к базальному полюсу и расширенная к апикальному, ядро расположено эксцентрически (ближе к базальному полюсу), форма ядра округло-овальная, хроматин зернистый, цитоплазма часто вакуолизирована, с признаками секреции. Могут встречаться «бокаловидные» клетки, цитоплазма в которых растянута слизью; иногда в клетках обнаруживают гранулы секрета. Реже находят мерцательные клетки, их апикальный край уплощен, на нем расположены реснички.

**Клетки метаплазированного эпителия** в норме в цитологических препаратах встречаются в небольшом числе или не встречаются вовсе. Резервные клетки, незрелые и зрелые метаплазированные клетки практически неотличимы

от базальных и парабазальных клеток. Узнаваемы «клетки-паучки», характерные для созревающей плоскоклеточной метаплазии.

В материале из влагалищной части ШМ преобладает тот или иной тип клеток плоского эпителия в зависимости от степени созревания многослойного эпителия в соответствии с возрастом и фазой менструального цикла. Лейкоциты единичные, число их увеличивается перед менструацией. В соскобе, взятом с помощью щетки, помимо клеток плоского эпителия, должны содержаться клетки цилиндрического эпителия в виде групп, сотовидных структур, полосок; могут встречаться метаплазированные клетки. В мазках, полученных из цервикального канала, обнаруживают клетки плоского и цилиндрического эпителия, единичные метаплазированные клетки, слизь, лейкоциты в слизи. Клеточный состав мазков, полученных в разные фазы менструального цикла и различные периоды жизни женщины, отличается между собой. В период постменопаузы развивается атрофия эпителия — многослойный плоский эпителий созревает до промежуточных слоев или только до парабазальных слоев. Цитологический материал представлен клетками промежуточного типа и парабазально-базального типа (атрофический тип мазка). Клетки парабазального типа располагаются разрозненно или в скоплениях. Часто отмечаются дегенеративные изменения цитоплазмы и/или ядер. Дегенерация ядер приводит к появлению мелких клеток с мелким пикнотичным ядром или его фрагментами (распад ядра на глыбки, кариорексис), интенсивно-базофильной блестящей цитоплазмой (псевдопаракератоз). Если разрушается цитоплазма (цитоллиз), в мазках обнаруживают клетки парабазального типа и «голые» овальные ядра разрушенных клеток. Выраженная лейкоцитарная реакция и мелкозернистое бесструктурное вещество, напоминающее опухолевый диатез, может присутствовать в случаях выраженной атрофии (как правило, данная картина встречается при атрофических вагинитах и кольпитах — состояниях, не связанных с инфекцией).

## Глава 5. Клиническая цитология

### Морфологические классификации заболеваний шейки матки

Цитологическая оценка патологии ШМ и формирование заключения проводятся по системе цервикальной цитопатологии Бетесда (The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 2014 г.), которая создана для эффективной передачи информации из лаборатории врачам клинических специальностей и обеспечения стандартизации лечения диагностированных нарушений, а также последующего наблюдения за больными.

Первый этап исследования в соответствии с системой Бетесда заключается в оценке качества мазка. При оценке качества учитывают количество клеток плоского эпителия. При недостаточном количестве клеток плоского эпителия (менее 8000 для традиционной цитологии и менее 5000 для жидкостной цитологии) материал признают неадекватным (неудовлетворительного качества). В протоколе исследования необходимо указывать факторы, препятствующие полноценной оценке эпителия (примеси крови, элементов воспаления, артефактов). В результатах исследования обязательно указывают наличие или отсутствие компонента зоны трансформации и эндоцервикального эпителия.

**Терминология Bethesda** включает следующие категории.

1. Отсутствие интраэпителиального поражения и злокачественности (Negative for intraepithelial lesion or malignancy — NILM). Данная категория включает цитологическую картину в пределах нормы, неопухолевые изменения (плоскоклеточная метаплазия, гиперкератоз, атрофия, изменения, связанные с беременностью, трубная метаплазия), реактивные изменения (связанные с воспалением, лимфоцитарным цервицитом, лучевой терапией, внутриматочным контрацептивом), обнаружение микроорганизмов (*Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, изменение микрофлоры, характерное для бактериального вагиноза, *Actinomyces spp.*, вирус простого герпеса), обнаружение железистых клеток после гистерэктомии и клеток эндометрия у женщин старше 45 лет.

2. Патологические изменения клеток плоского эпителия. К данной категории относят атипичные клетки плоского эпителия неопределенного значения (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance — ASC-US), атипичные клетки плоского эпителия, не позволяющие исключить плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени тяжести [High Grade Squamous Intraepithelial Lesion — HSIL] (Atypical Squamous Cells Cannot Exclude HSIL — ASC-H), HSIL и плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени тяжести (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions — LSIL), плоскоклеточная карцинома. LSIL включает изменения, связанные с папилломавирусной инфекцией и слабой дисплазией эпителия (цервикальная интраэпителиальная неоплазия — CIN I), HSIL — умеренную дисплазию эпителия (CIN II), тяжелую дисплазию эпителия и интраэпителиальную карциному (*cancer in situ*) (CIN III).

3. Патологические изменения клеток железистого эпителия. Данная категория включает атипичные клетки железистого эпителия (Atypical Glandular Cells — AGC) без дополнительных уточнений или с уточнением в протоколе исследования (эндоцервикальные клетки, клетки эндометрия, клетки железистого эпителия); атипичные клетки, подозрительные на опухолевые (Atypical Glandular Cells Favor Neoplastic — AGC-FN): эндоцервикальные клетки, клетки железистого эпителия, подозрительные на опухолевые; эндоцервикальную аденокарциному *in situ*, аденокарциному (эндоцервикальную, эндометриальную, внематочную, без дополнительного уточнения).

4. Другие злокачественные опухоли (например, НЭО, карциносаркома, саркома), вторичные метастатические опухоли (меланома, злокачественная лимфома).

### Доброкачественные изменения эпителия

**Гиперкератоз** — патологическое ороговение с разрушением ядер поверхностных клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия. В цитологических препаратах обнаруживают скопления и разрозненно лежащие безъядерные «чешуйки» плоского эпителия.

**Паракератоз** — реакция эпителия на раздражение или нарушение трофических процессов, проявляется как «усиленная дифференцировка». Паракератоз ШМ характеризуется присутствием в поверхностном слое множественных слоев мелких компактных клеток с пикнотичными ядрами, расположенных разрозненно, в скоплениях или закрученных в виде жемчужин. Процессы ороговения в верхних слоях эпителия могут быть проявлением

защитной реакции на хроническое повреждение или раздражение при хроническом воспалении, гормональном воздействии, нарушении трофики.

**Плоскоклеточная метаплазия** — защитный механизм, благодаря которому железистый эпителий в участках эктопии на влагалищной порции ШМ замещается многослойным плоским эпителием. Однако плоскоклеточную метаплазию рассматривают как патологический процесс, если она развивается в эндоцервикальном канале, сопровождается замещением цилиндрического эпителия на плоский, как на поверхности слизистой оболочки цервикального канала, так и в шейных железах.

**Воспаление** проявляется экссудативными, реактивными изменениями, а также процессами репарации. При остром воспалении преобладают нейтрофильные лейкоциты, большей частью разрушенные, «голые» ядра лейкоцитов, в сохранившихся лейкоцитах обнаруживаются фагоцитированные бактерии, обломки клеток и ядер. При подостром и хроническом воспалении к нейтрофильным лейкоцитам присоединяются эозинофильные (характерны для хронической гонореи), лимфоциты, макрофаги (характерны для вирусной, хламидийной инфекции). Эпителиальные клетки подвергаются дегенеративным изменениям, которые могут проявляться пикнозом ядер, нарушением целостности ядерной мембраны, структуры хроматина, кариорексисом и кариолизисом, появлением голоядерных элементов.

## Глава 5. Клиническая цитология

### Патологические изменения эпителия

Доказана и не подвергается сомнению роль **ВПЧ** как основного этиологического фактора в возникновении и развитии рака ШМ. Инфекция передается половым путем, может иметь латентную форму (без клинических, цитологических и гистологических проявлений), субклиническую (слабо выраженные гистологические и/или цитологические признаки без клинических проявлений) или клиническую форму (визуальные и/или кольпоскопические, гистологические и/или цитологические признаки).

Рак ШМ развивается в результате длительно персистирующей ВПЧ-инфекции; время между инфицированием ВПЧ и появлением признаков повреждений варьирует от 3 мес до нескольких лет. Кроме персистирующей ВПЧ-инфекции высокого канцерогенного риска, важную роль в генезе рака ШМ играют раннее начало половой жизни, наличие большого числа и частая смена половых партнеров, хронические воспалительные заболевания ШМ, вызванные другими инфекциями, передаваемыми половым путем, курение, иммунодефицитные состояния, длительный прием высокодозированных оральных контрацептивов. Типы ВПЧ высокого риска, к которым относят 14 типов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68), способны оказывать трансформирующее воздействие на эпителиальные клетки, приводя к развитию предрака (CIN II, CIN III) и инвазивного рака ШМ, влагалища и вульвы. ВПЧ-тестирование выполняют методами молекулярной диагностики. ДЧ ВПЧ-тестирования методом ПЦР (88–100%) значительно превышает ДЧ цитологического исследования (68–86%). ДС ПЦР ВПЧ-тестирования (68–97%) немного уступает ДС цитологического метода (78–99%).

**Цитологические признаки ВПЧ-инфекции:** койлоциты — клетки плоского эпителия неправильной формы с четкими границами, с обширной околядерной зоной просветления, двухъядерные клетки, амфилия цитоплазмы, многоядерные клетки.

**CIN**, известная также как дисплазия ШМ, является предраковой трансформацией, в основе которой лежит атипичный рост (дисплазия) плоского эпителия. В большинстве случаев CIN не прогрессирует или устраняется иммунной системой. Однако в небольшом проценте случаев CIN переходит в рак ШМ. Как правило, диспластические изменения начинаются в зоне стыка плоского и цилиндрического эпителия или зоне трансформации, затем распространяются на влагалищную часть и/или в цервикальный канал. Основными цитологическими признаками, позволяющими провести дифференциальную диагностику реактивных изменений эпителия, дисплазии и рака, являются изменения в ядрах (дискариоз).

**Цитологические критерии LSIL.** Изменения отмечаются в клетках поверхностного типа: клетки крупного размера с обильной, «зрелой» цитоплазмой с четкими границами, клетки располагаются разрозненно или в пластах. Размер ядер более чем в 3 раза превышает размеры ядер нормальных промежуточных клеток, контур ядерной мембраны неровный. Хроматин часто распределен равномерно, крупнозернистый; хроматин может быть сглаженным или плотным, непросматриваемым, ядрышки, как правило, не видны, разная степень гиперхромии ядер. Могут встречаться двухъядерные и многоядерные клетки. Цитоплазма может быть плотной, оранжевой (признак ороговения).

**Цитологические критерии HSIL.** Клетки с признаками HSIL меньших размеров и менее зрелые, чем при LSIL. Клетки располагаются разрозненно, в группах или в синцитиоподобных структурах. Хроматин может быть нежным или крупнозернистым и распределен равномерно. Контур ядерной мембраны неровный, часто с вдавлениями. Цитоплазма вариабельна: может быть «незрелой», кружевной и нежной или плотной; иногда цитоплазма «зрелая» и ороговеющая (ороговевающий тип). Ядрышки, как правило, не видны, но иногда (при распространении HSIL в эндоцервикальные железы) могут определяться.

Злокачественные опухоли ШМ могут развиваться из различных источников: плоскоклеточный рак с ороговением или без ороговения, самая частая форма злокачественного поражения ШМ, развивается из плоского или метаплазированного эпителия; аденокарцинома — из цилиндрического эпителия.

Для злокачественных опухолей ШМ характерны клеточный и ядерный полиморфизм, нередко встречаются клетки неправильной формы. Образование комплексов из клеток, клетки ориентированы в разных направлениях, имеют разные размеры и форму. Косвенным признаком инвазивного роста может быть опухолевый диатез: нежно-зернистый фон, элементы некроза клеток, свежие или лизированные эритроциты, лейкоциты, фибрин.

**Тело матки**

Материал из полости матки лучше получать в пролиферативной фазе (на 6–9-е сутки менструального цикла) или в секреторной фазе, но не позднее чем за 5 сут до предполагаемой менструации. Не рекомендуют брать материал перед менструацией и во время нее. Способы получения материала: аспирация содержимого полости матки, смывы изотоническим раствором натрия хлорида, соскобы слизистой оболочки полости матки (браш-биопсия). Наиболее распространенный и простой способ — получение аспирата из полости матки с помощью шприца емкостью 20 мл и канюли. Введенную в полость матки канюлю продвигают до маточного дна и трубных углов, где чаще всего возникают очаги гиперплазии и рака. Постепенно, оттягивая поршень шприца и медленно поворачивая наконечник канюли, получают материал так, чтобы отверстие на конце канюли соприкасалось со слизистой оболочкой разных отделов полости матки. Перед извлечением канюли оттягивание поршня прекращают, чтобы предотвратить попадание клеток из ШМ и влагалища в содержимое шприца. Аспирированный материал выдавливают поршнем шприца на 2–4 предметных стекла и распределяют по их поверхности тонким слоем.

## Глава 5. Клиническая цитология

### Клетки эндометрия в норме и при гиперпластических состояниях

Строение эндометрия и его цитоморфологические особенности меняются в соответствии с фазами овариально-менструального цикла, а также с периодами жизни женщины. В пролиферативной фазе цикла клетки эпителия эндометрия расположены в мазках в виде групп, пластов, железистых трубочек и тканевых фрагментов, состоящих из участков эпителия и клеточной стромы. Эпителиальные клетки имеют однородные округлые ядра, структура хроматина мелкозернистая. Цитоплазма слабо базофильная, границы ее в пластах плохо различимы. Клетки стромы эндометрия расположены более рыхло, разрозненно или в виде скоплений. В богатых клетками участках стромы нередко видна разветвленная сеть капилляров.

В секреторной фазе цикла в мазках наряду с пластами клеток эндометрия пролиферативного типа видны пласты и скопления эпителиальных клеток с признаками секреции. В ранней секреторной фазе цикла (13–15-е сутки) в образующих пласты клетках видны четкие крупные околядерные вакуоли. В более поздних периодах секреторной фазы эпителиальные клетки расположены в пластах более рыхло, чем клетки эндометрия пролиферативного типа, имеют более крупные ядра. Структура хроматина мелкозернистая, цитоплазма обильная мелкозернистая.

В постменопаузе, когда прекращается циклическая деятельность яичников, цитологическая картина в мазках эндометрия может быть разной. Наряду с пластами эпителиальных клеток эндометрия пролиферативного и секреторного типа видны пласты клеток индифферентного маточного эпителия: клетки мелкие, однородные, расположены компактно, имеют мелкие округлые, иногда сморщенные, интенсивно окрашенные ядра с однородной структурой хроматина и скудную, нередко плохо различимую цитоплазму. При значительном снижении гормональной стимуляции у женщин, особенно находящихся в глубокой менопаузе, развивается атрофия эндометрия, которая может сопровождаться кровоизлияниями и кровотечениями из-за истончения эндометрия и ломкости капилляров. В этих случаях мазки обычно скудные, содержат элементы крови, слизи, могут быть видны скопления гистиоцитов и гигантские многоядерные клетки «инородных тел». На этом фоне в небольшом количестве видны группы и пласты клеток индифферентного маточного эпителия.

Основной целью цитологического исследования эндометрия является выявление инвазивных злокачественных новообразований. Для решения этой задачи в 2016 г. разработана международная Июкогамская классификация (Yokohama System — TYS), включающая семь диагностических категорий.

**Неадекватный/недиагностический материал (TYS 0)** распространяется на все случаи, когда полученный образец не может быть оценен по ряду причин, например: избыток крови или выраженное воспаление, значительная примесь клеток плоского эпителия, отсутствие клеток эндометрия.

**Отсутствие злокачественных опухолей и предраковых поражений (TYS 1)** — к категории относятся пролиферативный эндометрий, секреторный эндометрий, менструально измененный эндометрий, атрофичный эндометрий, реактивные изменения эндометрия, полип эндометрия, разрушение стромы и желез эндометрия. Непатологический, физиологический эндометрий: если все скопления клеток в препарате имеют физиологическую трубчатую или пластинчатую структуру, сопровождаемую стромальными клетками, а количество перекрывающихся ядер составляет менее трех слоев. В случаях, когда обнаруживаются скопление ядер и/или более длинные кровеносные сосуды, выставляют заключение о пролиферативном эндометрии. Секреторный эндометрий обычно диагностируют, когда при малом увеличении видны слои клеток эндометрия в виде сот и субъядерные цитоплазматические вакуоли, а при среднем увеличении видны пилообразные железы и/или длинные кровеносные сосуды. Заключение «атрофический эндометрий» обычно применяется при наличии однородных круглых ядер и скудной цитоплазмы и/или более коротких и тонких кровеносных сосудов.

Для определения Endometrial and Stromal Glandular Breakdown — EGBD (фазы десквамации) были разработаны следующие критерии.

1. Скопления клеток с неравномерной протрузией цитоплазмы и наложением ядер из трех или более слоев могут наблюдаться при малом увеличении микроскопа.
2. Скопления уплотненной стромы наблюдаются при среднем увеличении в виде скоплений клеток с почковидными или веретенообразными ядрами с небольшим количеством цитоплазмы или без нее. Фон также может содержать «светло-зеленые тельца», то есть комочки светло-зеленого аморфного вещества с пятнистой гранулярной или фибриллярной окраской (по-видимому, сгустки фибрина).
3. Метапластические скопления с неравномерными протрузиями наблюдаются в виде скоплений клеток с веретенообразными ядрами с обильной цитоплазмой и/или ресничками/реснитчатыми отростками, пластинками на люминальном крае и/или прикрепленными к ним конденсированными стромальными скоплениями.

При обнаружении трех основных цитологических критериев можно сделать вывод о наличии EGBD (фазы десквамации). Риск малигнизации составляет 0,4%.

**Атипичные клетки эндометрия неопределенного значения (ATEC-US) (TYS 2).** Данная категория выбирается, когда наблюдаются атипичные клетки эндометрия, но их значимость невозможно определить из-за воспалительных, метапластических или ятрогенных изменений. В случаях когда цитологических данных недостаточно для отнесения к какой-либо другой из упомянутых выше диагностических категорий, следует выбрать ATEC-US (TYS 2). В таких случаях последующая биопсия эндометрия не требуется, если только изменения не обнаруживаются повторно.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Гиперплазия эндометрия без атипии (TYS 3).** Гиперплазия эндометрия без атипии, гиперпластический полип. При малом увеличении микроскопа должно быть видно более пяти скоплений клеток с расширенными или разветвленными железами, с наложением ядер не более чем в три слоя. Ядерная атипия, наблюдаемая при среднем увеличении, отсутствует. Поскольку скопления клеток с расширенными или разветвленными железами также наблюдаются в фазе нарушенной пролиферации или при полипах, категория TYS 3 не исключает их. В качестве дополнительной информации можно указать комментарий, например: «нельзя исключить нарушения созревания эндометрия». Риск малигнизации составляет 18,2%.

**Атипичные клетки эндометрия, нельзя исключить атипичную гиперплазию эндометрия (АЕН)/эндометриальную интраэпителиальную неоплазию (EIN) (ATEC-AE) (TYS 4).** Термин ATEC используется, когда наблюдаются атипичные клетки эндометрия. ATEC-AE используется, когда предполагается возможность наличия АЕН или злокачественной опухоли, но полученных данных недостаточно, чтобы интерпретировать их как злокачественные новообразования (TYS 6), поскольку количество атипичных клеток ограничено или атипия может быть вызвана воспалением, метапластическими изменениями или ятрогенными воздействиями. В таких случаях рекомендуется последующая биопсия эндометрия. При малом увеличении микроскопа видны скопления клеток с неравномерными протрузиями цитоплазмы, наблюдается перекрытие трех или более слоев ядер. При среднем увеличении микроскопа, когда типичные признаки EGBD (фазы десквамации) не могут быть обнаружены — за исключением скоплений клеток с неравномерными протрузиями цитоплазмы (включая метапластические скопления), — интерпретация должна быть ATEC-AE. Риск малигнизации составляет 60%.

**АЕН/EIN (TYS 5).** При небольшом увеличении микроскопа можно увидеть скопления клеток с неравномерными протрузиями цитоплазмы и наложением ядер в три или более слоев. При среднем увеличении микроскопа ядерная атипия или некротический фон с цитоархитектонически аномальными скоплениями клеток с крибриформной структурой и/или структурой «спинка к спинке» должны быть определены как аденокарцинома (TYS 6) или как АЕН/EIN (TYS 5).

АЕН/EIN (TYS 5) можно отличить от аденокарциномы (TYS 6), когда при наличии четко выраженной ядерной атипии отсутствуют дополнительные признаки, указывающие на инвазию, такие как явный некротический фон, наличие изолированных злокачественных клеток, явное расположение желез «спинка к спинке» или крибриформные структуры.

Обнаружение атипичных митозов имеет определенную диагностическую ценность и также должно быть упомянуто в заключении. Риск малигнизации составляет 61,5%.

**Злокачественные опухоли TYS 6.** К данной категории относятся все злокачественные опухоли, включая серозную эндометриальную интраэпителиальную карциному (SEIC), эндометриоидную аденокарциному (G1, G2, G3, с плоскоклеточной дифференцировкой), серозную аденокарциному, светлоклеточную аденокарциному, муцинозную аденокарциному, плоскоклеточную карциному, смешанную карциному, недифференцированную карциному, мезенхимальные опухоли, стромальную саркому эндометрия, лейомиосаркому, карциносаркому гомологичного типа, гетерологичного типа, другие злокачественные опухоли. Риск малигнизации составляет 94,5%.

### Яичник

Цитологические исследования при образованиях яичника в первую очередь используются для установления характера новообразования (доброкачественный или злокачественный) и по возможности для определения типа и степени распространенности опухолевого процесса. Дооперационные исследования включают ТАБ опухоли, заднего свода, исследование асцитической и плевральной жидкости, интраоперационные — исследование отпечатков и соскобов из удаленной опухоли, париетальной и висцеральной брюшины, большого сальника, заднего и переднего свода влагалища, мест прорастания опухоли в соседние органы, смывов с брюшной полости. Срочное интраоперационное цитологическое исследование позволяет установить характер патологического процесса и степень распространенности, форму опухоли и является решающим для определения объема оперативного вмешательства и прогноза заболевания.

**Серозный рак** — наиболее частая (около 1/3 эпителиальных новообразований) злокачественная опухоль яичника. Серозный рак обычно диссеминирует по брюшине, часто метастазирует по плевральным листкам, вызывая обильную экссудацию. При серозной аденокарциноме в препаратах обнаруживают компактные сосочковые структуры, железистые комплексы. Размер клеток опухоли варьирует от мелких до гигантских. Ядра занимают бо́льшую часть клеток. Хроматин интенсивно окрашен, сетчатый, равномерно распределен под ядерной мембраной. Ядра клеток неправильной формы, хроматин в одних клетках компактный и гиперхромный, в других — рыхлый, распределен неравномерно. Цитоплазма скудная, базофильная, в единичных клетках — мелкозернистая. При дифференцированных формах серозного рака яичников наблюдаются клетки с признаками секреции в виде венчика тонких волокон с одного полюса, подобно ресничкам (клетки-анемоны). Этот признак принято считать патогномоничным для рака яичника, однако он встречается еще при карциноматозе серозного папиллярного рака эндометрия. Вспомогательным

признаком рака яичника являются псаммомные тельца — известковые образования в виде слоистых кольцевидных масс. В окрашенных препаратах они располагаются в центре железистоподобных и папиллярных структур.

**Муцинозная и эндометриоидная аденокарцинома** яичника встречается значительно реже серозной. В препаратах преобладают слизистые массы, в которых располагаются лимфоциты, гистиоциты, макрофаги, а также небольшие комплексы из опухолевых клеток, разных по размеру. Такая картина имеет место в асцитической жидкости, в то время как в плевральной жидкости у этих же женщин слизистые массы не обнаруживаются; цитологическая картина в этих случаях была аналогична серозному раку; по всей видимости, клетки опухоли в плевральной полости утрачивали способность продуцировать слизь. Цитологическая картина эндометриоидной аденокарциномы яичника морфологически идентична эндометриоидной аденокарциноме эндометрия.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Гранулезоклеточные опухоли** яичников относятся к неэпителиальным новообразованиям полового тяжа яичников. Этот тип опухолей является самым частым гормонопродуцирующим новообразованием яичников. В цитологических препаратах отмечается высокая клеточность. Клетки располагаются в виде небольших розеток, железистоподобных комплексов, фолликулов и тубулярных структур с характерным расположением вокруг округлой оксифильной субстанции. Клетки относительно мелкие, чаще округлые, реже — вытянутые. Ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону ядра. Ядра расположены эксцентрически, ближе к центру структуры, в то время как цитоплазма размещается по периферии комплексов. Ядра округлой, овальной, изредка вытянутой формы, в большинстве клеток ядра умеренно гиперхромные, немного полиморфные. Хроматин неравномерный, мелкозернистый или мелкоглыбчатый. Большая часть клеток имеет скудную слабооксифильную цитоплазму, которая сливается с фоном препаратов. Иногда среди клеток с овальными ядрами встречаются вытянутые клетки с сигарообразными гиперхромными ядрами, по структуре напоминающие тека-клетки. Клетки гранулезоклеточной опухоли не экспрессируют Ber-EP4, CK7, CK20, панцитокератин, отмечается положительная экспрессия ингибина, виментина, что подтверждает их мезенхимальную природу.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.6. Новообразования и другие патологические процессы мужских половых органов

#### Опухоли яичка

Опухоли яичка составляют 2% злокачественных новообразований у мужчин. Основная масса опухолей яичек — злокачественные новообразования; доброкачественные опухоли — большая редкость. Из злокачественных опухолей наиболее часто встречаются герминогенные опухоли и опухоли стромы полового тяжа. Также могут встречаться опухоли лимфоидной и кроветворной ткани, вторичные (метастатические) опухоли, опухолеподобные поражения.

**Герминогенные опухоли** составляют около 97% новообразований яичка. По клеточному составу они могут быть однородными (семинома, эмбриональный рак, хориокарцинома) и неоднородными (тератоидные опухоли).

**Семинома** — наиболее часто встречающаяся герминативная опухоль. Типичная семинома растет в виде одиночных или множественных неинкапсулированных узлов округлой формы. Метастазирует сначала в ближайшие ЛУ, а затем во внутренние органы. Микроскопически опухоль состоит из однотипных овальных клеток крупного или среднего размера. Ядра клеток большие, с нежной структурой хроматина, содержат одно-два ядрышка, располагаются чаще всего эксцентрически. Много фигур деления. Цитоплазма клеток в окрашенных препаратах базофильная из-за большого количества гликогена, вакуолизированная. В препаратах присутствуют лимфоидные элементы, могут встречаться фибробласты, гистиоциты, эпителиоциты и клетки типа Пирогова–Лангханса. При наличии участков некроза опухоль необходимо дифференцировать с туберкулезом.

**Эмбриональный рак** развивается из недифференцированных клеток соматического и внезародышевого типа. Опухоль мягкой консистенции, пестрая на разрезе из-за многочисленных участков некроза. Микроскопически она характеризуется резко выраженным полиморфизмом клеток с преобладанием крупных. Много гигантских одно- и многоядерных делящихся клеток, напоминающих эпителиоциты, с нечеткими границами, крупными пузырьковидными гиперхромными ядрами, содержащими ядрышки. Цитоплазма базофильная. Располагаются клетки отдельно или в виде железистых и сосочковидных структур.

**Тератома** образуется из зародышевых листков. Развивается в любом возрасте. По морфологическим признакам различают зрелую, незрелую и озлокачествленную тератому.

**Зрелая тератома яичка** встречается редко. Состоит в основном из зрелых тканей разного происхождения (железы, кисты, участки ткани печени, ПЖ и ЩЖ, нервной, хрящевой, костной ткани). В ее метастазах обнаруживаются зрелые и незрелые элементы. По морфологической структуре метастазы отличаются от первичной опухоли и нередко напоминают эмбриональный рак или хориокарциному.

**Незрелая тератома** состоит в основном из незрелых тканей, подобных тканям эмбриона. Возможно наличие лимфоидных, хрящевых, соединительнотканых клеток, нейрогенного эпителия. Могут встречаться участки зрелой ткани. Опухоль нередко сочетается с эмбриональным раком.

#### Опухоли полового члена

Опухоли полового члена развиваются из кожи, придатков, пещеристых тел и мочеиспускательного канала.

**Эритроплазия Кейра** — поверхностный внутриэпителиальный рак слизистых оболочек, затрагивающий головку полового члена и внутренний листок крайней плоти. Болезнь Боуэна — внутриэпидермальный рак с единичными или множественными новообразованиями кожи, локализующимися в эпидермисе. Эритроплазия Кейра и болезнь Боуэна представляют собой рак *in situ* головки полового члена и характеризуются разрастанием акантогических тяжей из шиповатых клеток, проникающих глубоко в подлежащие ткани. Среди шиповатых клеток имеются элементы

с большими гиперхромными уродливыми ядрами, многоядерные клетки. В отличие от болезни Боуэна, при эритроплазии Кейра отсутствует очаговый дискератоз. Дерма может быть инфильтрирована воспалительными клетками. Главная опасность в том, что со временем происходит трансформация в плоскоклеточный рак кожи с разрастанием опухоли и метастазированием.

Из морфологических вариантов рака чаще всего развивается плоскоклеточный. Плоскоклеточный рак полового члена чаще всего локализуется на крайней плоти или головке полового члена. Опухоль характеризуется медленным ростом и в случае ранней диагностики хорошо поддается лечению. Цитологическая картина плоскоклеточного рака полового члена такая же, как при плоскоклеточном раке других локализаций.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.7. Цитологическое исследование при патологии серозных оболочек

В норме каждая из серозных полостей содержит небольшое количество серозной жидкости (плевральная и перикардальная — 1–2 мл, брюшная — около 50 мл). Серозная жидкость — это ультрафильтрат плазмы, транссудат, который постоянно продуцируется, реабсорбируется и служит своеобразной смазкой, обеспечивающей скольжение органов при дыхании, сердечных сокращениях, перистальтике.

В клинической практике жидкости серозных полостей, образующиеся при патологических процессах, принято называть **выпотными жидкостями**. В зависимости от механизма образования выпотной жидкости различают транссудаты и экссудаты.

**Транссудат** возникает при нарушении общего и местного кровообращения (сердечно-сосудистая, почечная недостаточность, портальная гипертензия), если гидростатическое или коллоидно-осмотическое давление изменяется в такой мере, что жидкость, фильтрующаяся в серозную полость, превышает объем реабсорбции; при этом листки серозных оболочек не вовлечены в первичный патологический процесс.

**Экссудат** образуется в результате поражения серозных оболочек (из-за повышения проницаемости капилляров серозных оболочек либо при нарушении лимфатического оттока из серозной полости) при инфекциях или опухолях.

Эвакуация выпота проводится пункцией с помещением полученной жидкости в чистую сухую, а при необходимости — в стерильную посуду. Сразу весь объем полученного выпота необходимо доставить в лабораторию. При больших количествах жидкости для исследования направляется последняя порция (как наиболее богатая клеточными элементами) в объеме не менее 1 л. Охлаждение жидкости до 4 °C требуется, если необходимо сохранить материал в течение нескольких дней или транспортировка образца задерживается. Клеточный состав выпота исследуют по цитологическим препаратам, приготовленным из осадка, полученного в результате центрифугирования (5–10 мин при 1500–3000 об/мин). Желательно исследовать не менее пяти мазков.

Микроскопическое исследование нативных препаратов целесообразно применять как вспомогательный прием к основному методу цитологического исследования фиксированных окрашенных мазков. Для уточняющих исследований готовятся либо дополнительные цитологические препараты (для ИЦХИ, FISH, CISH и т.д.), либо клеточные блоки (для ИГХ).

#### Клеточный состав выпотной жидкости

Основными клеточными элементами выпотной жидкости являются клетки крови и рыхлой соединительной ткани (эритроциты, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты, лимфоциты, ПК; гистиоидные элементы), мезотелий, клетки злокачественных новообразований. Возможны трудности в определении гистогенеза обнаруженных клеток, так как при слушивании и длительном пребывании в жидкости клетки могут округляться, подвергаться деструктивно-дистрофическим изменениям, увеличиваться в размерах, терять морфологические особенности исходной ткани.

**Мезотелий** — однослойный плоский эпителий, который выстилает поверхность серозных оболочек и в результате слушивания попадает в выпотные жидкости. Клетки мезотелия могут располагаться разрозненно либо в виде пластов, скоплений, железистоподобных структур. Слушенные с поверхности клетки мезотелия принимают округлую или овальную форму и располагаются преимущественно разрозненно. Диаметр клеток достигает 12–30 мкм. Ядра среднего размера (немногим более эритроцита), округлые или овальные, расположены центрально либо несколько эксцентрически. Ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону цитоплазмы. Хроматин мелкозернистый или смазанный, распределен равномерно. Иногда в ядре видно небольшое ядрышко. Цитоплазма относительно широкая, с различной интенсивностью окраски.

При пролиферации мезотелия под действием инфекций, травм, ЛС, диссеминации злокачественного процесса увеличиваются общее количество и размеры клеток. Ядра увеличены, гиперхромные, отмечается резкая базофилия цитоплазмы и ядрышек (за счет увеличения содержания РНК в интенсивно пролиферирующих клетках), встречаются клетки с увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением; можно обнаружить клетки, в которых ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону ядра. При острых воспалительных процессах клетки мезотелия могут приобретать выраженные признаки атипии, их становится трудно отличить от клеток рака. При хронической сердечной и почечной недостаточности бо́льшая часть клеток мезотелия находится в состоянии дегенерации; резко выраженных признаков пролиферации с атипией нет.

#### Классификация цитологических заключений

Для классификации цитологических заключений по материалу выпотных жидкостей разработана Международная стандартизованная терминология (TIS), включающая пять категорий:

- **TIS I** — Non-Diagnostic (ND) — недиагностический образец;
- **TIS II** — Negative for Malignancy (NFM) — образец отрицательный по наличию злокачественного новообразования;
- **TIS III** — Atypia of Undetermined Significance (AUS) — атипия неопределенного значения;

- **TIS IV** — Suspicious for Malignancy (SFM) — подозрение на наличие злокачественного новообразования;
- **TIS V** — Malignant (MAL) — злокачественное новообразование.

## Глава 5. Клиническая цитология

**TIS I. Недиагностический образец (ND).** Образец с недостаточным для цитологического заключения количеством клеточных элементов — бесклеточный или практически бесклеточный материал без атипии либо материал с факторами, затрудняющими интерпретацию клеточных элементов, а именно:

- плохой фиксацией препарата (как следствие — дегенерация и разрушение клеточных элементов, ограничение проникновения красителя в клетку);
- толстым препаратом (клетки невозможно просмотреть);
- неполноценным окрашиванием препарата (изменения в плохо прокрашенных клетках невозможно оценить).

Для установления категории TIS I должно быть обработано не менее 50–75 мл жидкости (максимального объема не существует). Образец, соответствующий критериям любой другой категории, не может считаться недиагностическим, даже если клеточность или объем выпотной жидкости небольшие. При получении недиагностического образца в случае накопления жидкости исследование следует повторить.

**TIS II. Образец отрицательный по наличию злокачественного новообразования (NFM).** Выпот представлен клетками, в которых полностью отсутствуют признаки злокачественного процесса, например при остром воспалении серозных оболочек (плевриты при пневмонии, СКВ, других воспалительных и инфекционных болезнях); реактивный выпот при застойных явлениях. В реактивном выпоте при TIS II могут присутствовать клетки мезотелия неизмененные, с реактивными, дегенеративными изменениями, двухъядерные, многоядерные; гистиоидные элементы, в том числе «гигантские многоядерные»; клетки крови — лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, ПК. Клеточная атипия отсутствует или минимальная.

К категории TIS II относится более 80% выпотных жидкостей. Клиническая тактика при TIS II — симптоматическая терапия основного соматического заболевания и адекватное динамическое наблюдение.

**TIS III. Атипия неопределенного значения (AUS).** Изменения в выпоте при AUS ближе к доброкачественным (реактивным дегенеративным) изменениям в клетках, чем к злокачественному поражению. Эти изменения являются истинной серой зоной, и их можно охарактеризовать как крайнюю степень реактивной атипии. В выпоте при TIS III могут присутствовать клетки мезотелия с резко выраженными реактивными, дегенеративными изменениями, расположенные как разрозненно, так и в скоплениях, шаровидных папиллярных структурах, которые позволяют предположить, что образец следует включить в категорию TIS II, но уверенность в доброкачественности которых остается неопределенной. В перитонеальной жидкости могут встречаться эпителиальные клетки при доброкачественных или пограничных опухолях, которые трудно однозначно идентифицировать; выраженная лимфоидная инфильтрация без явных признаков лимфопролиферативного заболевания, но с изменениями для подтверждения доброкачественности которых желательна корреляция с результатами проточной цитометрии.

При категории TIS III цитологический диагноз устанавливается в два этапа:

- 1-й этап — предварительное заключение (только на основании морфологических изменений в клетках);
- 2-й этап — окончательное заключение (на основании дополнительных методов исследования).

На основании дополнительных исследований, как правило, удастся установить более определенную категорию — TIS II (чаще) либо TIS V (реже). В случае если результаты дополнительного исследования остаются неубедительными, категоризация диагноза остается прежней — TIS III.

**TIS IV. Подозрение на наличие злокачественного новообразования (SFM).** В выпоте присутствуют клетки с подозрительными изменениями, не позволяющими уверенно установить диагноз злокачественного новообразования, а именно клетки с нерезко выраженными признаками злокачественности, подозрительные по наличию метастаза злокачественного новообразования, или лимфоидные клетки с атипией, подозрительные по наличию лимфопролиферативного заболевания, или клетки мезотелия с атипией, подозрительные по мезотелиоме.

**TIS V. Злокачественное новообразование (MAL).** В выпоте присутствуют клетки злокачественного новообразования. Для уточнения локализации метастаза и гистологической формы опухоли рекомендуется проведение дополнительных методов исследования — ИЦХИ, FISH, проточной цитометрии.

**Мезотелиома** — первичная опухоль серозных оболочек, встречается в плевре, брюшине и перикарде. Это достаточно редкое заболевание. В серозной полости экссудат, как правило, скапливается уже на ранних стадиях заболевания. Выпот геморрагический или серозный, иногда вязкий, тягучий. Для мезотелиомы плевры характерно одностороннее поражение. Заболеванию свойственно быстрое накопление больших объемов жидкости (до 3 л), иногда в течение одного дня, несмотря на систематическую эвакуацию.

Клеточный состав экссудата при мезотелиоме в каждом случае отличается своеобразием. По совокупности наиболее общих морфологических признаков цитограммы при мезотелиоме могут быть разделены на три основные группы.

- Цитограмма с картиной регенераторно-пролиферативных процессов, где клеточные элементы сходны с пролиферирующим мезотелием.
- Цитограмма с картиной железистого рака.
- Цитограмма смешанного типа. Присутствуют клетки эпителиоподобные и веретенообразные (сходные с элементами соединительной ткани). Эпителиоподобные клетки преимущественно округлые, иногда кубические, значительно различаются по размерам, располагаются чаще разрозненно, небольшими скоплениями.



Ядра клеток разной величины, овальной формы, часто с неровными контурами, расположены центрально либо эксцентрически. Встречаются бугристые ядра с почкованием. Структура хроматина неравномерная, мелкозернистая либо мелкоглыбчатая. Часть ядер гиперхромные с гипертрофированными ядрышками. Цитоплазма окрашена неравномерно, окружает ядра в виде ободка; вокруг ядра нередко имеется светлый узкий ободок. Клетки соединительнотканного типа сходны с фибробластами или фиброцитами, располагаются в виде пучков, тяжей, скоплений и разрозненно. Они мелкого размера, веретенообразной или вытянутой формы, часто с отростками разной длины. Ядра клеток округлой или овальной формы. Многие ядра гиперхромные, среднего, иногда крупного размера с неровными контурами, неравномерным рисунком хроматина. Оба типа клеточных элементов (эпителиального и соединительнотканного) перемешаны в цитограмме, нередко образуют взаимосвязанные скопления. Для мезотелиомы характерна выраженная экспрессия иммуноцитохимических маркеров HBME-1, кальретицина, WT-1; коэкспрессия общих цитокератинов и виментина.

## Глава 5. Клиническая цитология

### Поражение серозных оболочек при метастазах

**Диссеминация рака легкого.** В экссудате могут быть определены три основные формы: аденокарцинома, мелкоклеточный и плоскоклеточный рак.

**Метастазы аденокарциномы** встречаются наиболее часто, характерно обилие элементов опухоли с выраженной атипией и полиморфизмом. Опухолевые клетки в экссудате присутствуют в виде комплексов округлой или неправильной формы, железистоподобных структур, симпластов. Характерен выраженный полиморфизм ядер — крупные, округлые, овальные и причудливой формы. В ядрах выявляются гипертрофированные одиночные или множественные ядрышки. Цитоплазма разнообразна по интенсивности окрашивания. Наряду с клетками, имеющими интенсивно окрашенную цитоплазму, встречаются клетки с серовато-голубоватой или почти бесцветной цитоплазмой, а также с округлыми и ворсинчатыми выростами цитоплазмы. Секретирующие клетки, в том числе клетки типа перстневидных, встречаются часто и в значительном количестве. Для аденогенного рака легкого характерна экспрессия фактора TTF-1, выражена экспрессия CK7 при отрицательной или слабой экспрессии CK20.

Клетки **мелкоклеточного рака** расположены в виде однослойных и многослойных скоплений, пластов, коротких рядов и цепочек, комплексов округлой или неправильной формы. При тесном прилегании клетки как бы приспособляются друг к другу, образуя вдавления («фасетки») на близлежащих элементах. Диаметр клеток составляет 13–16 мкм, размер опухолевых клеток может быть меньше размера клеток мезотелия, их не всегда легко обнаружить и правильно интерпретировать, особенно при расположении небольшими скоплениями или разрозненно. Ядра клеток округлые, окрашиваются чаще в светлые тона и имеют мелкозернистый или мелкоглыбчатый рисунок хроматина; занимают почти всю клетку, располагаясь чаще центрально, реже — эксцентрически. Цитоплазма большинства клеток окружает ядро в виде узкого ободка, часто совсем не видна. Клетки мелкоклеточного рака экспрессируют нейроэндокринные иммуноцитохимические маркеры — хромогранин А, синаптофизин, S-100 протеин; при крупноклеточном нейроэндокринном раке отмечается также экспрессия CD56, PЭА.

Клеточные элементы **плоскоклеточного рака** в экссудате наблюдаются нечасто из-за редкой диссеминации этой формы рака по серозному покрову. Первичным очагом поражения наиболее часто бывает рак легкого, но опухоль может исходить из пищевода, ШМ. Наиболее легко в экссудате распознаются клетки плоскоклеточного рака с ороговением, даже если они расположены разрозненно и имеются в небольшом количестве. Клетки нередко имеют полигональную и вытянутую форму, что позволяет с уверенностью отличить их от клеток аденокарциномы. Ядра клеток пикнотичные или гиперхромные, с грубым рисунком хроматина и неровными контурами, резко выделяются на фоне светлой цитоплазмы. Цитоплазма чаще светло-голубая или почти бесцветная, по структуре гомогенная или стекловидная за счет накопления кератогиалина. Помогает установлению цитологического диагноза постоянное присутствие клеток с выраженными признаками дегенерации и частичного распада, наличие клеточного детрита, нейтрофильных лейкоцитов, что свойственно плоскоклеточному раку с ороговением. Для плоскоклеточного рака характерна экспрессия белков p63, p40 при отсутствии экспрессии Ber-EP4.

**Диссеминация рака МЖ.** Наиболее характерный признак рака МЖ — образование из опухолевых клеток скоплений шаровидной или овальной формы, напоминающих очертания концевых протоков и ацинусов МЖ. Клетки в таких образованиях относительно мономорфны, среднего размера; в центре структуры расположены без определенного порядка, по периферии вытянуты. Наряду с округлыми шаровидными образованиями имеются папиллярные структуры, а также комплексы неправильной формы. Выявление характерной группы клеток в виде шарообразных структур позволяет отнести их к опухолевым, особенно в тех случаях, когда клетки имеют небольшие размеры и отличаются мономорфизмом. Из иммуноцитохимических маркеров при раке МЖ могут экспрессироваться ER, PR, CK7; экспрессия CK20 отсутствует или слабоположительна.

**Диссеминация рака яичника.** Наиболее частая форма злокачественных опухолей яичников — серозная аденокарцинома. Клеточные элементы характеризуются выраженным полиморфизмом, обилием папиллярных (сосочкоподобных) и железистоподобных структур; встречаются округлые комплексы, а также разрозненно расположенные клетки. Наряду с мелкими имеются клетки большого и гигантского размера, нередко с преобладанием последних. Папиллярные структуры могут состоять преимущественно из больших и гигантских клеток либо из клеток небольших и средних размеров; иногда из клеток разного размера. Резко полиморфные клетки с выраженными признаками атипии иногда составляют всю массу клеточных элементов; располагаются такие клетки разрозненно, не образуя комплексов. Ядра клеток крайне разнообразны по величине, форме и окраске. Встречаются элементы с выраженной вакуолизацией цитоплазмы. В клетках с признаками секреции апикальная часть цитоплазмы нередко окрашена оксифильно. Слизь примыкает к периферии клетки в виде ободка или тонких длинных волокон, имеющих сходство с ресничками. Иногда в препаратах наблюдается апокринный тип секреции с отделением части цитоплазмы,

причем прослеживаются все стадии — от небольшого взбухания до полного отрыва кусочка цитоплазмы, окруженного слизистыми массами. Для серозного рака яичников характерна экспрессия иммуноцитохимических маркеров CA125, WT-1, CK7, PAX8.

## Глава 5. Клиническая цитология

**Диссеминация рака желудка.** Клетки в экссудате располагаются преимущественно разрозненно либо в виде рыхлых комплексов, скоплений железистоподобных структур. Папиллярные структуры в выпоте встречаются крайне редко. Наиболее характерным и специфичным для рака, исходящего из желудка, является интенсивная окраска ядра на фоне светлой, пенистой и вакуолизированной цитоплазмы. Эта морфологическая особенность клеток является отражением их секреторной функции. При резко выраженной секреторной функции клетки с гиперхромными ядрами и светлой пенистой цитоплазмой составляют подавляющее большинство опухолевых элементов. Особенность клеток рака желудка — эксцентрическое расположение ядер по самому краю клетки, когда они сливаются с ее контурами. При этом край ядра редко бывает выпуклым, он либо имеет вид прямой линии, либо становится вогнутым, что придает ядру серповидную форму. Для опухолевых клеток при диссеминации рака желудка характерна экспрессия CK7, CK20 и CDX2, PЭА.

**Экссудат при В-клеточной лимфоме** из малых лимфоцитов (ХЛЛ) отличается мономорфным клеточным составом, где основной тип клеток составляют малые лимфоциты, имеющие скудную светлую цитоплазму и округлое ядро с грубым комковатым хроматином, ядрышки не определяются. На этом фоне в небольшом количестве могут встречаться более крупные клетки среднего (центроциты) и крупного (параиммунобласты) размера. Центроциты — клетки среднего размера с расщепленными, угловатыми ядрами и неравномерно распределенным, более рыхлым, чем в зрелых лимфоцитах, хроматином. Параиммунобласты — крупные клетки с округлым ядром, крупным центральным ядрышком и светлой цитоплазмой (в отличие от иммунобластов). Митозы не обнаруживаются. Иммунофенотип В-клеточной лимфомы из малых лимфоцитов характеризуется экспрессией пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20 и CD79a, а также коэкспрессией CD5 и CD23. Для лимфобластной лимфомы характерно появление большого числа клеток типа бластов с крупными рыхлыми ядрами, нежно-сетчатым рисунком хроматина. В части клеток хорошо просматриваются гипертрофированные ядрышки. В целом специфический эссудат может образоваться при любом варианте лимфом. Большое значение в дифференциальной диагностике вариантов лимфом будет иметь ИЦХИ.

**Экссудат при метастазе меланомы** представлен большим числом элементов опухоли разных размеров, преобладают крупные и гигантские. Расположены клетки преимущественно разрозненно, изредка небольшими скоплениями. Преобладают клетки, сходные с эпителиальными, — округлой, кубической, иногда полигональной формы. Могут встречаться вытянутые клетки с единичными отростками разной длины. Ядра клеток разной величины и формы (округлые, бобовидные, причудливые) располагаются центрально либо эксцентрически, окрашены неравномерно, содержат резко гипертрофированные ядрышки. Встречаются двухъядерные и многоядерные клетки. Цитоплазма в одних клетках — в виде неширокого ободка, в других — обильная с четкими, ровными или слегка волнистыми контурами, иногда растекается между соседними клетками или эритроцитами. В цитоплазме клеток может содержаться пигмент меланин в виде глыбок и зерен разной величины. Для метастаза меланомы характерна экспрессия маркеров HMB45, мелан А, S-100-протеина, SOX10.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.8. Цитологическое исследование щитовидной железы

Материал для цитологического исследования ЩЖ получают с помощью ТАБ. Пункцию проводят под контролем УЗИ или компьютерной томографии без анестезии стерильным одноразовым шприцем объемом 5–10 мл с иглами длиной 4 см и наружным диаметром 0,8 мм с мандреном. При размерах узла менее 5 мм в диаметре абсолютная точность попадания иглы в очаг поражения проблематична. При одиночном узле диаметром менее 1 см пунктируют центр узла; при размерах узла более 1 см пунктируют его центр и периферию. При наличии двух и более узлов пунктируют только два узла, отдавая предпочтение гипоехогенным узлам с нечеткими неровными контурами, наличием микрокальцинатов и выходом за контуры ЩЖ (то есть при наличии ультразвуковых признаков, наиболее неблагоприятных с точки зрения онкологического риска). С учетом последнего пункцию обязательно проводят в зоне диффузных изменений ЩЖ.

#### Клеточный состав щитовидной железы

**Фолликулярные клетки**, или тироциты (А-клетки), составляют основную массу клеток ЩЖ; это мелкие клетки кубического эпителия, выстилающие фолликул. Стимуляция железы сопровождается увеличением объема и высоты тироидного эпителия; затем возрастает число клеток, и происходит их выпячивание в коллоидное пространство.

**Онкоциты (клетки Ашкенази, или клетки Гюртле)** — крупные фолликулярные клетки с обильной эозинофильной цитоплазмой, не продуцирующие тироидные гормоны, — в норме их немного.

**Парафолликулярные (С-клетки)** — крупные светлые клетки с бледной цитоплазмой — являются клетками нейроэндокринной системы. Название их происходит от первой буквы названия вещества *calcitonin*, который они продуцируют.

Между фолликулами диффузно разбросаны кровеносные капилляры и нервные окончания, непосредственно контактирующие с наружной поверхностью фолликула. Внутри каждого фолликула имеется коллоид, в состав которого входит тиреоглобулин.

При исследовании цитологического материала обращают внимание на его клеточность, присутствие лимфоидных элементов, макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов, фибробластов, эпителиоидных клеток. Важное значение имеет расположение клеток (разрозненно, в структурах), размер и типы структур (фолликулярные, шаровидные, папиллярные, однослойные, многослойные пласты). Отмечают размер и характер клеток, ядер, ядрышек. Имеют

значение присутствие, количество и характер коллоида. В цитологических препаратах коллоид имеет вид гомогенного бесструктурного вещества. Цвет его варьирует в зависимости от его количества и распределения по стеклу от нежно-розового, «размытого», до интенсивно-фиолетового или синего.

### **Классификация цитологического материала**

Введение в широкую практику системы классификации цитологического материала (The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology — TBSRTC) стало основой в диагностике новообразований ЩЖ. В классификации Bethesda 2023 г. выделено шесть диагностических категорий.

**I. Недиагностический материал. Non-diagnostic.** К недиагностическому материалу относят материал, содержащий менее шести групп хорошо сохранившихся, хорошо окрашенных и хорошо просматриваемых фолликулярных клеток (минимум по 10 клеток в каждой группе); плохо подготовленные, плохо окрашенные или непросматриваемые фолликулярные клетки; жидкость, полученная при пункции кисты, содержащая только макрофаги. Допускается несколько исключений из правила адекватности: наличие клеток с атипией, со`лидные узлы с воспалением, с лимфоцитарным тиреоидитом Хасимото, абсцессом или гранулематозным тиреоидитом, содержащие только элементы воспаления и коллоидные узлы с обильным плотным коллоидом. Такие случаи интерпретируют как доброкачественные, а не как недиагностические. Риск злокачественного новообразования — 5–20%.

**II. Доброкачественное неопухоловое поражение. Benign.** Гистологически данные поражения классифицируются как узловатая гиперплазия в узловом зобе, гиперпластические (аденоматозные) узлы, коллоидные узлы, узлы при болезни Грейвса и подтип фолликулярных аденом макрофолликулярного строения. Доброкачественные узлы характеризуются различным количеством коллоида, доброкачественных фолликулярных клеток, онкоцитов и макрофагов. Последнее издание TBSRTC рекомендует использовать термин «фолликулярная узловатая болезнь» в качестве основного диагноза в цитологических заключениях вместо терминологии доброкачественных фолликулярных узелков, использовавшейся в предыдущих изданиях. Подклассификации, такие как коллоидные узелки или болезнь Грейвса, могут применяться по мере необходимости на основе цитоморфологических данных и клинического контекста. Риск злокачественного новообразования — 2–7%.

**III. AUS.** К данной категории относят образцы с клеточной и/или структурной атипией, не удовлетворяющие критериям категории фолликулярной опухоли, подозрительной по принадлежности к злокачественному новообразованию. Однако наличие атипии не позволяет уверенно трактовать их как доброкачественные изменения. Причинами, способствующими неопределенности, являются: скудный клеточный состав, или значительное число элементов крови, или чрезмерное свертывание; преобладание микрофолликулов в скудном клеточном материале со скудным коллоидом; наличие онкоцитов при отсутствии фолликулярного эпителия и лимфоидных элементов и со скудным коллоидом; признаки папиллярного рака: в том числе ядерные борозды, увеличенные ядра с бледным хроматином и изменения в контуре и форме ядра на фоне тиреоидита Хасимото или в препаратах с обильным коллоидом и наличием доброкачественных фолликулярных клеток; наличие уплощенных клеток, выстилающих кисту, с признаками атипии из-за ядерных бороздок, заметных ядрышек, удлинённых ядер и цитоплазмы и/или внутриядерных цитоплазматических включений в материале, который в общем является доброкачественным. Риск злокачественного новообразования — 13–30%.

## **Глава 5. Клиническая цитология**

**IV. Фолликулярная опухоль. Follicular Neoplasm.** Цель выделения этой категории заключается в выявлении узлов, которые потенциально могут оказаться злокачественными. Диагноз фолликулярного рака устанавливается при гистологическом исследовании при обнаружении прорастания капсулы или при инвазии сосудов опухолевыми клетками. При цитологическом исследовании невозможно достоверно отличить фолликулярную аденому от фолликулярного рака. Критериями для включения в данную категорию являются расположение фолликулярных клеток преимущественно в микрофолликулярных структурах (не менее 50% пункционного материала) с нагромождением клеток, скудный коллоид. В данной категории отдельно выделяют онкоцитарную фолликулярную неоплазию — опухоль, состоящую из онкоцитов. Риск злокачественного новообразования — 23–34%. Тактика: молекулярное тестирование, диагностическая лобэктомия.

**V. Предположительно, злокачественная опухоль. Suspicious for Malignancy.** Если цитологических критериев злокачественного процесса количественно или качественно недостаточно, то диагноз злокачественной опухоли нельзя формулировать уверенно и лучше всего дать предположительное заключение о злокачественном новообразовании.

Неинвазивная фолликулярная опухоль с ядерными признаками папиллярного рака и фолликулярный вариант папиллярного рака составляют значительную долю новообразований, скрытых в этой категории. Риск злокачественного новообразования — 67–83%. Молекулярное тестирование, тиреоидэктомия или лобэктомия.

**VI. Злокачественная опухоль. Malignant.** Эта категория используется, когда цитологические признаки злокачественности являются неоспоримыми. К данной категории относятся следующие типы рака ЩЖ: фолликулярный рак, папиллярный рак, медулярный рак, анаплазированный рак. В ЩЖ могут встречаться неэпителиальные опухоли (лимфома, плазмоцитома), а также метастазы опухолей других локализаций.

Цитологическая диагностика этих опухолей крайне затруднительна без дополнительных ИЦХИ. Риск злокачественного новообразования — 97–100%.

Критерии для диагноза фолликулярного рака: обильный клеточный состав, фолликулярные структуры с атипией (нагромождение и атипия ядер в фолликулах, тангенциальное расположение ядер по периферии клеток), легкая ранимость клеток, присутствие «голых» ядер с атипией, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения, ядра округлой, овальной, вытянутой формы с неровными контурами ядерной мембраны, грубозернистым или грубоглыбчатым хроматином, укрупненными ядрышками. Коллоид необильный.

Критерии для диагноза папиллярного рака: фолликулярные клетки, расположенные в сосочкоподобных структурах, синцитиях с увеличенными овальными или неправильной формы ядрами, характерно наличие борозд и внутриядерных включений, могут встречаться псаммомные тельца.

Критерии медуллярного рака: умеренно обильный или обильный клеточный состав, клетки полигональной, округлой или веретенообразной формы с мелкозернистым хроматином.

Критерии анаплазированного рака: опухолевые клетки, расположенные группами или разрозненно вытянутой, веретеновидной, или неправильной формы, выраженный ядерный полиморфизм, многоядерность и нейтрофильная инфильтрация цитоплазмы опухолевых клеток. Высокая митотическая активность. Риск злокачественности — 97–99%. ДЧ ТАБ в выявлении рака ЩЖ составляет 70–98% (в среднем около 80%), ДС — 70–100% (в среднем 92%). Основным ограничением ТАБ ЩЖ является отсутствие достоверных критериев, которые бы позволили на клеточном уровне дифференцировать фолликулярную аденому от фолликулярного рака ЩЖ, а также от фолликулярного варианта папиллярного рака. В связи с этим разрабатываются дополнительные ИЦХИ и генетические методы дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ.

ИЦХИ и молекулярно-генетическое исследование возможны на материалах ТАБ, позволяют проводить иммунологический анализ цитологического материала в условиях сохранения морфологии клеток, оценить, действительно ли клетки в конкретном образце экспрессируют данные антитела. Использование молекулярно-генетических методов диагностики позволяет избежать как ненужной операции, так и повторного вмешательства. Для пациентов с неясной цитологией показано проведение генетического анализа на широкий спектр мутаций в генах ***BRAF***, ***TERT***, ***KRAS***, ***NRAS***, ***HRAS***, ***RET/PTC***, ***PAX8/PPARG***, который позволяет увеличить выявляемость рака ЩЖ и сократить время постановки диагноза, выделить группы риска по развитию тиреоидной патологии у ближайших родственников, подлежащих динамическому диспансерному наблюдению.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.9. Цитологическая диагностика опухолей костей

#### Первичные опухоли костей

Первичные опухоли костей (доброкачественные, злокачественные) подразделяют на ***костеобразующие, хрящеобразующие, фиброгенные опухоли, сосудистые опухоли, опухоли хорды, недифференцированные мелкокруглоклеточные саркомы костей, кроветворные новообразования костей, остеокластические гигантоклеточные***; другие мезенхимальные опухоли костей. В дифференциальной диагностике опухолей костей важно учитывать возраст, локализацию, рентгенологические данные.

***Остеогенная саркома*** чаще встречается у детей и молодых людей (до 20 лет), в основном поражает длинные трубчатые кости, область коленного сустава. Клетки расположены беспорядочно, разрозненно или в скоплениях, часто окружены остеонидом (аморфным или волокнистым). Резко выражен клеточный полиморфизм: размеры клеток — от мелких до крупных, встречаются многоядерные клетки; клетки округлые, овальные, полигональные, границы нечеткие. Ядра клеток полиморфны: мелкие, округлые, овальные, бобовидные, уродливые, среднего, крупного, гигантского размера, расположены центрально или эксцентрически. Ядрышки часто не просматриваются, но иногда обнаруживают два и более ядрышек с выраженным полиморфизмом. Рисунок хроматина мелко- или крупносетчатый, петлистый, глыбчатый, бывает стертым.

***Хондросаркома*** чаще встречается в возрасте от 30 до 70 лет, может поражать кости любой локализации. Клеток немного, располагаются разрозненно, иногда небольшими группами. Характерны клетки слабо прокрашенные, разного размера и формы, заключенные в тяжистое межклеточное вещество хондроидного или миксоидного вида. Выражен клеточный и ядерный полиморфизм, ядра округлые, бобовидные, сегментированные, располагаются чаще эксцентрически. Рисунок хроматина сетчатый, неравномерный. Ядрышки чаще не просматриваются или одно-три, крупные, неправильной формы. Границы клеток неровные. Цитоплазма умеренная или обильная, почти прозрачная, оксифильная или слабо базофильная, может быть зернистой, вакуолизированной. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в сторону цитоплазмы. Фон — розовое аморфное или волокнистое межклеточное вещество.

***Опухоль (саркома) Юинга*** чаще встречается у детей и молодых людей (до 20 лет), поражает в основном длинные трубчатые кости. Клеточный состав обильный, клетки располагаются в тяжах, иногда формируют розеткоподобные структуры. Как правило, отсутствует или слабо выражен клеточный и ядерный полиморфизм. Клетки среднего размера, округлые, овальные, с четкими границами. Ядра среднего и мелкого размера, округлые или овальные, расположены центрально. В ядре видны два-четыре мелких округлых ядрышка. Рисунок хроматина равномерный, пылевидный, нежно-сетчатый или нежно-зернистый. Цитоплазма скудная, бывает от слабо до резко базофильной; иногда отмечается вакуолизация. Ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в сторону ядра. В качестве фона препарата встречаются обрывки сосудов, элементы воспаления.

***Гигантоклеточная опухоль*** обычно встречается у взрослых (30–50 лет), преимущественно поражает длинные трубчатые кости. Клеточный состав обильный, клетки располагаются разрозненно, небольшими группами, обнаруживают значительное число многоядерных клеток типа остеокластов (50–100 ядер), встречаются одноядерные клетки. Клеточный полиморфизм выражен слабо, в основном в одноядерных клетках. Клетки среднего размера, округлые, овальные, полигональные, многоядерные клетки очень крупные. Границы клеток могут быть четкими, ровными, могут быть выражены слабо. Ядра мономорфные, округлые, овальные, расположены центрально или эксцентрически. В части клеток обнаруживают ядрышки. Хроматин мелкозернистый или петлистый, распределен равномерно. Цитоплазма базофильная, отростчатая, иногда вакуолизирована; в многоядерных клетках — обильная, зернистая.

#### Метастазы в костном мозге

Метастазирование в костный мозг происходит гематогенным путем. Элементы костномозгового кроветворения в отпечатках из трепанобиоптата вначале могут присутствовать, затем кроветворные клетки вытесняются опухолевым клоном, в результате в препаратах их находят в небольшом количестве. В зависимости от формы первичной опухоли обнаруживают структуры, характерные для аденогенного рака (МЖ, простата, легкое), НЭО, в том числе мелкоклеточного рака (разрозненное расположение, клетки приспосабливаются друг к другу), меланомы (клетки веретенообразной или полигональной формы) и других опухолей.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.10. Новообразования и другие патологические процессы кожи

Кожа состоит из эпидермиса, дермы, придатков кожи.

**Эпидермис** развивается из эктодермы, в нем различают четыре слоя: роговой (*stratum corneum*), зернистый (*stratum granulosum*), шиповатый (*stratum spinosum*) и слой базальных клеток (*stratum basalis*). Роговой слой представлен безъядерными негомогенными отложениями кератина (кератогиалина), зернистый и шиповатый слои — кератиноцитами, отделенными друг от друга межклеточными мостиками и дендритическими клетками без межклеточных мостиков. В базальном слое располагаются молодые незрелые герминативные клетки, из которых развиваются другие плоские клетки. Меланоциты — клетки нейроэндокринной системы, вырабатывающие меланин. **Дерма** состоит из папиллярного (поверхностного) и ретикулярного (глубокого) слоев.

**Придатки кожи** — потовые железы и волосные фолликулы, соединенные с сальной железой. В верхней части волосного фолликула обитают микроорганизмы.

Кроме структурных, в коже располагаются специализированные клетки.

**Клетки Меркеля (нейроэндокринные клетки)** вместе с прилегающими к ним видоизмененными дендритами чувствительных нейронов (дисками Меркеля) обеспечивают тактильную чувствительность.

**Клетки Лангерханса** являются разновидностью макрофагов. Они мигрируют в кожу из костного мозга, образуют разветвленные дендриты, в цитоплазме содержат значительное количество лизосом, а также фагоцитированные гранулы меланина. Они могут захватывать антигены и передавать Т-хелперам, способны индуцировать пролиферацию Т-лимфоцитов; первыми из иммунокомпетентных клеток контактируют с антигенами внешней среды и обеспечивают местные защитные реакции эпидермиса, продуцируют IL-1, IFN.

**Нейроэндокринные клетки** способны вырабатывать нейронспецифические полипептидные гормоны и биогенные амины, осуществляют местную паракринную регуляцию в ответ на действия каких-либо сигналов.

**Меланоциты** относятся к нейроэндокринным клеткам, но основная их функция — выработка меланина.

Перед получением материала для исследования пораженный участок рассматривают через лупу или дерматоскоп. Корочки с поверхности удаляют. Для получения соскоба или отпечатка используют элеватор. В некоторых случаях образование пунктируют. При малейшем подозрении на меланому пункция противопоказана, но возможно взятие отпечатков при изъязвлении первичного очага.

#### Поражения из эпидермиса

**При буллезных поражениях** получение материала с эрозированной поверхности вскрытого пузыря позволяет с уверенностью высказаться о герпетической инфекции или пузырчатке. При высыпаниях, связанных с **герпетической инфекцией**, в препаратах обнаруживают значительное число элементов воспаления, гигантские многоядерные клетки; ядра, как правило, располагаются в центре, приспосабливаются друг к другу, границы ядер четкие, хроматин гладкий, размытый, «смазанный». При **пузырчатке** фон препарата «чистый» или кровянистый, измененные клетки (акантолитические клетки) среднего и крупного размера. Ядра неправильной формы, хроматин грубоватый, встречаются ядрышки неправильной формы. Цитоплазма окрашена неравномерно: в центре более светлая, по периферии базофильная, переход от светлого к темному плавный, встречаются мелкие вакуоли, края «кружевные».

**Базальноклеточный рак (базалиома)** имеет излюбленную локализацию на лице. Это образование с жемчужно-белыми краями с изъязвлением в центре, или гладкий узелок с расширенными сосудами, или плоская структура с плохо различимыми границами. В отпечатках с изъязвленной поверхности обнаруживают много клеток, расположенных преимущественно в плотных пластах. Клетки мелкие, гиперхромные, со скудной цитоплазмой и нечеткими границами, часто отмечают палисадообразное расположение клеток по периферии пластов. Клеточный и ядерный полиморфизм выражен слабо.

**Плоскоклеточный рак** проявляется как язва с неровными краями. Опухолевые клетки расположены в пластах и разрозненно из-за потери межклеточных связей. Форма клеток причудливая, ядра крупные гиперхромные. Много нейтрофильных лейкоцитов, могут встречаться эозинофилы. Чаще всего диагностируется высокодифференцированный рак (с ороговением), в этом случае цитоплазма клеток плотная, блестящая.

**Нейроэндокринный рак (рак из клеток Меркеля)** — обнаруживают структуры из клеток, расположенные разрозненно, хроматин равномерно-зернистый. В цитоплазме можно обнаружить нежную зернистость розоватого цвета.

#### Опухоли из меланоцитов

Невусная клетка — меланоцит, образующий эпидермальные или дермальные структуры невуса.

**Меланоцитарный невус** — доброкачественный меланоцитарный пролиферат в эпидермисе или дерме. К периоду полового созревания невусы обнаруживают у 98–100% людей. В 20–25 лет бывает в среднем по 40 невусов кожи, излюбленные локализации — лицо, шея, предплечье, плечо. Мазок, как правило, скудный, преобладают разрозненные клетки с пузырьковидными ядрами. Форма невусных клеток кубическая, иногда веретенообразная. В части клеток можно встретить меланин. Малигнизации подвергается 1 из 10 000 невусов. Причина малигнизации: механическая травма — ушибы, ссадины, порезы, хроническая травма (одежда, обувь). Риск возникновения меланомы кожи возрастает при наличии у человека более 50 невусов, особенно экзофитной формы (родинки).

## Глава 5. Клиническая цитология

**Диспластические невусы** — множественные пигментные невусы, преимущественно на коже волосистой части головы, верхних конечностей, туловища. Края — неровные, фестончатые, иногда неравномерная окраска (черная, коричневая, розовая). Размер — 5–20 мм. Именно диспластические невусы наиболее часто малигнизируются.

**Меланома** — злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов. Преимущественно локализуется в коже, реже — сетчатке глаза, слизистых оболочках (полость рта, влагалище, прямая кишка). Одна из наиболее опасных злокачественных опухолей человека, часто рецидивирующая и метастазирующая лимфогенным и гематогенным путем почти во все органы.

При **эпителиоподобном типе меланомы** клетки округлой, овальной, неправильной формы, располагаются разрозненно, напоминают клетки эпителия. Ядра «сочные», лопастные, бобовидные зеркальные, встречаются «отшнуровка», почкование, фрагментация ядер. Структура хроматина относительно равномерная, петлистая, зернистая. Характерны внутриядерные цитоплазматические включения. Цитоплазма базофильная или светлая, плотная, по периферии часто окрашена более интенсивно, контуры ровные или фестончатые. В части опухолевых клеток и макрофагах обнаруживают меланин в виде капель (гранул) коричневатого цвета. Наличие меланина в клетках может проявляться как запыленность цитоплазмы.

При **веретенноклеточном** и **смешанно-клеточном** типе меланомы обнаруживают клетки вытянутой или веретенообразной формы с отростками.

## Глава 5. Клиническая цитология

### 5.5.11. Цитологические исследования материала из лимфатических узлов

Лимфатическая система, часть которой составляют ЛУ, чувствительна к развитию патологических процессов в организме. В ЛУ возникают как первичные злокачественные опухоли, так и метастазы злокачественных новообразований. Цитологическое исследование благодаря применению ТАБ в течение короткого времени и с высокой достоверностью позволяет верифицировать характер патологического процесса в ЛУ. ТАБ ЛУ позволяет получить полноценный клеточный материал для цитологического исследования, ИЦХИ и молекулярно-генетических исследований. Результаты цитологического исследования ЛУ должны сопоставляться с клинической картиной и состоянием периферической крови. Основные задачи цитологического исследования ЛУ:

- 1) дифференциальная диагностика злокачественных процессов от доброкачественных и реактивных состояний;
- 2) подтверждение или исключение метастазов рака, в том числе интраоперационно;
- 3) уточнение гистогенеза первичной опухоли;
- 4) уточнение источника метастазирования при наличии множественных злокачественных процессов;
- 5) определение локализации злокачественного процесса при наличии метастазов без первичного очага;
- 6) дифференциальная диагностика между метастазом рака и лимфомой;
- 7) диагностика лимфом и иммунофенотипирование.

#### **Морфологическая характеристика клеточных элементов лимфатического узла**

Клеточный состав ЛУ условно можно разделить на две группы: клетки лимфоидной ткани и клетки, выполняющие антигенпрезентирующую, опорную и фагоцитарную функции. Основную массу клеток нормального ЛУ составляют лимфоидные элементы (95–98%), из них бо́льшая часть представлена зрелыми (малыми) лимфоцитами, среди которых Т-лимфоциты составляют 55–65%, В-лимфоциты — 35–40%. При рутинном цитологическом исследовании не представляется возможным отличить В-лимфоциты от Т-лимфоцитов. По морфологической степени зрелости выделяют следующие лимфоидные элементы: центробласты, центроциты, иммунобласты, лимфоциты и ПК.

#### **Классификация цитологического материала**

Все многообразие патологических процессов, возможных в ЛУ, в Сиднейской системе классификации цитопатологии ЛУ предложено разделить на пять диагностических категорий, установление которых возможно на первом диагностическом уровне без применения дополнительных методов.

**L1. Неадекватный, или недиагностический, материал.** Критериями установления данной категории являются малая клеточность или выраженные некротические изменения. В такой ситуации рекомендуется повторная ТАБ, core-биопсия или эксцизионная биопсия в зависимости от клинического контекста. Риск злокачественности — 27–50%.

**L2. Доброкачественный процесс.** Доброкачественные изменения, которые включают гнойное, гранулематозное воспаление, различные инфекции с сопутствующей лимфаденопатией, доброкачественную лимфоидную гиперплазию и другие случаи с гетерогенной лимфоидной популяцией с преобладанием малых лимфоцитов и макрофагально-гистиоцитарными элементами. При расхождении с данными клиники или визуализационных методов рекомендуется проведение повторной ТАБ со взятием материала для иммунофенотипирования и проточной цитометрии. Риск злокачественности — 2–12%.

**L3. Атипия лимфоидных клеток неопределенного значения (ALUS)/AUS.** Атипия лимфоидных элементов неопределенного значения [гетерогенная лимфоидная популяция, предполагается реактивный процесс, однако не исключается ФЛ или имеются крупные клетки (центробласты или иммунобласты) или незрелые малые лимфоидные клетки — ALUS] или AUS. Цель создания этой категории, как и в других терминологических системах, — это поддержание высоких положительных и отрицательного прогностических значений в категориях II и V. Рекомендация: независимо от клинической картины и данных методов визуализации — повторная ТАБ со взятием материала для проточной цитометрии и цитогенетического исследования или же эксцизионная биопсия. Риск злокачественности — 58–67%.

**L4. Подозрение на злокачественный процесс.** Установление этой категории подразумевает наличие одного из четырех критериев.

1. Мономорфная популяция малых и/или среднего размера лимфоидных элементов с признаками атипии, подозрительных по принадлежности к лимфоме. Только цитологического исследования недостаточно для постановки диагноза, а результаты проточной цитометрии и ИЦХИ недоступны или не показали В-клеточную моноклональность.
2. Полиморфная лимфоидная популяция с единичными клетками типа Ходжкина или Березовского–Штернберга при недоступном/недиагностическом ИЦХИ.
3. Крупноклеточная лимфома или лимфома Беркитта при малой клеточности и при недоступности дополнительных методик.
4. Единичные атипичные клетки, подозрительные по метастатической принадлежности, однако отсутствует материал для выполнения ИЦХИ.

Риск злокачественности — 88–100%.

**Л5. Злокачественный процесс.** Эта категория устанавливается при неходжкинской лимфоме из малых и средних клеток с имеющимися данными о клональности: по данным проточной цитометрии или молекулярных исследований. Также в эту категорию входит крупноклеточная неходжкинская лимфома в случае, когда цитологических признаков достаточно для установления диагноза. Также эта категория включает лимфому Ходжкина при наличии характерных для нее цитологических признаков — клеток Ходжкина и Березовского–Штернберга. Метастатическое поражение ЛУ в рамках первого диагностического уровня также устанавливается при достаточности цитологических признаков. Риск злокачественности — 99–100%.

## Глава 5. Клиническая цитология

Цитограмма лимфатического узла при гиперплазии

Увеличение ЛУ называется лимфаденопатией, причиной могут быть разные заболевания, в том числе лимфадениты. Цитологическая диагностика неспецифических лимфаденитов должна быть увязана с клиническими данными. Осмотр большого позволяет обнаружить первичный очаг воспаления. Наиболее часто подвергаются инфекции подчелюстные и паховые ЛУ.

**Реактивная фолликулярная гиперплазия** возникает в ответ на местные инфекции, а также при РА, СКВ, ВИЧ-инфекции. При реактивной фолликулярной гиперплазии цитологический материал представлен центробластами, центроцитами, иммунобластами, лимфоцитами и ПК. Могут обнаруживаться фолликулоподобные структуры — фолликулярные дендритные клетки (ДК) в окружении малых лимфоцитов. В зависимости от состояния ЛУ, помимо лимфоидных элементов, в препаратах определяются эндотелий синусов, макрофаги и гистиоциты. Трудности возникают при дифференцировании фолликулярной гиперплазии и вариантов мелкоклеточных лимфом. Диагностике помогают определение иммунофенотипа и молекулярно-генетические данные.

**Паракортикальная гиперплазия** чаще всего сопровождается инфекционным мононуклеозом, но может быть в ответ на применение некоторых лекарств или вакцин. Цитограмма при паракортикальной гиперплазии представлена мелкими зрелыми лимфоидными клетками, ПК и небольшим количеством иммунобластов. В редких случаях иммунобласты имеют неровные контуры ядра и содержат ядрышки, что требует проведения дифференциальной диагностики с лимфомой Ходжкина.

В стадии воспаления в цитограмме наблюдается обилие нейтрофильных лейкоцитов с дегенеративными изменениями, макрофагов. Далее может наступить либо обратное развитие процесса, либо нагноение и даже некроз, либо воспаление принимает хронический характер и приводит к склерозу. При нагноении в цитограмме резко уменьшается количество лимфоидных клеток, которые обнаруживают в виде редких разрозненных клеток либо небольших скоплений, а количество нейтрофильных лейкоцитов (в состоянии дегенерации вплоть до гнойного расплавления) возрастает. Со временем появляются макрофаги, гистиоциты. Фон составляют нити фибрина. При хроническом лимфадените цитограмма представлена лимфоидными элементами разной степени зрелости, плазмócитами, тучными клетками, нейтрофилами, фибробластами, гистиоцитами, макрофагами. Могут встречаться многоядерные гигантские клетки «инородного тела» диаметром 35 мкм и более, они имеют обильную цитоплазму, в которой располагаются ядра округлой или овальной формы с грубой структурой хроматина. Могут обнаруживаться митозы. Исходом хронического лимфаденита может быть склероз, характеризующийся наличием фибробластов и фиброцитов.

Цитологическое исследование материала из лимфатического узла при инфекционных заболеваниях

**Туберкулезный лимфаденит** проходит фазы от лимфоидной гиперплазии, специфической гранулемы до казеозного некроза и обызвествления. В фазе специфической гранулемы цитограмма пунктатов ЛУ имеет весьма специфическую картину: на фоне пролиферации лимфоидных элементов выявляются единичные или в виде скоплений эпителиоидные клетки, многоядерные гигантские клетки Пирогова–Лангханса, синусовые клетки, лимфоциты и плазмócиты. Эпителиоидные клетки имеют одно ядро овальной или округлой формы с сетчатым хроматином, ядрышки не определяются, цитоплазма без четких границ. Клетки Пирогова–Лангханса имеют диаметр от 40 до 90 мкм и более, содержат многочисленные ядра вытянутой или эллипсоидной формы с нежно-петлистым хроматином. Ядра располагаются преимущественно по периферии клетки. В некоторых ядрах различаются ядрышки. Цитоплазма клеток слабо базофильная. При казеозном некрозе наблюдаются дегенеративные изменения и распад клеток.

**Вирусные лимфадениты** (ВИЧ, вирусный гепатит, ВЭБ, грипп, корь и др.) часто представлены паракортикальной гиперплазией, сопровождаются иммунобластной реакцией. Достаточно выраженные изменения наблюдаются при инфекционном мононуклеозе, вызванном ВЭБ. В цитограмме на фоне лимфоидной гиперплазии обнаруживаются атипичные мононуклеары, иммунобласты, плазмócиты, макрофаги. Дифференциальную диагностику следует проводить с классическим вариантом лимфомы Ходжкина.

**Фелиноз (болезнь кошачьих царапин).** Возбудителем является грамотрицательная палочка *Bartonella henselae*. Заболевание характеризуется поражением ЛУ по типу лимфогранулемы. Цитограмма при фелинозе бывает пестрой и крупноклеточной, напоминающей инфекционный мононуклеоз; обнаруживаются лимфоциты, центроциты,

центробласты, иммунобласты, атипичные мононуклеары, макрофаги, ПК, эндотелиальные и эпителиоидные клетки, сегментоядерные нейтрофилы. В период нагноения формируется нейтрофильный детрит.

#### **Цитограмма лимфатического узла при опухолях**

**В-лимфобластная лимфома / лейкоз из клеток-предшественников** в 80% случаев клинически проявляется как ОЛЛ. Для клеточного состава характерна монотонность. Опухоль представлена лимфобластами: клетки немного больше малого лимфоцита, имеют чаще всего округлые ядра с бластной (дисперсной) структурой хроматина, неотчетливыми ядрышками и скудной, слегка базофильной цитоплазмой. Описана морфология лимфобластов в форме «ручного зеркала». Форма ядер может варьировать от округлой до неправильной, скрученной, складчатой. Митозы часты, могут присутствовать макрофаги. Иммунофенотип В-лимфобластов: положительная экспрессия TdT, HLA-DR, CD19, CD79a, CD10, CD24, варибельная экспрессия CD20, CD22, отсутствие экспрессии CD45.

## **Глава 5. Клиническая цитология**

**ХЛЛ/В-клеточная лимфома из малых лимфоцитов** составляет почти 10% неходжкинских лимфом. При ХЛЛ цитограмма достаточно мономорфна, основной тип клеток составляют малые лимфоциты, имеющие скудную светлую цитоплазму и округлое ядро с грубым комковатым хроматином, ядрышки не определяются. На этом фоне в небольшом количестве могут встречаться более крупные клетки среднего (центроциты) и крупного (параиммунобласты) размера. Параиммунобласты — крупные клетки с округлым ядром, крупным центральным ядрышком и светлой цитоплазмой (в отличие от иммунобластов). Митозы не обнаруживаются. Иммунофенотип В-клеточной лимфомы из малых лимфоцитов характеризуется экспрессией пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20 и CD79a, а также коэкспрессией CD5 и CD23. Молекулярно-генетические изменения: в 1/3 случаев наблюдается трисомия 12-й хромосомы, что ассоциируется с агрессивным клиническим течением заболевания. У четверти больных определяются структурные нарушения в 13-й хромосоме.

**Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома** — наиболее распространенный вариант лимфопролиферативных заболеваний (30–40%). Морфологический субстрат опухоли представлен центробластами, иммунобластами, клетками с многоядрышатыми ядрами, клетками с полиморфными/анаплазированными ядрами. В зависимости от преобладания тех или иных клеток определяется морфологический вариант лимфомы: центробластный, иммунобластный, анапластический, вариант с Т-клеточным преобладанием. Центробластный вариант представлен лимфоидными клетками крупных и средних размеров с овальными, округлыми ядрами, с нежным ядерным хроматином, двумя-четырьмя ядрышками под ядерной мембраной, узкой цитоплазмой. Иммунобластный вариант — более 90% крупных клеток с одиночными центрально расположенными ядрами, хорошо выраженными одним-двумя ядрышками и широкой базофильной цитоплазмой. Вариант с Т-клеточным преобладанием — бо́льшая часть клеток представлена неопухолевыми реактивными Т-клетками и гистиоцитами. Крупные опухолевые В-клетки составляют менее 10% клеточного состава, имеют вид центробластов или иммунобластов. Анаплазированный вариант — опухоль образована очень крупными овальными, круглыми, угловатыми клетками с плеоморфными ядрами, имеющими сходство с клетками Березовского–Штернберга. Иммунофенотип характеризуется экспрессией пан-В-клеточных антигенов CD20, CD79, PAX5, CD45; не экспрессируются CD3. FISH-исследование применяется для определения перестройки генов *MYC* (до 10% случаев), различных нарушений района 3q27 области протоонкогена *BCL-6* (30% случаев). Молекулярно-генетические изменения включают транслокацию гена *Bcl2* t(14;18) — 20–30%; транслокацию гена *Bcl6* t(3;14).

**Фолликулярная лимфома (ФЛ)** занимает второе место по частоте и составляет 20% злокачественных лимфом взрослых. Морфологически опухоль представлена смесью центроцитов и центробластов. Согласно Классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей 2008 г., ФЛ разделяют на три степени злокачественности в зависимости от числа центробластов, подсчитанных в 10 полях зрения гистологического препарата при большом увеличении микроскопа (об.×400) и количестве их в одном поле зрения: 0–5 центробластов на поле зрения — 1-я степень злокачественности, 6–15 центробластов на поле зрения — 2-я степень злокачественности и более 15 — 3-я степень злокачественности. ФЛ относится к В-клеточным лимфомам с иммунофенотипом: CD20+; CD10+/-; BCL-2+; BCL-6+; CD3-; CD5-; CD23+/-; CD43-; CyclinD1-. В редких случаях ФЛ может быть BCL-2-негативной. В таких случаях необходимо проведение FISH-исследования для выявления t(14;18). Проллиферативный индекс (Ki-67), как правило, не превышает 20%, при Ki-67 >30% прогноз неблагоприятный.

**Лимфома Беркитта** — преимущественно экстранодальная В-клеточная агрессивная лимфома, встречается у детей 5–14 лет. В большом проценте случаев опухоль ассоциирована с ВЭБ. Морфологически лимфома Беркитта представлена двумя вариантами: классическим и атипическим. При классическом варианте лимфома Беркитта состоит из мономорфных бластных клеток среднего размера с округлым или овальным ядром с ядрышками. Характерны многочисленные митозы, большое количество макрофагов, что придает морфологической картине опухоли вид «звездного неба». В базофильной цитоплазме могут содержаться липидные гранулы. Атипический вариант морфологически сходен с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой. Опухоль имеет фенотип CD20+; CD10+; CD38+; BCL-6+; BCL-2-; CD44-; TdT-; CD3-. Иммуноцитохимической особенностью является отсутствие экспрессии BCL-2. Индекс пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67 приближается к 100%. Для установления диагноза лимфомы Беркитта требуется проведение FISH-реакции для выявления транслокации гена *c-MYC* и исключения транслокации гена *BCL-2*.

**Лимфома из клеток мантии** составляет около 6% лимфом. Опухоль клинически и морфологически гетерогенна. Различают морфологические варианты: классический (мелкоклеточный) и бластоидный (плеоморфный). Опухоль имеет иммунофенотип CD20+; CD5+; CD43+; CyclinD1+; BCL-2+; CD3-; CD23- (редкие случаи могут экспрессировать CD10; CD23; BCL6). Основным иммуноморфологическим признаком, позволяющим провести дифференциальную диагностику лимфомы зоны мантии от других мелкоклеточных лимфом, является



гиперэкспрессия CyclinD1. Индекс пролиферации менее 30% ассоциируется с благоприятным прогнозом заболевания, при неблагоприятном бластоидном варианте Ki67 достигает 80–90%. Проведение FISH-исследования позволяет определить характерную транслокацию t(11;14).

**Плазмоцитома/миеломная болезнь** характерна для больных среднего (после 25 лет) и старшего возраста.

Солидарные плазмоцитомы редки, встречаются главным образом в верхних дыхательных путях, ЖКТ, в костях. ЛУ поражаются редко. В значительном проценте случаев прогрессирует в миеломную болезнь. Опухоль представлена ПК разной степени зрелости. Иммунофенотип: выявляется экспрессия CD38, CD79a, CD56, отсутствует экспрессия CD19, CD20. Молекулярно-генетические нарушения проявляются моносомией или частичной делецией 13-й хромосомы, транслокациями с вовлечением локуса, кодирующего тяжелые цепи Ig (14q32) (t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q22).

## Глава 5. Клиническая цитология

**Лимфома из клеток маргинальной зоны** относится к индолентным лимфомам (характеризуются медленным прогрессированием, что позволяет в некоторых случаях не применять лечение на начальных стадиях). Субстратом лимфомы маргинальной зоны являются опухолевые клетки, аналогичные нормальным клеткам маргинальной зоны лимфоидной ткани селезенки, слизистых оболочек (MALT) и ЛУ. Морфологически лимфома маргинальной зоны ЛУ представлена опухолевыми клетками, малыми лимфоцитами и редкими ПК, которые инфильтрируют маргинальную зону реактивных фолликулов и распространяются в межфолликулярные пространства ЛУ. При диффузном поражении в сохранившихся фолликулах могут выявляться фолликулярные ДК и определяются маркеры зародышевых центров. Наличие остатков фолликулярных ДК показывает колонизацию фолликулов, что помогает установлению диагноза. Опухолевые клетки представлены клетками среднего размера с овальными или вдавленными ядрами с нежной структурой хроматина (центроцитоподобные В-клетки) и клетками с бобовидным ядром и широким ободком светло-голубой цитоплазмы (моноцитоподобные В-клетки). Опухолевые лимфоидные клетки могут определяться в периферической крови и иногда характеризуются наличием ворсинок. Иммунофенотип большинства лимфом маргинальной зоны ЛУ характеризуется положительной экспрессией пан-В-клеточных маркеров с коэкспрессией CD43 в 50% случаев и BCL-2-положительной в большинстве случаев. Экспрессия CD5, CD23, CD10, BCL-6 и циклина D1 является отрицательной.

**Т-лимфобластная лимфома/лейкемия из клеток-предшественников.** Характерно быстрое прогрессирование болезни с поражением костного мозга, средостения, печени, селезенки, увеличением периферических ЛУ. Опухоль представлена клетками небольших размеров, меньшими, чем клетки лимфомы Беркитта, с округлыми или перекрученными, извилистыми ядрами. Ядра имеют бластную структуру хроматина с неотчетливыми маленькими ядрышками. Ободок цитоплазмы узкий, слабо или умеренно базофильный. Часто отмечаются митозы. В значительном количестве могут встречаться эозинофилы, иногда макрофаги. Иммунофенотип: TdT+, CD1a+, CD2+, CD4+, CD5+, CD7+, CD8+. Может наблюдаться коэкспрессия CD4 и CD8, экспрессия CD10. Онкогенная трансформация происходит в тимусе на разных стадиях дифференцировки, и в зависимости от этого экспрессируются те или иные антигены (на ранней стадии — цитоплазматические CD3, CD2, CD7, несколько позже — CD1a, CD5 и на последней стадии — мембранный CD3). Молекулярно-генетические изменения представляют многочисленные транслокации гена *TCR*.

**Периферические Т-клеточные лимфомы** происходят из зрелых Т-лимфоцитов или натуральных клеток-киллеров (NK). Это группа гетерогенных заболеваний с агрессивным течением и плохим прогнозом, составляет 15% лимфом. У большинства больных имеются системные поражения: помимо ЛУ, поражаются костный мозг, печень, селезенка и кожа, может развиваться лейкоэмическая фаза с изменениями в периферической крови. Фон мазка, как правило, «грязный», содержит нити ядерного детрита, много «голых» ядер. Характерен полиморфизм по размерам клеток (мелкие, средние или крупные), форме ядер, ядра неправильной формы — мозговидные, многодолевые, перекрученные, уродливые, гиперхромные. Структура хроматина гомогенная, плотная, иногда комковатая, ядрышки просматриваются и бывают множественными — от одного до пяти, встречаются митозы. Реактивный фон выражен в разной степени, включает эозинофилы, гистиоциты, эндотелиальные клетки. Могут встречаться (или преобладать) клетки округло-овальной формы с неровными краями, с зубцами ядерной мембраны. Нередко встречаются единичные многоядерные клетки или двухъядерные клетки, напоминающие клетки Березовского–Штернберга. Опухоль может быть представлена крупными бластными клетками, сходными с иммунобластами, с одним или двумя крупными ядрышками и широкой бесцветной цитоплазмой. Могут встречаться двухъядерные клетки. Признаки плазмочитарной дифференцировки отсутствуют. Опухолевые клетки имеют иммунофенотип периферических (посттимических) Т-лимфоцитов и экспрессируют Т-клеточные антигены: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, часть антигенов может утрачиваться, некоторые крупные клетки могут экспрессировать CD30.

**Ангиоиммунобластная лимфома** составляет 15–20% Т-клеточных лимфом и 1–2% неходжкинских лимфом. Имеются данные о связи ангиоиммунобластной лимфомы с ВЭБ. Типичными для этого заболевания являются системные проявления, острое начало заболевания с лихорадкой, кожной сыпью, генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, может присоединяться АИГА. Прогноз неблагоприятный. Диагностика зависит от правильно выбранного ЛУ. Клеточный состав полиморфен. Фон препарата реактивный, представлен большим количеством эпителиоидных клеток, расположенных разрозненно или в скоплениях, эндотелиальными клетками; встречаются эозинофилы, иммунобласты, ПК, лимфоциты. Опухолевые клетки бывают мелких, средних или крупных размеров с неправильной формой ядер, перекрученными ядрами, широкой светлой цитоплазмой. Встречаются митозы. Иммуноцитохимически опухолевые клетки характеризуются положительной экспрессией Т-клеточных маркеров CD3, CD5, CD4, часто CD10-позитивные.

**Т-клеточная лимфома/лейкемия взрослых** связывается с Т-лимфотропным вирусом человека (Human T-lymphotropic virus — HTLV) HTLV-1, относящимся к ретровирусам. Вирус инфицирует CD4+ (хелперы) Т-клетки.

При манифестации заболевания лейкоemia возникает более чем в 80% случаев. Обычно отмечается лимфаденопатия. Поражаются также кожа, печень, селезенка, опухолевые клетки обнаруживают в крови. Выражен исключительный полиморфизм опухолевых клеток (церибриформные, многодольчатые ядра в форме цветка, листьев клевера). Встречаются двухъядерные клетки, напоминающие клетки Березовского–Штернберга. Часты митозы. Иммуноцитохимические признаки опухолевых клеток — положительная экспрессия Т-клеточных антигенов CD3 и CD5. Обычно они утрачивают CD7, но характеризуются выраженной положительной экспрессией CD25, которые представляют собой рецепторы к IL-2. Генетически опухоль характеризуется клональной перестройкой генов *TCR*.

#### Цитологическая диагностика лимфомы Ходжкина

Лимфома Ходжкина — злокачественное заболевание с первичным поражением ЛУ. Начинается, как правило, с поражения шейных ЛУ. Возникает чаще в молодом возрасте (15–35 лет), существует второй пик в возрасте 50–60 лет. Опухолевая ткань обычно содержит небольшое количество рассеянных крупных опухолевых одноядерных клеток Ходжкина и многоядерных клеток Березовского–Штернберга, окруженных реактивными воспалительными клетками. Опухолевые клетки часто располагаются среди розеток, образованных Т-лимфоцитами. Согласно классификации ВОЗ 2008 г., выделены два варианта лимфомы Ходжкина: нодулярное лимфоидное преобладание и классический; они отличаются по клиническому течению, морфологическим и иммунохимическим признакам. Методы ИЦХИ пунктатов ЛУ позволяют диагностировать и определить вариант лимфомы Ходжкина, что важно для начала лечения. Цитограмма лимфомы Ходжкина: опухоль представлена различными типами клеток Ходжкина и клеток Березовского–Штернберга, расположенных среди реактивного микроокружения, составляющего до 99% клеточной популяции. В состав реактивного микроокружения в различном количестве входят лимфоциты, гистиоциты, нейтрофильные лейкоциты, эозинофилы, плазмциты и фибробласты либо фиброциты. Выделяется несколько морфологических типов клеток Ходжкина и клеток Березовского–Штернберга: одноядерные с лопастным ядром, двухъядерные или многоядерные клетки размером от 30 до 120 мкм. Хроматин тонкодисперсный, разреженный, ядерная мембрана уплотнена. Как правило, каждое ядро содержит крупное ядрышко — это важный диагностический признак. Ядрышки варьируют по форме, размеру и количеству. Характерно перинуклеарное гало. Классические диагностические *клетки Березовского–Штернберга* крупные, многоядерные, чаще двухъядерные, ядра округлые или овальные, хроматин тонкодисперсный, равномерный. Ядра содержат крупные ядрышки, которые иногда занимают почти все ядро, с просветлением вокруг. Двухъядерные клетки с крупными ядрышками в каждом из ядер напоминают глаза совы. *Клетки Ходжкина* — крупные одноядерные клетки со светлым ядром, тонкодисперсным хроматином, четкими, увеличенными, полиморфными по размеру ядрышками, соответствуют диагностическим признакам клеток Березовского–Штернберга. *Лакунарные клетки* — крупные клетки, являющиеся вариантом клеток Березовского–Штернберга, содержат многодольчатое ядро или множество округло-овальных мелких ядер, расположенных зеркально, в виде подковы, либо перекрывая друг друга; ядрышки мельче, чем в диагностических клетках Березовского–Штернберга; имеют широкую светлую цитоплазму. *LP-клетки* — крупные клетки с многодольчатым ядром, тонкой ядерной мембраной, мелкими или укрупненными ядрышками, часто локализующимися у ядерной мембраны, умеренно выраженной светлой цитоплазмой. Доли ядра наслаиваются друг на друга и напоминают воздушную кукурузу ( popcorn ).

## Глава 5. Клиническая цитология

#### Цитологическая диагностика метастатических поражений лимфатических узлов

Цитологическая диагностика метастазов злокачественного новообразования в ЛУ, как правило, не представляет затруднений. Цитологическая диагностика базируется на наличии в препаратах атипических клеток, чуждых составу нормального ЛУ. Для диагностики органной принадлежности метастазов цитологу необходимо учитывать клинико-анамнестические данные, результаты инструментальных и иных дополнительных исследований, в том числе ИЦХИ. Количество лимфоидных элементов по мере роста метастаза уменьшается, вплоть до полного замещения лимфоидной ткани. При малом количестве или наличии единичных опухолевых клеток в мазке возникает необходимость их дифференциальной диагностики с гистиоцитами и эндотелиальными клетками синусов. Подтверждающими являются ИЦХИ, а при срочной интраоперационной диагностике наличия или отсутствия метастазов в ЛУ применяется флюоресцентная иммуноцитохимия с эпителиальным мембранным антигеном BerEp4, меченным флюоресцеиноизотиоцианатом (FITC, зеленый флюорохром). Такая методика в течение 20 мин позволяет провести срочное ИЦХИ ЛУ. Особенно важно это при интраоперационном цитологическом исследовании так называемых сторожевых ЛУ — первых узлов, находящихся на страже дальнейшего метастазирования злокачественного процесса. Отсутствие метастазов в сторожевых ЛУ свидетельствует об отсутствии метастазов в других ЛУ.

#### Рекомендуемая литература

1. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю. Возможности цитологического метода в диагностике мелкоклеточного рака легкого // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2018. № 5. С. 17–20.
2. Григорук О.Г., Пупкова Е.Э., Бабулина Л.М., Лазарев А.Ф. Использование цитологического материала при диагностике рака легкого // Злокачественные опухоли. 2017. № 7 (4). С. 13–20.
3. Долгов В.В., Шабалова И.П. и др. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. Тверь: Триада, 2006. 161 с.
4. Киреев А.А. Цитоморфологические критерии рака легкого // Новости клинической цитологии России. 2024. № 28. Т. 1. С. 27–34.
5. Гилл Г.У. Клиническая цитология. Теория и практика цитотехнологии / Пер. с англ. под ред. А.В. Безрукова, К.Т. Касоян. М.: Издательский дом «Практическая медицина», 2015. 384 с.
6. Патологическая анатомия по Роббинсу: учебник / Винай Кумар, Абул К. Аббас, Джон С. Астер; гл. ред. изд. на рус. яз. Е.А. Коган; пер. с англ. Е.А. Коган, А.Д. Сапаргалиевой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 1136 с.

7. Тонкоигольная аспирационная биопсия. Цитологический атлас / Под ред. Домански Х.А.; пер. с англ. под ред. С.Л. Воробьева. М.: Практическая медицина, 2022.
8. Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю. Современная цитоморфологическая диагностика опухолей легких // Новости клинической цитологии России. 2018. № 22 (3–4). С. 3–7.
9. Шабалова И.П., Джангирова Т.В., Волченко Н.Н. и др. Молочная железа. Цитологический атлас с основами гистологической и молекулярной диагностики, М.–Тверь; Триада, 2024, 192 с.
10. Шабалова И.П., Касоян К.Т. Цитология жидкостная и традиционная при заболеваниях шейки матки. Цитологический атлас. М.–Тверь: Триада, 2016. 320 с.
11. Шапиро Н.А., Батороев Ю.К., Дворниченко В.В. Цитологическая диагностика заболеваний кожи. Цитологический атлас. М.–Иркутск, 2015.
12. Щитовидная железа. Лабораторная диагностика заболеваний щитовидной железы / Под ред. В.В. Долгова, И.П. Шабаловой, А.В. Селивановой. М.–СПб.–Новосибирск–Тверь: Триада, 2022. 288 с.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.1. Традиционные биохимические маркеры и их клиническое значение

Биохимический анализ крови включает показатели, отражающие состояние белкового, углеводного, липидного, минерального обмена, активность ключевых ферментов сыворотки или плазмы крови. В соответствии с представлением о гомеостазе каждый биохимический параметр может изменяться в пределах референсного интервала, это принято расценивать как норму для здорового человека. Биохимические исследования могут быть скрининговыми, тем не менее изменения биохимических аналитов скрининга важны для диагностики, мониторинга и прогноза заболеваний. Клиническая биохимия быстро прогрессирует, в настоящее время речь уже идет о выделении клинической протеомики и метаболомики, а количество мониторируемых аналитов приближается к 1000. В этом руководстве мы описали только самые распространенные тесты, включенные или планируемые к включению в клинические рекомендации. Перечень традиционных биохимических показателей, так же как и других лабораторных тестов, изложен в Номенклатуре МЗ РФ (приказ № 804н). К традиционным биохимическим тестам относятся исследования, которые в настоящее время выполняются на биохимических анализаторах на основе фотометрических методов (ферменты, аналиты, минералы) и исследования электролитов с помощью ион-селективных электродов.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.1.1. Ферменты

**Ферменты**, или **энзимы**, — белки, обладающие каталитической активностью и ускоряющие протекание реакций. Термин «фермент» происходит от латинского слова *fermentum* — закваска, а «энзим» — от греческих слов *en zyme* — в дрожжах. Оба названия восходят к истории изучения процессов брожения. Так же как другие белки, ферменты состоят из полипептидных цепей, каждый фермент уникален по структуре. В клинической биохимии определение активности ферментов используется как маркеры повреждения определенных тканей и органов. В системном кровотоке, в котором определяются ферменты, они не выполняют какую-либо функцию, отражают только физиологический апоптоз или патологический некроз клеток.

Количественное определение содержания ферментов в биологических жидкостях представляет определенные трудности, поскольку многие ферменты присутствуют в ничтожно малых концентрациях. Ферменты выявляют по их активности, что приносит элемент неопределенности. Так, ЩФ и КФ выполняют одну и ту же функцию, но функционируют в разных средах (щелочной или кислой). При этом та же ЩФ имеет по крайней мере 17 изоферментов в разных органах. Поэтому при исследовании специфичной костной ЩФ используются иммунохимические специфические методы.

Имеются различия и в подходах к определению величины каталитической активности фермента для количественной его оценки. Основу этого подхода составляет положение о том, что в оптимальных условиях скорость реакции пропорциональна концентрации фермента в исследуемой жидкости. Количество образовавшегося продукта реакции либо расщепленного субстрата в зависимости от избранного метода может быть выражено в единицах массы, количестве вещества (моль), величине поглощения при определенной длине волны, изменении величины pH, вязкости среды, времени реакции. Все это привело к тому, что было предложено множество единиц для обозначения активности ферментов. Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала для использования **международную единицу активности** МЕ (Ед), определенную как количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин. Каталитическую концентрацию следует выражать в Ед/л. Внедрение международной единицы явилось попыткой стандартизации результатов исследования, что не решило проблем, связанных со стандартизацией самих методов. Определение активности фермента в иных буферных системах, использование новых субстратов, активаторов и ряда других компонентов способствует появлению иных границ референсных значений для конкретного фермента. К тому же выражение результатов в международных единицах не является гарантией корректного выполнения метода. Поэтому все референсные диапазоны для приведенных ниже ферментов несут ориентировочный характер. В конкретной лаборатории применяются референсные диапазоны, обозначенные производителем для используемого метода.

Другой подход в определении активности фермента основан на использовании Международной системы единиц. В данной системе в качестве единицы каталитической активности выступает моль/с (катал), соответствующий количеству фермента, способному вызвать превращение 1 моль субстрата в 1 с (1 моль/с). Каталитическая концентрация фермента приводится к объему 1 л и выражается в виде моль/(с×л). Единица активности **катал** (моль/с),

эквивалентная  $60 \times 10^6$  Е, не прижилась в лабораториях из-за того, что активность большинства ферментов, выраженная в каталах, принимает низкие и неудобные для практики значения. Более удобной оказалась производная единица — нкатал ( $10^{-9}$  кат), соответствующая 0,06 Е/л, в свою очередь, 1 Е соответствует активности 16,7 нкат.

1 Е/л = 16,7 нкат/л;

1 нкат/л = 0,06 Е/л.

**АЛТ** катализирует обратимую реакцию дезаминирования аминокислоты аланина. Продукт дезаминирования (пируват) метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы. АЛТ входит в группу ферментов печеночного профиля. Изменение активности АЛТ в сыворотке наиболее часто отмечают при острых заболеваниях печени и желчевыводящих путей. У пациентов со значительным повышением уровня аминотрансфераз (в 15 раз превышающим верхнюю границу нормы) часто наблюдается острый гепатит, хотя в некоторых случаях может иметь место обострение хронического заболевания печени (HBV или болезни Вильсона). Значительное повышение уровня АЛТ ( $>5000$  Е/л) обычно связано с ишемическим или лекарственным гепатитом. Другие причины значительного изолированного повышения АЛТ включают рабдомиолиз и тепловой удар. Высокая концентрация АЛТ, кроме гепатоцитов, присутствует в ПЖ, сердце, скелетных мышцах, эритроцитах, почках. Повреждение этих органов сопровождается повышением уровня АЛТ в сыворотке крови.

*Референсные значения* (ориентировочные): 5–40 Е/л.

*Диагностическое значение.* Выявление и оценка выраженности цитолитического синдрома при диагностике и мониторинге заболеваний печени. При типичном течении острых вирусных гепатитов активность АЛТ повышается за неделю до появления клинических симптомов (примерно у 50% больных за 5 сут до гепатомегалии или желтухи, у 90% — за 2 сут до желтухи). Нормализация показателей происходит обычно через 6–7 нед заболевания (у некоторых пациентов в течение 90 сут). Удлинение периода гиперминотрансфераземии может свидетельствовать о переходе острого процесса в хронический. Отсутствие гиперферментемии не исключает хронизации процесса.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Увеличение активности АЛТ* наблюдается в следующих случаях:

- острые и хронические заболевания печени с повреждением паренхимы любой этиологии (гепатиты, холестаз, инфекционный мононуклеоз);
- шок, сердечная недостаточность с застойными явлениями в печени;
- метастазы рака в печень, первичный рак печени;
- травма или повреждение скелетных мышц, печени, миокарда;
- интенсивные физические нагрузки накануне;
- острый панкреатит;
- применение статинов и других гепатотоксичных препаратов (антибиотики, антибластные средства).

*Влияющие факторы.* Увеличение активности происходит при гемолизе *in vivo* или *in vitro*, терапии гепарином.

**АСТ** катализирует обратимую реакцию дезаминирования аминокислоты аспартата. Продукт дезаминирования — щавелевоуксусная кислота — метаболизируется во многих направлениях, включая распад с выделением энергии, синтез глюкозы и др. АСТ широко распространена в органах и тканях организма человека, присутствует в митохондриях и в цитоплазме клеток. Наибольшая активность фермента обнаружена в сердечной мышце, затем по убыванию — в печени (в цитоплазме и в митохондриях гепатоцитов), скелетных мышцах, головном мозге, семенниках и почках. Высокая активность АСТ обнаружена в эритроцитах.

*Референсные значения* (ориентировочные): 5–40 Е/л.

*Диагностическое значение.* Выявление и оценка выраженности цитолитического синдрома при диагностике и мониторинге заболеваний печени. Тест используется вместе с определением активности АЛТ. При инфильтративных нарушениях повреждаются как митохондриальные, так и плазматические мембраны, из клеток выходят обе трансаминазы, часто в сыворотке в большей степени увеличивается АСТ, чем АЛТ. Соотношение АСТ/АЛТ, так называемый коэффициент де Ритиса (в норме — 0,8–1,0), может служить относительным диагностическим показателем: острые, в том числе и вирусные, гепатиты — 0,2–0,5, ИМ —  $>1$ .

*Увеличение активности фермента* наблюдается в следующих случаях:

- острый инфаркт миокарда (ОИМ), острый миокардит, шок, сердечная недостаточность с застойными явлениями в печени;
- острые и хронические заболевания печени с повреждением паренхимы;
- первичный рак печени, метастазы рака в печень;
- внутри- и внепеченочный холестаз с повреждением паренхимы печени;
- миопатии, травма или операционное повреждение скелетных мышц;
- острый панкреатит.

**α-Амилаза** — фермент, катализирующий гидролитическое расщепление полисахаридов пищи — крахмала и гликогена. Секретируется слюнными железами (изоферменты S-типа) и ПЖ (изофермент Р-типа). Основным источником фермента сыворотки крови в норме являются слюнные железы (60%) и ПЖ (40%). Оба изофермента α-амилазы имеют молекулярную массу около 45 кД, поэтому фильтруются в почках и экскретируются с мочой. Тем не менее в составе мочи больший удельный вес приходится на панкреатический изофермент.

*Референсные значения* (ориентировочные):

- до 1 года — 5–65 Ед/л;
- 1–70 лет — 25–125 Ед/л;
- свыше 70 лет — 20–160 Ед/л.

*Диагностическое значение.* При остром панкреатите активность амилазы в крови начинает увеличиваться через 3–12 ч после приступа боли, достигает максимума через 20–30 ч, превышая верхнюю границу референтных пределов в зависимости от степени проходимости протоков и размера поражения паренхимы ПЖ в 5–10 раз. При некротическом панкреатите гиперاميляземия выше, чем при отечном. В случае острого геморрагического некротизирующего панкреатита с обширной деструкцией ПЖ уровень амилазы крови может не увеличиваться или даже снижаться, что является плохим прогностическим признаком. При хроническом панкреатите исследование амилазы позволяет выявить обострение, при этом уровень гиперاميляземии, так же как и гиперамилазурии и гиперлипаземии, меньше, чем при остром панкреатите. Ценность тестов для выявления обострений снижается по мере развития в ПЖ атрофически-склерозирующего процесса, проявляющегося гипосекрецией ферментов. Наиболее чувствительный индикатор обострений хронического панкреатита и более специфичный, чем  $\alpha$ -амилаза, маркер острого панкреатита — повышение Р-изоферментов (панкреатической) амилазы в сыворотке крови.

*Увеличение активности фермента* в 5–10 раз наблюдается при остром панкреатите, почечной недостаточности, тяжелом диабетическом кетоацидозе. Повышение активности  $\alpha$ -амилазы до 5 раз наблюдается при многих патологиях: это киста или псевдокиста ПЖ, острый холецистит, прободение язвы желудка, кишечная непроходимость, абдоминальная травма, прободение при внематочной беременности (выход в кровоток амилазы фаллопиевых труб), заболевания слюнных желез: эпидемический паротит, камни в слюнной железе или ее протоке, острая алкогольная интоксикация, некоторые опухоли легких и яичников.

*Влияющие факторы.* При образовании комплексов амилазы с белками плазмы, имеющими большой молекулярный вес, возникает состояние макроамилаземии, так как снижено выведение амилазы почками, это состояние может быть у здоровых людей. Увеличение активности  $\alpha$ -амилазы вызывают средства, сокращающие сфинктер Одди (наркотические анальгетики, секретин), некоторые антибиотики, сульфаниламиды.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ)* — фермент, катализирующий одну из реакций переноса аминокислот из плазмы крови в клетки, а также реакции в процессах реабсорбции аминокислот из желчи и мочи в кровь. В значительных количествах фермент обнаруживается в эпителии извитых канальцев нефрона, в желчных канальцах и ближайших к просвету частях эпителиальных клеток, выстилающих желчный проток. Наибольшая активность фермента отмечается в цитоплазме и микросомах гепатоцитов, расположенных в области воротной вены.

*Референтные значения (ориентировочные):*

- женщины — <30 Ед/л;
- мужчины — <50 Ед/л.

*Диагностическое значение.* Диагностика и мониторинг лечения заболеваний печени и билиарного тракта. Повышение уровня фермента при этом является многозначным: отражает внутри- и внепеченочный холестаз (вследствие деструкции желчевыводящих путей), в некоторой степени — цитолиз паренхиматозных клеток (фермент менее чувствителен к повреждениям паренхимы, чем аминотрансферазы), является показателем индукции микросомальной ГГТ алкоголем и гепатотоксичными лекарственными препаратами, может отражать поражение печени злокачественным процессом. При острых вирусных гепатитах происходит увеличение активности ГГТ до 10 раз (чаще в 5 раз), это обусловлено в основном развитием холестаза, поэтому при холестатической форме гиперферментемия более выражена; сроки максимума сходны с таковыми для аминотрансфераз, нормализация происходит позже. При алкогольном гепатите активность ГГТ увеличивается в 20 раз, при лекарственном поражении — варьирует в зависимости от природы и дозы лекарственного препарата. При хронических гепатитах выраженность гиперферментемии зависит от активности процесса. При декомпенсированном циррозе повышение активности ГГТ может быть не связано со снижением биосинтеза фермента. При первичном билиарном циррозе возможно повышение до 10 норм еще в бессимптомной стадии. При гепатоцеллюлярной карциноме у 90% больных без желтухи активность ГГТ увеличивается в 10–20 раз, с желтухой — до 30 раз. Увеличение активности возможно задолго до появления клинических симптомов и изменения других биохимических показателей. При метастазах в печень, сопровождающихся клиническими симптомами, активность ГГТ меняется так же, как при первичном раке печени. Наиболее высокая активность фермента наблюдается при метастазах в области воротной вены или по ходу желчных путей, чувствительность как показателя поражения печени метастатическим процессом — около 96%. Особую ценность тест представляет для выявления патологий гепатобилиарной системы у детей (после 2 лет) и беременных, когда сывороточная активность других ферментов, используемых в гепатологии, повышена физиологически. Сывороточная активность фермента не меняется при патологии костной ткани.

*Увеличением активности фермента* сопровождаются:

- обтурация внутри- и внепеченочных желчных путей;
- острые и хронические гепатиты;
- инфекционный мононуклеоз с поражением печени;
- токсические поражения печени;
- внепеченочные причины: панкреатит острый и хронический, СД, травма, нефротический синдром, неврологические заболевания.

*Влияющие факторы.* Увеличение активности наблюдается при терапии барбитуратами, фенитоином, гепатотоксичными препаратами.

**КФ** — группа ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от различных органических соединений с максимальной активностью в кислой среде ( $\text{pH} < 7,0$ ). Ферменты присутствуют в лизосомах печени, селезенки, эритроцитах, тромбоцитах, костном мозге, макрофагах и остеокластах. Самая высокая активность КФ отмечается в предстательной железе (простатическая КФ). У мужчин половину содержащейся в сыворотке крови КФ вырабатывает предстательная железа, остальное дают печень и разрушающиеся тромбоциты, эритроциты. У женщин источниками фермента сыворотки крови являются печень, эритроциты и тромбоциты. Большинство тканей содержит несколько изоферментов КФ.

*Референсные значения (ориентировочные):*

- до 14 лет —  $< 5,5$  Ед/л;
- женщины после пубертата —  $< 5,5$  Ед/л;
- мужчины —  $< 6,5$  Ед/л.

*Диагностическое значение.* Диагностика и мониторинг рака простаты (более информативна КФ).

*Увеличением активности фермента сопровождаются:*

- рак простаты (у 20–25% пациентов без метастазов, у 60% — с метастазами, при метастазах в кость активность повышается в 40–50 раз);
- аденома простаты;
- внепростатические причины: опухоли с метастазами в костную ткань, болезнь Гоше, болезнь Ниманна–Пика, гемолитическая анемия, патология гепатобилиарной системы, остеопороз, болезнь Педжета, тромбоэмболии, гиперпаратиреозидизм;
- орхизэктомия (эстрогенотерапия) приводит к снижению активности фермента, сохранение высокой активности фермента свидетельствует о резистентности больного к проводимому лечению.

*Влияющие факторы.* Увеличение активности: гемолиз, цистоскопия, катетеризация мочевого пузыря, пальпация простаты, биопсия, операция на простате (нормализация через несколько суток), дефекация с напряжением, повышенная температура, сексуальная активность.

**Креатинкиназа (КК)** — фермент, участвующий в продукции аденозинтрифосфата (АТФ), катализирует фосфорилирование креатина и его дефосфорилирование. Наибольшая активность фермента выявлена в скелетных мышцах и миокарде, меньшая — в головном мозге, плаценте, гладких мышцах, прямой кишке, предстательной железе. Изоферменты КК состоят из двух субъединиц — М (muscle — «мышца») и В (brain — «мозг»). Известны три цитоплазматических изофермента, различающихся комбинацией субъединиц: ММ-КК, МВ-КК, ВВ-КК. Общая КК крови в норме состоит на 95% из ММ-КК и на 5% из МВ-КК. В веществе головного мозга КК представлена почти на 100% ВВ-КК. Однако ВВ-КК не проходит ГЭБ и в норме в сыворотке крови не обнаруживается. При ЧМТ, инсультах появление большого количества В-субъединиц свидетельствует о нарушении ГЭБ. ММ-КК присутствует в основном в скелетных мышцах. МВ-КК в наибольших количествах присутствует в миокардиоцитах. Именно поэтому увеличение в сыворотке крови МВ-КК — один из наиболее специфичных показателей цитолиза и некроза кардиомиоцитов.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Референсные значения (ориентировочные):*

- женщины —  $< 170$  Ед/л;
- мужчины —  $< 190$  Ед/л.

*Диагностическое значение.* Выявление и мониторинг цитолитического синдрома при повреждениях миокарда и скелетной мускулатуры. При диагностике ОИМ, миокардитов более специфичным показателем является увеличение МВ-КК, чем общей КК.

Для дифференциальной диагностики нейрогенных мышечных заболеваний и миопатий, для наблюдения за течением миопатий определение сывороточной активности КК является наиболее информативным тестом. Мышечная слабость, истощение и боль могут наблюдаться как при миопатиях, так и при нарушении иннервации, однако миопатии сопровождаются специфическим увеличением активности КК сыворотки крови, а нейрогенные заболевания мышц — нет. Изменения КК в сыворотке могут иметь место в доклинический период наследуемых миопатий, а также при носительстве (доказано для дистрофии Дюшенна). При интерпретации лабораторных данных необходимо учитывать, что наиболее высокие величины гиперферментемии удастся обнаружить на ранних стадиях миопатий. Позже, когда значительная часть мышечной ткани уже претерпела патологические изменения и биосинтез КК в мышцах снижен, уровень КК сыворотки может быть понижен.

*Увеличением активности фермента сопровождаются:*

- ОИМ, однако определение общей КК утратило значение для диагностики ОИМ, уступив по ДЧ и ДС тропонину и МВ-КК;
- острые миокардиты (инфекционные и токсические), аритмии, застойная сердечная недостаточность;
- заболевания скелетных мышц: полимиозиты (ПМ), дерматомиозиты (ДМ), мышечные дистрофии, судороги;

- внесмышечные причины: злокачественная гипертермия, инсульт, синдром Рейно, гипотиреоз (вероятно, из-за генерализованного увеличения мембранной проницаемости), алкоголизм, некоторые инфекционные заболевания.

**Влияющие факторы.** Увеличение активности: гемолиз, внутримышечные инъекции (превышение верхней границы нормы в 5–8 раз после однократной инъекции сохраняется 48 ч, в отдельных случаях — до недели), интенсивная физическая нагрузка, умеренная физическая нагрузка после малоподвижного образа жизни, сочетанное введение галогана и сукцинилхолина во время наркоза, отравление барбитуратами.

**МВ-КК. Референсные значения:**

- фотометрический метод (определение активности): мужчины — <20 Ед/л, женщины — <15 Ед/л;
- иммунохимический метод (определение массовой концентрации): мужчины — <5 мкг/л, женщины — <2,5 мкг/л;
- отношение массовой концентрации МВ-КК к активности общей КК <2%.

**Диагностическое значение.** Увеличением МВ-КК сопровождаются:

- ОИМ (повышение начинается через 4–6 ч ОИМ; характерно возрастание соотношения МВ-КК/КК выше 25%; динамическое определение более информативно, чем единичное);
- без инфаркта: миокардиты, ПМ (в 15–20% случаев при повреждении миокарда), миопатии. Источником МВ-КК в этих случаях служит сердечная мышца, повреждения которой часто сопровождают дистрофии. Диагностическая ценность изменения МВ-КК в этом случае не превышает таковую для КК общей. При дистрофии Дюшенна активность МВ-КК увеличена в несколько раз у 90% больных, при других миопатиях изменение менее выражено.

**ЛДГ** — фермент, катализирующий обратимую реакцию превращения пирувата в лактат в процессах распада и синтеза глюкозы. ЛДГ содержится в цитоплазме клеток практически всех органов и тканей. Наибольшая активность — в миокарде, почках, скелетной мускулатуре, паренхиме печени, эритроцитах; меньшая — в лимфоцитах, легких, ПЖ. Основной источник ЛДГ в норме — разрушающиеся клетки крови.

**Референсные значения (ориентировочные):** <250 Ед/л.

**Диагностическое значение.** Увеличением активности фермента сопровождаются:

- застойная сердечная недостаточность (при гипоксии органов);
- острые гепатиты (при вирусных гепатитах увеличение в течение первой недели желтушного периода в 2–3 раза и более, при типичном течении нормализация активности на 5–8 нед);
- токсические поражения паренхимы печени; первичный рак печени, метастазы рака в печень;
- миопатии различной этиологии;
- ОИМ (начало увеличения — через 10–24 ч, максимальная активность — через 36–72 ч, нормализация — через 10–15 сут);
- воспаления и инфаркт органов и тканей;
- гемолитическая анемия.

**Влияющие факторы.** Увеличение активности: беременность, даже минимальный гемолиз *in vitro* вследствие высокой активности ЛДГ в эритроцитах, гемотрансфузия.

**Липаза** — фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов (ТГ) с высвобождением жирных кислот в клетках жировой ткани, а также в тонкой кишке, куда фермент секретируется ПЖ. Увеличение активности в сыворотке крови, как правило, является следствием цитолиза и некроза ацинарных клеток ПЖ.

**Референсные значения (ориентировочные):**

- до 18 лет — <130 Ед/л;
- после 18 лет — <190 Ед/л.

## Глава 6. Клиническая биохимия

**Диагностическое значение.** Диагностика и мониторинг острого и хронического панкреатита. В отличие от  $\alpha$ -амилазы, активность липазы не повышается при паротите, внематочной беременности, аппендиците.

**Увеличением активности фермента** сопровождаются:

- острый панкреатит любой этиологии (повышение — через 4–8 ч, максимальная активность — через 24 ч, снижение до референтного уровня — через 8–14 сут);
- рак ПЖ;
- киста или псевдокиста ПЖ;
- внепанкреатические причины: перфорации кишечника, перитонит, заболевания желчного пузыря.

**Влияющие факторы.** Увеличение активности: лекарственные препараты, провоцирующие спазм сфинктера Одди (наркотические анальгетики, секретин) или развитие панкреатита (тетрациклины, сульфаниламиды, цитостатики).

**ЩФ** — группа ферментов, катализирующих гидролитическое отщепление фосфатной группы от органических соединений с максимальной активностью в щелочной среде. ЩФ широко распространена в тканях человека, особенно много этого фермента в слизистой оболочке кишечника, остеобластах (остеокласты не содержат фермента),

эпителиоцитах желчных протоков, образующих просвет желчных канальцев в гепатоцитах, проксимальных отделах извитых канальцев почек, плаценте, легких.

*Референсные значения (ориентировочные):*

- дети — <480 Ед/л (рост костей);
- взрослые — <150 Ед/л.

*Диагностическое значение.* Выявление и мониторинг поражений костей, сопровождающихся повышением активности остеобластов (остеодистрофии, остеомалация, метастазы и некоторые первичные опухоли костной ткани), а также внутри- и внепеченочного холестаза.

*Увеличением активности фермента* сопровождаются:

- болезни гепатобилиарной системы: холангит, холангиолит, холестаз при гепатитах, метастазах в печень, циррозах, первичном раке печени;
- болезни с увеличением функциональной активности остеобластов (болезнь Педжета, метастазы рака в кости, остеогенная саркома, остеомалация, первичный и вторичный гиперпаратиреоз при вовлечении скелета);
- клинически малоинформативное увеличение активности: миеломная болезнь, лимфогранулематоз с поражением костей, повышенный метаболизм костной ткани при заживлении переломов, саркоидоз.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.1.2. Субстраты и продукты биохимических реакций

**Альбумин** — белок, синтезируемый печенью. На долю альбумина приходится 55–60% общего белка сыворотки крови. Основные функции альбумина: транспорт, поддержание постоянства коллоидно-осмотического давления и обеспечение клеток аминокислотами. При гипоальбуминемии снижается онкотическое давление плазмы, жидкость не возвращается в кровяное русло, по такому принципу развиваются «голодные» отеки.

Время полужизни альбумина в плазме — 15–20 сут, поэтому даже полное прекращение синтеза альбумина печенью не должно сопровождаться значительным его снижением в сыворотке крови на протяжении 3–4 сут. В острых ситуациях гипоальбуминемия наблюдается при потере альбумина с мочой или при пропотевании вместе с жидкостью в ткани и полости.

*Референсные значения:* 30–50 г/л.

*Диагностическое значение.* Неблагоприятна пониженная концентрация альбумина, особенно тяжелый прогноз у больных с хроническими заболеваниями печени. Для них повышение концентрации альбумина после гипоальбуминемии указывает на успешное лечение.

*Гиперальбуминемией* сопровождаются обезвоживание, прием анаболических стероидов, чрезмерное внутривенное введение альбумина при инфузиях.

*Гипоальбуминемией* сопровождаются сниженный синтез (недоедание, синдром мальабсорбции, болезни печени), повышенная потеря (нефротический синдром, энтероколиты, ожоги, кровотечения, выпот, экссудат), повышенный распад альбумина (сепсис, лихорадка, травмы, новообразования, синдром Кушинга, гипертиреоз, гиперкортицизм), гипергидратация.

*Влияющие факторы.*

- Положение тела и физическая активность могут влиять на уровень альбумина. У госпитализированных пациентов (лежачий режим) концентрация альбумина на 5–10 г/л ниже нормы.
- Пережатие сосудов во время взятия крови может несколько повысить концентрацию белка в крови.

**Общий белок** — сумма белков сыворотки крови, по особенностям структуры их делят на альбумины и глобулины. Большая часть белков сыворотки крови синтезируется в печени, Ig — плазматическими клетками.

*Референсные значения:*

- дети до 1 года — 44–73 г/л;
- 1–2 года — 56–75 г/л;
- 2–14 лет — 60–80 г/л;
- взрослые — 65–85 г/л.

*Диагностическое значение.* Выявление нарушений белкового обмена при острых и хронических инфекциях, заболеваниях печени, почек, мальабсорбция при хронических заболеваниях ЖКТ, голодание, ожоги, критические состояния и др. В сочетании с альбумином и белковыми фракциями — для оценки диспротеинемии.

*Гиперпротеинемией* сопровождаются:

- гипергаммаглобулинемия;
- моноклональные гаммапатии при миеломе, амилоидозе, лимфоме;
- дегидратация (относительная гиперпротеинемия);
- обширные ожоги;
- полиурия при синдроме неадекватной секреции вазопрессина.

*Гипопротеинемией* сопровождаются:



- недостаточное поступление или усвоение белков пищи (голодание, панкреатиты, энтероколиты);
- заболевания печени с синдромом гепатодепрессии (циррозы, гепатиты, токсическое поражение печени);
- потери белков (протеинурия при заболеваниях почек, экссудативная энтеропатия при энтеритах);
- усиленный распад белков (тяжелые соматические заболевания, продолжительная гипертермия, ожоговая болезнь, онкопатология);
- выход белков из сосудистого русла, образование экссудатов и транссудатов.

#### *Влияющие факторы.*

- Беременность (особенно в III триместре).
- Ложное повышение при длительном наложении жгута при венепункции.

**Белковые фракции** сыворотки крови исследуют методом электрофореза, используемым в клинических лабораториях, выделяют пять фракций: альбумины,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины. Фракция альбумина однородна. Глобулиновые фракции содержат функционально различные белки, но на изменение показателей электрофореграммы влияют лишь белки, концентрация которых в норме или при патологии  $>1$  г/л:

- $\alpha_1$ -глобулины: белки острой фазы —  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин или орозомукоид;
- $\alpha_2$ -глобулины:  $\alpha_2$ -макроглобулин, гаптоглобин;
- $\beta$ -глобулины: трансферрин, С3-компонент комплемента,  $\beta$ -липопротеины;
- $\gamma$ -глобулины: IgA, IgM, IgG.

Изменение соотношения белковых фракций сыворотки крови (диспротеинемия) наблюдается при многих патологических состояниях, но исследование белковых фракций клинически информативно лишь при парапротеинемических гемобластозах, системных аутоиммунных патологиях, нефротическом синдроме, хронических гепатитах и циррозе печени разной этиологии. Более точную информацию дает исследование индивидуальных белков сыворотки крови.

**Ориентировочные пределы** белковых фракций: альбумин — 60–74%;  $\alpha_1$ -глобулины — 1–4%;  $\alpha_2$ -глобулины — 4–11%;  $\beta$ -глобулины — 8–13%;  $\gamma$ -глобулины — 6–17%.

## Глава 6. Клиническая биохимия

**Диагностическое значение.** Выявление и мониторинг диспротеинемии при острых и хронических воспалительных заболеваниях, диффузных заболеваниях соединительной ткани, хронических гепатитах и циррозе печени. Диагностика миеломной болезни и других моноклональных гаммапатий.

#### **Основные типы протеинограмм.**

- **Острофазный ответ** — повышение уровня  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов в связи с усилением биосинтеза в печени белков острой фазы при воспалении любой этиологии.
- **Хроническое воспаление** — увеличение уровня  $\beta$ -глобулинов (хронические инфекции разной этиологии, РА).
- **Цирроз печени** — увеличение уровня  $\beta$ -глобулинов, слияние  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов вследствие мезенхимально-воспалительного синдрома, при развитии гепатодепрессивного синдрома возможно снижение уровня альбумина.
- **Нефротический синдром** — повышение уровня  $\alpha_2$ -глобулинов в связи с усилением синтеза и повышением уровня сывороточного уровня  $\alpha_2$ -макроглобулина, возможно снижение уровня альбумина из-за его массивной потери с мочой.
- **Моноклональная гаммапатия** — появление на электрофореграмме отдельной дискретной полосы в области глобулярных фракций (моноклональный белок, М-градиент, М-белок), состоящей из Ig или их фрагментов, синтезирующихся злокачественно трансформированными клонами В-лимфоцитов. Концентрации М-белка более 15 г/л с высокой вероятностью свидетельствуют о миеломной болезни. При болезни легких цепей М-белок при электрофорезе сыворотки может не определяться, поскольку легкие цепи Ig (белок Бенс-Джонса) проходят через почечный фильтр и выводятся с мочой. Появление М-белка может наблюдаться при хронических гепатитах, циррозе печени, а также у некоторых пациентов престарелого возраста без клинических патологий, ассоциированных с моноклональной гаммапатией. Имитировать М-белок могут высокие концентрации СРБ и фибриногена. При выявлении М-белка необходима его последующая иммунохимическая идентификация методом электрофореза с иммунофиксацией.

**Влияющие факторы:** беременность (III триместр), прием андрогенов, эстрогенов, глюкокортикоидов.

**Билирубин** — продукт распада порфиринового кольца Hb и других гемсодержащих белков в клетках ретикулоэндотелиальной системы, селезенке и печени. Билирубин содержится в сыворотке крови в виде двух фракций: прямого (конъюгированного) и непрямого. При распаде Hb первоначально образуется билирубин, который из-за плохой растворимости в воде является токсичным — при повышении его содержания он растворяется в липидах мембран и вызывает нарушения их функционирования. В норме в плазме крови билирубин связывается с альбумином (непрямой билирубин), что предотвращает его проникновение в липидные слои мембран. В печени в гепатоцитах свободный билирубин связывается с глюкуроновой кислотой с образованием водорастворимого конъюгированного (прямого) билирубина, секретируемого в желчные протоки. В кишечнике происходят химические превращения

билирубина под действием ферментов микрофлоры с образованием пигмента стеркобилиногена (стеркобилина), который выводится из организма в основном с калом и частично с мочой.

В клинических лабораториях измеряют концентрацию общего и прямого билирубина, по разнице рассчитывают концентрацию непрямого билирубина. При гипербилирубинемии свыше 27–34 мкмоль/л развивается синдром желтухи, обусловленный накоплением билирубина в тканях организма с появлением желтой окраски кожи и конъюнктивы. По патобиохимическим особенностям развития выделяют механическую (обтурационную), паренхиматозную и гемолитическую желтуху, а также физиологическую желтуху новорожденных, гемолитическую болезнь плода и новорожденного (ГБПН). При гипербилирубинемии с повышением уровня прямого билирубина он может быть обнаружен в моче, поскольку почечный фильтр в норме проницаем для этого низкомолекулярного пигмента. Поступления в мочу непрямого билирубина при повышении его плазменной концентрации не происходит (задерживается почечным фильтром из-за комплексированного с ним альбумина), за исключением случаев патологий почек с повреждением почечного фильтра.

*Материал (проба):* сыворотка крови; избегать гемолиза и воздействия света, до исследования можно хранить в темноте 48 ч при комнатной температуре, 7 сут при +4 °С, 6 мес при –20 °С.

*Референсные значения:* новорожденные (1 сут) — до 68 мкмоль/л; взрослые и дети (кроме периода новорожденности) — до 19 мкмоль/л (билирубин прямой; конъюгированный — до 6,8 мкмоль/л).

*Диагностическое значение.* Выявление и мониторинг желтухи при гемолитических анемиях, заболеваниях печени, холестазах. Дифференциальная диагностика желтухи.

*Гипербилирубинемией* сопровождаются следующие патологии.

- Энзимопатические желтухи — повышение концентрации билирубина развивается в результате наследственных дефектов метаболизма билирубина, проявляются перемежающейся гипербилирубинемией при отсутствии изменений структуры печени, гемолиза, Rh-конфликта и холестаза (синдром Жильбера). Это доброкачественное состояние. Единственная аномалия — небольшое увеличение уровня билирубина за счет его непрямой фракции. Уровень общего билирубина редко превышает 70 мкмоль/л. В результате нарушения фермента неконъюгированный билирубин накапливается в тканях и приводит к окрашиванию склер, слизистых оболочек и кожных покровов в желтый цвет.
- Гемолитические анемии вызывают лишь незначительное увеличение концентрации билирубина, редко выше 70 мкмоль/л. Высокий уровень сывороточного билирубина служит признаком заболевания, связанного с повреждением печеночных клеток и, следовательно, с нарушением конъюгации и экскреции билирубина.
- Острый гепатит, возникающий в результате вирусной инфекции или алкогольной интоксикации, проявляется повышением уровня билирубина, часто больше 300 мкмоль/л. В период выздоровления содержание билирубина постепенно возвращается к нормальному уровню. В некоторых случаях воспаление полностью не проходит, при хроническом активном гепатите уровень билирубина может оставаться высоким.
- Цирроз печени на ранних стадиях может быть с нормальной концентрацией билирубина, уровень билирубина повышается в случае прогрессирования болезни, приводящего к печеночной недостаточности.
- Рак и метастазы в печень часто приводят к повышению уровня билирубина уже на поздних стадиях; у таких пациентов желтуха — плохой прогностический признак.
- Обструкция желчных протоков с последующим ограничением экскреции конъюгированного билирубина и увеличением его уровня в сыворотке может осложнять течение желчнокаменной болезни. При обтурации общего желчного протока (камень, воспаление, опухоль) из-за скопления желчи в печеночных капиллярах желчь (с прямым, конъюгированным билирубином) проходит в кровеносные капилляры. Уровень конъюгированного билирубина в плазме крови нарастает, а затем превышает почечный порог. Почечный фильтр свободно пропускает прямой билирубин. Билирубинурия при обтурационных желтухах — явление постоянное. В начале заболевания билирубин в моче практически не обнаруживается, а его высокая концентрация (моча цвета темного пива) на фоне выраженной желтухи и бесцветных каловых масс служит признаком разгара заболевания.
- Желтуха новорожденных. У всех детей при рождении содержание билирубина повышается в течение первой недели жизни, вызывая желтуху у 60% доношенных и 80% недоношенных новорожденных. В подавляющем большинстве случаев это физиологическая желтуха. Ее развитие связано с усиленной деструкцией эритроцитов при замене фетального Hb на HbA и сниженной способностью печени в младенческий период осуществлять конъюгацию билирубина такими темпами, чтобы уравновесить усиленную продукцию. Наиболее частая причина персистирующей желтухи — грудное вскармливание; до трети естественно вскармливаемых младенцев страдают такой желтухой до 12 нед (ее называют желтухой грудного молока). Более серьезные причины включают ГБПН. Если концентрация неконъюгированного билирубина превышает 350 мкмоль/л, существует риск серьезнейшего осложнения желтухи новорожденных — ядерной желтухи (билирубиновая энцефалопатия). Это отложение билирубина в базальных ганглиях головного мозга, вызывающее гибель нейронов. Длительное повреждение мозга в результате ядерной желтухи может стать причиной тяжелых расстройств здоровья ребенка.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Влияющие факторы.* Гемолиз *in vivo* или *in vitro* (аналитическая интерференция), гепатотоксичные и холестатические лекарственные препараты, а также препараты, вызывающие гемолиз.

**Глюкоза** — моносахарид, основной энергетический субстрат для большинства тканей организма. Концентрация глюкозы в плазме (сыворотке) крови — интегральный показатель обмена углеводов в организме. Гипергликемический эффект в норме оказывают несколько гормонов — глюкагон, кортизол, адреналин, глюкокортикоиды, усиливающие различные процессы образования глюкозы в тканях. Инсулин — единственный гипогликемический гормон.

Стимуляция транспорта глюкозы из крови в клетки и активация фермента глюкокиназы (гексокиназы) инсулином ведут к усилению утилизации глюкозы в тканях-мишенях этого гормона (печень, скелетные мышцы, жировая ткань).

*Референсные значения:* глюкоза сыворотки крови — 3,5–6,1 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Диагностика и мониторинг СД, гестационного диабета беременных, нарушения толерантности к глюкозе. Выявление и мониторинг нарушений углеводного обмена при недостаточности надпочечников, гипопиза, заболеваниях печени, сепсисе, шоке и других критических состояниях. Скрининг на нарушения углеводного обмена в группах риска развития СД (ожирение, возраст старше 45 лет, СД I типа в семейном анамнезе).

*Влияющие факторы.* Хранение крови без добавления ингибитора гликолиза до отделения от форменных элементов сопровождается снижением глюкозы с интенсивностью примерно 10% за 1 ч.

**Креатинин** — конечный продукт распада креатинфосфата и креатина, участвующих в энергообеспечении мышечного сокращения. Креатинин выводится из крови почками, свободно фильтруется в клубочках почек фильтрации, затем в канальцах не реабсорбируется и не секретируется. Увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови отражает снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Креатинин не является чувствительным показателем нарушений фильтрационной способности почек в ранних стадиях, может оставаться в референтных пределах при поражении значительной части нефронов.

*Референсные значения в сыворотке крови:*

- дети 1–14 лет — 27–62 мкмоль/л;
- женщины — 50–100 мкмоль/л;
- мужчины — 60–115 мкмоль/л.

*Увеличение концентрации креатинина в сыворотке* наблюдается при:

- снижении клубочковой фильтрации при дисфункции почек любой этиологии;
- эндокринных нарушениях, сопровождающихся изменением метаболизма скелетных мышц (акромегалия и гигантизм, гипертиреоз);
- некрозе скелетных мышц, воспалительных и метаболических заболеваниях с вовлечением мышц;
- голодании со снижением мышечной массы.

**Лактат** — продукт анаэробного метаболизма глюкозы, активирующегося при снижении обеспечения тканей кислородом. Источником лактата крови в норме являются скелетные мышцы (при физической работе), а также эритроциты, неспособные расщеплять глюкозу аэробным путем из-за отсутствия митохондрий. Отток лактата из крови обусловлен его использованием для синтеза глюкозы (глюконеогенеза) в печени, в меньшей степени — в почках. Накопление лактата в тканях, крови может быть следствием:

- усиления его продукции при гипоперфузии тканей;
- снижения парциального давления кислорода в крови;
- повышения сродства Нb к кислороду;
- продукции опухолевыми клетками (из-за характерной для них высокой активности гликолиза);
- интенсивной физической нагрузки и/или ослабления утилизации печенью.

Накопление лактата может вести к развитию метаболического ацидоза (при концентрации в плазме артериальной крови свыше 7 ммоль/л) с характерным увеличением анионного интервала.

*Референсные значения:*

- плазма венозной крови — до <2,2 ммоль/л;
- плазма артериальной крови — до <1,6 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Оценка адекватности доставки кислорода в ткани при всех критических состояниях, сопровождающихся нарушениями кровообращения, внешнего дыхания, кислородотранспортной функции крови. Существенное повышение лактата ухудшает прогноз при сепсисе.

*Увеличение концентрации:* острое кровотечение, тяжелая анемия, тяжелая сердечная недостаточность, ацидоз при алкоголизме, анаэробная физическая нагрузка, почечная/печеночная недостаточность.

*Влияющие факторы.* Наложение жгута при взятии венозной крови.

**Мочевая кислота** — конечный продукт распада пуриновых азотистых оснований — аденина и гуанина, входящих в состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Выводится из организма с мочой. При повышенном образовании мочевой кислоты могут образовываться кристаллы натриевых солей мочевой кислоты — уратов, что лежит в основе патогенеза подагры. Клинические проявления подагры (артриты, мочекаменная болезнь, уратная нефропатия) обусловлены отложением кристаллов уратов в суставной жидкости, окружающих суставы тканях, в паренхиме или в канальцах почек. Повышенному образованию мочевой кислоты способствуют врожденная недостаточность участвующих в обмене пуринов ферментов, усиленный катаболизм нуклеиновых кислот при массивном разрушении тканей, повышенном потреблении животной пищи, богатой пуринами. Риск подагры нарастает по мере увеличения гиперурикемии, но клинические проявления подагры не всегда тесно коррелируют с ее уровнем.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Референсные значения:*

- дети до 14 лет — 120–320 мкмоль/л;
- мужчины — 210–420 мкмоль/л;
- женщины — 150–350 мкмоль/л.

*Диагностическое значение.* Диагностика и мониторинг подагры, в том числе у больных, имеющих метаболический синдром. Исключение подагры как причины мочекаменной болезни.

*Увеличение концентрации:* длительное голодание, физическая нагрузка, диета, богатая пуриновыми основаниями, употребление алкоголя.

**Мочевина** — синтезируемый в печени конечный продукт детоксикации эндогенного аммиака, образующегося при распаде белков и других азотсодержащих соединений. Концентрация мочевины в плазме (сыворотке) крови отражает соотношение скорости ее образования и выведения с мочой. Скорость синтеза мочевины возрастает при потреблении чрезмерно обогащенной белком пищи, усиленном эндогенном катаболизме в условиях голодания или повреждения тканей, при всасывании аминокислот и пептидов после кровоизлияния в ЖКТ. Существенное увеличение содержания мочевины в сыворотке крови указывает на нарушение функции почек. Это заключение почти однозначно при содержании мочевины в плазме крови, превышающем 15 ммоль/л. Исследование экскреции мочевины с мочой используется для оценки баланса между процессами синтеза и распада белков в организме — азотистого баланса. Отрицательный азотистый баланс проявляется задержкой роста у детей, снижением массы тела, снижением скорости заживления ран, а также нарушениями, обусловленными снижением скорости пролиферации клеток быстро обновляемых тканей.

*Референсные значения:*

- дети до 14 лет — 1,8–6,4 ммоль/л;
- взрослые 14–60 лет — 2,5–6,4 ммоль/л;
- пожилые старше 60 лет — 2,9–7,5 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Оценка выделительной функции почек.

*Увеличение концентрации:* диета с высоким содержанием белка, прием нефротоксичных лекарственных препаратов, увеличенный катаболизм эндогенных белков при гипертиреозе, приеме глюкокортикоидов.

**ТГ** — эфиры спирта глицерола и высших жирных кислот. Основная функция — энергетический субстрат. Синтез эндогенных ТГ осуществляется в печени и жировой ткани; в эпителии тонкой кишки происходит ресинтез ТГ из продуктов переваривания ТГ пищи. В адипоцитах жировой ткани ТГ депонируются, в мышцах и других тканях используются как энергетический субстрат. Содержание ТГ в плазме крови увеличивается через 30–60 мин после приема пищи, что из-за присутствия хиломикронов придает плазме мутность («хилез»), и возвращается к исходному уровню в течение 12 ч. Повышенный уровень ТГ может быть обусловлен увеличением содержания в плазме крови хиломикронов и/или липопротеидов очень низкой плотности. Если при сохранении плазмы при +4...+8 °С в течение 12–18 ч появляется «сливкообразный» слой с просветлением плазмы, то это характерно для гиперлипидемии, обусловленной хиломикронами, сохранение мутности плазмы — для повышенного содержания липопротеидов очень низкой плотности. Повышенная концентрация ТГ в крови ассоциируется с повышенным риском панкреатита, а также развитием атеросклероза и ишемической болезни сердца.

*Референсные значения в сыворотке крови:* 0,5–1,7 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Оценка риска атеросклероза и его осложнений. Мониторинг коррекции атерогенных нарушений липидного обмена.

*Увеличение концентрации.*

- Первичные дислипидемии: семейная или спорадическая эндогенная гипертриглицеридемия, наследственный дефицит липопротеинлипазы, семейная гиперлипидемия.
- Вторичные дислипидемии:
  - нарушение толерантности к глюкозе, СД, атеросклероз;
  - вирусные гепатиты, цирроз печени, обтурация желчевыводящих путей;
  - острый и хронический панкреатит, ожирение, алкоголизм;
  - нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность;
  - гипотиреоз, подагра, гликогенозы I, III и VI типа.

*Влияющие факторы.* Прием пищи менее чем за 12 ч до исследования, высококалорийная пища, диета с высоким содержанием углеводов, прием алкоголя накануне сдачи крови.

**ХС общий** — структурный компонент мембран клеток, исходный субстрат при синтезе половых гормонов, глюкокортикоидов, желчных кислот, витамина D, выполняет роль структурного антиоксиданта. Синтезируется в печени (до 80%) и поступает в организм с продуктами животного происхождения. Транспортируется в крови в составе ЛПНП, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов очень низкой плотности. Общий ХС включает как этерифицированный (связанный эфирной связью с жирной кислотой), так и свободный ХС липопротеидов всех видов. Значение ХС как антиоксиданта увеличивается с возрастом, так как у пожилых людей системно снижается активность ферментных систем, в частности ферментов антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы. ХС за счет массивной циклической структуры выполняет роль «ловушки» для свободных радикалов. В этой связи чрезмерное снижение ХС может иметь негативные последствия из-за уменьшения антиоксидантного потенциала клеток и увеличения вероятности мутационного воздействия эндогенно образующихся свободных радикалов и радиационных воздействий внешних факторов. Таким образом, ХС — это

вещество, жизненно необходимое для человека и одновременно фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

## Глава 6. Клиническая биохимия

В сутки из пищи усваивается около 1,5 г экзогенного ХС, это составляет 35–40% ХС, попавшего в организм.

У взрослого человека синтез ХС происходит практически только в печени и в дистальной части тонкой кишки, хотя большинство тканей способно к синтезу ХС. Ключевым ферментом синтеза эндогенного ХС является 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза (ГМГ-КоАредуктаза). Активность этого фермента регулируется по принципу обратной связи. Инсулин и трийодтиронин увеличивают активность ГМГ-КоАредуктазы, а глюкагон и кортизол оказывают ингибирующее действие на этот фермент. Гиполипидемические препараты статины снижают уровень ХС в организме, блокируя ГМГ-КоАредуктазу.

*Референсные значения в сыворотке крови:* 3,1–5,2 ммоль/л.

Выделяют «желательный», «допустимый» и «патологический» диапазоны. Желательным является уровень общего ХС менее 5,2 ммоль/л, при концентрации в диапазоне 5,2–6,4 ммоль/л рекомендуется исследовать содержание холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП); высокими считаются уровни ХС >6,4 ммоль/л.

*Диагностическое значение.*

- Диагностика врожденных нарушений липидного обмена.
- Диагностика вторичных нарушений липидного обмена.
- Оценка риска сердечно-сосудистых событий.

**ХС-ЛПВП** или ЛПВП, — мицеллы, состоящие из фосфолипидов, специфических белков, синтезируемых в гепатоцитах, — аполипопротеинов (Апо-белков) и гидрофобных липидов, преимущественно ХС. ЛПВП осуществляют в крови транспорт ХС от клеток периферических тканей, в том числе кровеносных сосудов сердца, в печень, где ХС частично превращается в желчные кислоты и выводится из организма в составе желчных мицелл. Сниженный уровень ХС-ЛПВП рассматривают как фактор риска развития атеросклероза.

*Референсные значения в сыворотке крови:* 0,9–1,9 ммоль/л.

Снижение концентрации ХС-ЛПВП менее 1,0 ммоль/л для мужчин и менее 1,2 ммоль/л для женщин связывают с повышенным риском развития ишемической болезни сердца и ее осложнений.

**Холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП)** — мицеллы, состоящие из фосфолипидов, специфических белков, синтезируемых в гепатоцитах (Апо-белков), ХС и ТГ. ЛПНП образуются в крови из липопротеидов очень низкой плотности, они переносят ХС из печени к клеткам периферических тканей. ХС-ЛПНП рассматривается как основной показатель, отражающий нагрузку по ХС на периферические ткани и как следствие — риск ССЗ. Патогенез атеросклероза включает перекисное повреждение компонентов ЛПНП под действием местных факторов воспаления, их захват макрофагами в сосудистых стенках и включение ХС из ЛПНП в состав образующихся атеросклеротических бляшек.

*Референсные значения в сыворотке крови:* 2,1–3,5 ммоль/л.

Прогрессирование атеросклеротических бляшек замедляется при уровне ХС-ЛПНП ≤1,8 ммоль/л. Это значение ХС-ЛПНП принято в качестве целевого уровня у пациентов с ССЗ.

*Диагностическое значение.*

- Оценка кардиального риска.
- Мониторинг коррекции атерогенных нарушений липидного обмена.
- Оценка эффективности гиполипидемической терапии (статины).

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.1.3. Минералы и электролиты

В организме минеральные вещества содержатся в виде растворенных солей, в нерастворенном виде, часть связана с белками и другими органическими соединениями. Минеральные вещества поддерживают осмотическое давление жидкостей, участвуют в формировании электрических характеристик клеток и внутриклеточных компартментов, регулируют кислотно-щелочное соотношение, участвуют в распределении воды в организме, являются необходимым структурным компонентом костей и других тканей, определяют работу мышц, свертывание крови, регулируют активность ферментов и выполняют ряд других важнейших функций. Поддержание ионного баланса между клетками и внеклеточным пространством является важнейшим параметром гомеостаза. Общая концентрация катионов в плазме — около 150 ммоль/л, из них на натрий приходится примерно 140 ммоль/л, на калий — около 4 ммоль/л, остальное количество составляют кальций, магний и другие катионы. Плазма электронейтральна, количество катионов в ней соответствует количеству анионов. Из анионов основное количество в норме приходится на хлор (около 112 ммоль/л) и бикарбонаты (около 25 ммоль/л). Оставшиеся анионы, составляющие так называемый анионный промежуток, включают фосфаты, сульфаты, белки, органические кислоты, такие как лактат, цитрат, пируват, ацетоацетат, гидроксибутират. Для этой цели, по разным оценкам, клетки используют от 10 до 20% образующейся в них энергии.

Распределение ионов неравномерное. Распределение ионов между клеткой и внеклеточным пространством представлено в **табл. 6.1**.

**Таблица 6.1.** Распределение ионов между вне- и внутриклеточным пространством, ммоль на 1 л воды

Ион	Плазма	Внеклеточная жидкость	Внутриклеточная жидкость	
			Эритроцит	Скелетная мышца
Калий	4,5	4,0	99	150
Натрий	142	145	23	10
Кальций	2,5	2,1	0,025	0,01
Магний	1,0	1,1	0,8	13
Хлориды	103	116	54	15

**Калий.** Практически все соли калия диссоциированы в плазме крови, поэтому при любом способе определения измеряется ион  $K^+$ , он является основным потенциалобразующим катионом. От его распределения между клетками и внеклеточной средой зависят электрофизиологические свойства.

*Референсные значения:*  $K^+$  в сыворотке крови — 3,5–5,5 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Как при увеличении, так и при снижении  $K^+$  меняются проводимость, возбудимость, автоматия и передача нервных импульсов. Если уровень  $K^+$  повышается примерно до 8 ммоль/л, то это приводит к остановке сердца в диастоле. Если же уровень  $K^+$  слишком низкий, то сердце останавливается в систоле.

Внеклеточное содержание  $K^+$  первично контролируется почками и в меньшей степени — ЖКТ. В почках  $K^+$  фильтруется и затем практически полностью реабсорбируется в проксимальных канальцах. В дистальных канальцах имеет место незначительная активная секреция  $K^+$ . Однако она первично связана с активной АТФ-зависимой реабсорбцией Na, в обмен на который из тубулярных клеток в просвет поступают ионы  $H^+$  и  $K^+$ . Так как оба иона,  $H^+$  и  $K^+$ , могут обеспечивать электронейтральность реабсорбции  $Na^+$ , то между экскрецией  $H^+$  и  $K^+$  существует тесная связь. При ацидозе имеет место тенденция к секреции ионов  $H^+$  с мочой и, соответственно, к снижению выделения  $K^+$ . Наоборот, при алкалозе будут задерживаться в организме ионы  $H^+$  и усиленно экскретироваться ионы  $K^+$ . Таким образом, при ацидозе имеется тенденция к гиперкалиемии, при алкалозе — к гипокалиемии. При почечном тубулярном ацидозе эта тенденция исчезает.

Имеется относительное постоянство выведения  $K^+$ . Даже при бедной  $K^+$  диете выделение его с мочой — не менее 10–20 ммоль/сут. Потеря  $K^+$  через кожу и ЖКТ составляет примерно 15–20 ммоль/сут. Почки не могут предупредить истощение  $K^+$  в организме, если потребление  $K^+$  становится меньше 40 ммоль/сут (1,5 г в день). При жесткой диете с большим потреблением воды и приемом мочегонных препаратов может возникнуть гипокалиемия.

## Глава 6. Клиническая биохимия

Контроль за уровнем калия важен при острой и хронической почечной недостаточности, сердечной недостаточности, ацидозе и алкалозе, при проведении гемодиализа, приеме диуретиков, сердечных гликозидов. При нарушениях сердечного ритма необходимо исключить патологические изменения калия как причины аритмии.

*Гиперкалиемия* может возникнуть при:

- избыточном быстром вливании растворов калия;
- выходе калия из клеток во внеклеточную жидкость при массивном гемолизе, рабдомиолизе, распаде опухолей, тяжелых повреждениях тканей, глубоких ожогах, ацидозе;
- сниженном выделении калия почками при ОБП с олиго- и анурией, ацидозом, болезни Аддисона, гипофункции ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, шоковых состояниях;
- при нарушении технологии преаналитического этапа (выход  $K^+$  из эритроцитов или выполнение теста в многоразовой стеклянной посуде).

*Гипокалиемия* формируется при:

- недостаточном поступлении калия в организм при хроническом голодании или внутривенном введении больших объемов инфузионных растворов, не содержащих соли калия;
- потере калия с мочой при почечном канальцевом ацидозе, почечной недостаточности, альдостеронизме, синдроме Кушинга, алкалозе;
- потере калия организмом с кишечными секретами при частой рвоте, профузном поносе, кишечных свищах;
- потере с потом при муковисцидозе;
- введении инсулина из-за поступления калия в клетки с глюкозой.

**Натрий.** На долю Na приходится примерно 90% всех внеклеточных катионов, это катион внеклеточного пространства, к нему малочувствительны клетки. Это чрезвычайно гидрофильный ион. Перемещение воды в организме контролируется движением Na. Из-за заряда и большой гидратной оболочки движение Na через липидный бислой клеточной мембраны затруднено. Первостепенную роль играет Na в поддержании осмотического давления. Гипо- и гипернатриемии приводят к изменениям осмотичности среды.

*Референсные значения:*  $Na^+$  в сыворотке крови — от 135 до 146 ммоль/л.

*Диагностическое значение.* Умеренная гипонатриемия является проявлением синдрома солевого истощения. Это вторичный феномен, поэтому необходимо лечить основное заболевание. Клинические проявления гипонатриемии обычно отсутствуют до тех пор, пока концентрация Na в плазме не упадет ниже 120 ммоль/л, но они могут возникнуть и при более высокой концентрации, если снижение происходит очень быстро. Тяжелая гипонатриемия иногда требует срочной коррекции, но обычно это состояние сочетается с клиническим проявлением водной интоксикации.

*Гипонатриемия возникает в результате:*

- недостаточного поступления Na в организм;
- потери Na при рвоте, диарее, сильной потливости;
- недостаточности надпочечников;
- острой почечной недостаточности (полиурическая стадия);
- отеков и асцита при хронической сердечной недостаточности, циррозе печени, печеночной недостаточности, нефротическом синдроме;
- гипотиреоза;
- синдрома неадекватной секреции антидиуретического гормона.

*Гипернатриемия развивается при:*

- гипертонической дегидратации из-за усиленного потоотделения (лихорадка и др.), гипервентиляции, рвоты, диареи;
- недостаточном поступлении воды в организм;
- снижении выведения с мочой (первичный и вторичный гиперальдостеронизм, синдром Кушинга).

**Кальций** выполняет несколько важных функций в организме: структурная — кости, зубы, нейромышечная — контроль возбудимости, освобождение медиаторов, обеспечение сокращения и расслабления мышц, ферментная — кофактор компонентов свертывания, сигнальная — внутриклеточный вторичный мессенджер. В плазме кальций присутствует в нескольких формах: связанным с белком, главным образом альбумином, в комплексе с бикарбонатом, фосфатом, цитратом и в свободном виде ионизированного кальция.

*Референсные значения:*

- кальций ионизированный — 1,15–1,27 ммоль/л;
- кальций общий — 2,05–2,55 ммоль/л.

*Ионизированный Ca ( $\text{Ca}^{+2}$ )* физиологически активен, поэтому концентрация  $\text{Ca}^{+2}$  поддерживается на определенном уровне. Основными регуляторами обмена  $\text{Ca}^{+2}$  являются гиперкальциемические гормоны — кальцитриол (активная форма витамина D) и паратиреоидный гормон (повышает уровень кальция плазмы крови, усиливая его всасывание в тонкой кишке, реабсорбцию в почках, резорбцию костной ткани), а также гипокальциемический гормон — кальцитонин (снижает уровень кальция плазмы крови, в основном через усиление минерализации костной ткани).

Определение  $\text{Ca}^{2+}$  наиболее полезно при оценке быстрых изменений его концентрации, которые наблюдаются, в частности, при переливании крови и кровозаменителей, при экстракорпоральном кровообращении, при диализе.

*Общий Ca* — сумма связанного с белками, комплексированного и ионизированного кальция. Определение общего Ca представляет клиническую ценность, свидетельствуя об уровне притока Ca в кровь. Чаще всего направленность отклонений общего Ca совпадает с изменениями  $\text{Ca}^{2+}$ , поскольку регуляция гомеостаза Ca осуществляется главным образом путем изменений уровня притока Ca в кровь. Альбумин связывает кальций, поэтому при дефиците альбумина происходит смещение в сторону ионизированного кальция, и по общему кальцию можно недооценить гиперкальциемию. Наоборот, в условиях повышенного уровня альбумина (более 45 г/л) происходит снижение активного ионизированного кальция.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Формулы для коррекции измеренного Ca на общий Ca в зависимости от концентрации альбумина в сыворотке/плазме.* Расчет скорректированного общего Ca в зависимости от концентрации альбумина:

- для [альбумина] <40 г/л,  $\text{Ca}_{\text{скорректиров}} = \text{Ca}_{\text{измеренный}} + 0,02 \times \{40 - [\text{альбумин}]\}$ , ммоль/л;
- для [альбумина] >45 г/л,  $\text{Ca}_{\text{скорректиров}} = \text{Ca}_{\text{измеренный}} - 0,02 \times \{[\text{альбумин}] - 45\}$ , ммоль/л.

*Гиперкальциемия* связана чаще всего с усилением мобилизации кальция из костной ткани: гипервитаминоз D, первичный гиперпаратиреоз (аденома или карцинома паращитовидных желез), эктопический синтез паратгормона при раке легких, почек, яичников, мочевого пузыря, пищевода, опухолях головы и шеи, вторичный гиперпаратиреоз при хронической почечной недостаточности, при гиповитаминозе D, остеолитический при злокачественных опухолях костной ткани, метастазах в костную ткань (рак МЖ, легких, почек).

*Гипокальциемия возникает в результате* недостаточного всасывания кальция из кишечника и/или снижения его реабсорбции в почках, гиповитаминоза D при рахите у детей и остеомалации у взрослых (в результате сниженной инсоляции, мальабсорбции и нарушений питания), гипопаратиреоза (послеоперационный, аутоиммунный),

гипоальбуминемии (снижается общий кальций, тогда как  $\text{Ca}^{2+}$  может находиться в референтных пределах); алкалоза (повышение pH на 0,1 ед. снижает концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  на 0,05 ммоль/л).

**Магний.** Ионизированный  $\text{Mg}^{2+}$  — преимущественно внутриклеточный катион, является кофактором около 300 ферментов, включая ферменты синтеза белков, гликолиза, трансмембранного переноса ионов.

Ионизированный  $\text{Mg}^{++}$  стабилизирует АТФ и является кофактором для АТФ-зависимых ионных насосов в мембранах нервных, мышечных и других клетках. Комплекс Mg-АТФ необходим для функционирования Са-насоса, определяющего уровень импульсации клеток, обладающих свойством автоматии. Сердечные аритмии возникают при нарушениях в сыворотке уровня  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$  и  $\text{Mg}^{+2}$ . Недостаток  $\text{Mg}^{+2}$  вызывает гипервозбудимость.

*Референтные пределы:* 0,70–1,05 ммоль на 1 л сыворотки крови.

*Гипермагниемия* формируется при болезни почек, болезни Аддисона, гипотермии.

*Гипомагниемия* — следствие хронического алкоголизма (из-за сниженного содержания магния в рационе, нарушения его абсорбции в кишечнике и повышенной экскреции почками); мальабсорбции при раке, колите, сниженной функции ПЖ, резекции желудка, кишечника; диабетического кетоацидоза или некомпенсированного СД (перемещение магния из клеток и усиление экскреции почками).

**Фосфор.** Фосфаты содержатся преимущественно внутри клеток, где выполняют роль структурного компонента органических соединений (нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов), участвуют в энергетическом обмене (креатинфосфат, АТФ). Эта фракция получила название «кислоторастворимый фосфор». Фосфолипиды (липидный фосфор) — основной компонент всех клеточных мембран. Отражением разных пулов фосфора в организме являются фракции фосфора в крови. В плазме  $F_{\text{неорг.}}$  содержится в виде анионов  $\text{HPO}_4^{-2}$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ . Около 95% — это свободные анионы, оставшаяся часть связана с белком. Фосфор и кальций образуют плохо растворимые соединения, поэтому их общая концентрация не превышает определенного уровня и повышение одного из них, как правило, сопровождается снижением другого. Обмен фосфатов и тесно связанный с ним обмен кальция регулируются биологически активной формой витамина D — кальцитриолом (гиперфосфатемический эффект), паратгормоном (эффект зависит от уровня кальцитриола), кальцитонином (гипофосфатемический эффект).

*Референтные значения:* 0,87–1,45 ммоль/л.

*Гипофосфатемия* возникает при дефиците витамина D (остеомаляция, рахит, мальабсорбция), первичном гиперпаратиреозе, выраженной гиперкальциемии различной этиологии, эктопическом синтезе паратгормона злокачественными опухолями. Гипофосфатемия ниже 0,3 ммоль/л может сопровождаться нарушением энергетического обмена в клетках, проявляющемся рабдомиолизом, неврологической симптоматикой. Клинические симптомы, ассоциированные с гиперфосфатемией, обусловлены, как правило, одновременно развивающейся гипокальциемией.

*Гиперфосфатемия* возникает при гипопаратиреозе, ОБП и ХБП; остеолитическом при злокачественных опухолях.

**Медь** участвует во многих ферментативных процессах в качестве активатора или как составная часть активного центра ферментов. Из медьсодержащих гидролаз широко распространена тирозиназа, участвующая в образовании кожного пигмента меланина. Недостаток этого фермента или его блокада в меланоцитах приводит к альбинозу. Свободные ионы меди, так же как ионы других металлов с переменной валентностью, могут инициировать перекисное повреждение белков и липидов. Поэтому медь в сыворотке присутствует исключительно в форме, связанной с церулоплазмином (95%) и альбумином (5%). Церулоплазмин проявляет антиоксидантную активность, функционируя как ферроксидаз в плазме крови, он восстанавливает свободные ферри-ионы в ферро-ионы, связывающиеся белком трансферрином.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Референтные значения:*

- мужчины — 11,0–22,0 мкмоль/л, женщины — 13,3–24,3 мкмоль/л;
- мужчины — 0,75–1,5 мкг/мл; женщины — 0,85–1,8 мкг/мл.

*Дефицит меди* наблюдается у детей (особенно у недоношенных), получающих продукты с дефицитом Cu, у больных на парентеральном питании с недостатком микроэлементов. Проявления дефицита Cu включают нейтропению, анемию, остеопороз, костно-суставные нарушения, снижение пигментации кожи. Симптомы отравления медью: тошнота, рвота, головные боли, понос, боли в животе, в тяжелых случаях могут развиваться поражение печени, желтуха и гемолитический шок.

*Отравление медью* может быть при введении медьсодержащих растворов, медьсодержащих внутриматочных спиралей.

*Болезнь Вильсона–Коновалова* — генетически обусловленное нарушение метаболизма Cu, для которого характерным является прогрессирующее поражение нервной системы и печени, обусловленное токсическими эффектами меди, откладывающейся в этих органах. Дефект связан с транспортом меди, которая накапливается в цитоплазме гепатоцитов и не может связаться с апоцерулоплазмином, уменьшается выделение Cu с желчью. В то же время в сыворотке содержание меди и церулоплазмينا снижено. Экскреция Cu с мочой возрастает из-за существенного возрастания связывания Cu с аминокислотами.

## Глава 6. Клиническая биохимия



## 6.2. Биохимические исследования при сердечно-сосудистых заболеваниях

### 6.2.1. Лабораторные тесты активности атеросклеротического процесса

Лабораторные показатели липидного метаболизма, такие как общий ХС, ТГ, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, являются скрининговыми. Их значение в развитии атеросклероза и его осложнений определено в популяционных исследованиях. При выявлении в скрининговых тестах риска развития атеросклероза рекомендуется исследовать специфические лабораторные показатели, отражающие генетические и патофизиологические механизмы атерогенеза.

**ApoA-1, ApoB.** Все липопротеиды, за исключением ЛПВП, имеют в своей структуре ApoB-белок. Иммунохимическим методом определяется в основном ApoB-100, в рутинной лабораторной практике именно этот Apo-белок обозначается как ApoB. Показатель ApoB можно измерять при концентрации ТГ более 2,2 ммоль/л. Более того, ApoB рекомендуется измерять для оценки риска у пациентов с легкой или умеренной гипертриглицеридемией (2–10 ммоль/л) или очень низким уровнем ХС-ЛПНП <1,8 ммоль/л. Измерение ApoB особенно полезно для определения того, является ли гипертриглицеридемия атерогенным состоянием. В рекомендациях Европейского общества кардиологов (ESC, 2019) подчеркивается, что ApoB является предпочтительным измерением для оценки кардиального риска, поскольку ApoB обеспечивает точную оценку общей концентрации атерогенных частиц при любых обстоятельствах.

ApoA-1 является основным белковым компонентом ЛПВП. Транспорт ХС из клеток периферических тканей в печень (обратный транспорт ХС) осуществляется ЛПВП.

Определение в крови ApoA-1 и ApoB имеет значение для выявления риска атеросклероза в популяции, а отношение ApoB/ApoA-1 превосходит прогностическое значение отдельных липопротеинов и Apo-белков. Это связано с тем, что ApoB/ApoA-1 дает информацию о соотношении прямого транспорта ХС к периферическим клеткам и обратном транспорте от периферических клеток в печень. Абсолютные значения уровня ApoA-1 и ApoB в сыворотке даже в сходных группах пациентов разнятся у разных авторов. Одной из причин, приводящих к неоднозначным результатам, может быть использование разных антител. В то же время отношение ApoB/ApoA-1 лишено этого недостатка и может быть использовано как ранний индикатор нарушений липидного метаболизма и риска атеросклероза. Рекомендуемое значение ApoB/ApoA-1 — <1,1. Чем больше в сыворотке ApoA-1 и меньше ApoB, тем ниже вероятность развития сердечно-сосудистой патологии.

*Референсные значения в сыворотке крови:*

- ApoA-1: мужчины — 0,8–1,5 г/л, женщины — 0,8–1,7 г/л;
- ApoB: мужчины — 0,5–1,2 г/л, женщины — 0,25–1,2 г/л.

**Липопротеин (а) [ЛП(а)]** является проатерогенным, независимым фактором риска развития ССЗ, включая ИМ, инсульт и стеноз аортального клапана. ЛП(а) — сходная с ЛПНП, обогащенная ХС и белком частица, содержит молекулу Apo(a) в дополнение к молекуле ApoB. Несмотря на подобие ЛПНП, ЛП(а) характеризуется метаболизмом иным, чем ЛПНП. Лекарственные препараты, которые снижают концентрацию ЛПНП, не влияют на концентрацию ЛП(а). Концентрация ЛП(а) выше 0,3 г/л связана с двукратным повышением риска ишемической болезни сердца и с пятикратным увеличением риска ишемической болезни сердца, если одновременно повышена концентрация ЛПНП. ЛП(а) может ингибировать фибринолиз, повышая риск развития тромбоза и атеросклероза. Apo(a) и пламиноген имеют структурное сходство, что, возможно, определяет связь между атерогенезом и тромбозом. До 90% вариаций уровней ЛП(а) в плазме могут быть обусловлены генетическими факторами, что делает ЛП(а) наиболее распространенным наследственным фактором риска атеросклеротических ССЗ.

Измерение ЛП(а) повторно не следует проводить у одного и того же пациента, так как концентрация ЛП(а) не претерпевает существенных изменений в течение жизни. Исключениями из этого правила являются обстоятельства, связанные с менопаузой, беременностью, почечной недостаточностью, применением оральных контрацептивов или при назначении терапии для снижения ЛП(а). На концентрацию ЛП(а) не влияет характер диеты, однако уровень ЛП(а) минимально увеличивается при воспалении.

*Референсные значения в сыворотке крови:* 10–30 мг/дл, 0,1–0,3 г/л.

**Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2** — кальций-независимая фосфолипаза, которая в плазме и сыворотке крови человека связана с ЛПНП и в меньшей степени — с ЛПВП, вырабатывается макрофагами и другими воспалительными клетками и повышается при выраженных атеросклеротических поражениях. Она отличается от других фосфолипаз, таких как sPLA2 и sPLA2.

Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 участвует в расщеплении окисленных ЛПНП в сосудистой стенке, гидролизует окисленный фосфолипид с образованием лизофосфатидилхолина и окисленных свободных жирных кислот, которые являются мощными провоспалительными продуктами, способствующими образованию и развитию атеросклеротических бляшек. Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 имеет значительно меньшую вариабельность, чем высокочувствительный СРБ. Кроме того, уровень липопротеин-ассоциированной фосфолипазы A2 не повышается при системных воспалительных заболеваниях, поэтому может быть специфичным маркером сосудистого воспаления. Относительно небольшая биологическая вариабельность липопротеин-ассоциированной фосфолипазы A2 и ее сосудистая специфичность имеют значение для выявления и мониторинга сердечно-сосудистого риска.

## Глава 6. Клиническая биохимия

*Референсные значения в сыворотке крови:* менее 200 нг/мл.

**Рекомендации по оценке липидного обмена при атерогенезе.** Национальное общество по изучению атеросклероза, Российское кардиологическое общество на основании международных рекомендаций выпустили отечественные рекомендации «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза» (российские рекомендации 2020 г. с адаптацией от 2022 г.).

Алгоритм обследования пациентов для оценки состояния сердечно-сосудистой системы состоит из следующих основных этапов: выявление основных факторов риска и клинических симптомов атеросклероза (**табл. 6.2**), определение липидного профиля в венозной крови (**табл. 6.3**).

**Таблица 6.2.** Глобальная оценка 10-летнего сердечно-сосудистого риска, где SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) — систематическая оценка коронарного риска, созданная международной группой экспертов

Риск	Описание
Очень высокий	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Документированное атеросклеротическое ССЗ, клинически или по результатам обследования, включая ОКС, ишемическая болезнь сердца, чрескожное коронарное вмешательство, коронарное шунтирование или другие операции на артериях, инсульт/транзиторная ишемическая атака, поражения периферических артерий.</li> <li><input type="checkbox"/> Атеросклеротическое ССЗ по данным обследований — значимая атеросклеротическая бляшка (стеноз &gt;50%).</li> <li><input type="checkbox"/> СД + поражение органов-мишеней, <math>\geq 3</math> факторов риска, а также раннее начало СД 1-го типа с длительностью &gt;20 лет.</li> <li><input type="checkbox"/> ХБП с СКФ &lt;30 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup>.</li> <li><input type="checkbox"/> SCORE2 &gt;7,5% для возраста до 50 лет, SCORE2 &gt;10% для 50–69 лет и SCORE2-OP &gt;15% для &gt;70 лет.</li> <li><input type="checkbox"/> Семейная гиперхолестеринемия с фактором риска</li> </ul>
Высокий	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Значимо выраженный фактор риска — общий ХС &gt;8 ммоль/л, и/или ХС-ЛПНП <math>\geq 4,9</math> ммоль/л, и/или артериальное давление <math>\geq 180/110</math> мм рт.ст.</li> <li><input type="checkbox"/> Семейная гиперхолестеринемия без фактора риска.</li> <li><input type="checkbox"/> СД без поражения органов-мишеней, СД <math>\geq 10</math> лет или с фактором риска.</li> <li><input type="checkbox"/> ХБП с СКФ 30–59 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup>.</li> <li><input type="checkbox"/> SCORE <math>\geq 5</math> и &lt;10%.</li> <li><input type="checkbox"/> SCORE2 &gt;7,5% для возраста до 50 лет, SCORE2 &gt;10% для возраста 50–69 лет и SCORE2-OP &gt;15% для возраста &gt;70 лет.</li> <li><input type="checkbox"/> Гемодинамически не значимый атеросклероз некоронарных артерий [стеноз(-ы) &gt;25–49%]</li> </ul>
Умеренный	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Молодые пациенты (СД 1-го типа моложе 35 лет, СД 2-го типа моложе 50 лет) с длительностью СД &lt;10 лет без поражения органов-мишеней и фактора риска.</li> <li><input type="checkbox"/> SCORE <math>\geq 1</math> и &lt;5%.</li> <li><input type="checkbox"/> SCORE2 2,5–7,5% для возраста до 50 лет, SCORE2 5–10% для 50–69 лет и SCORE2-OP 7,5–15% для &gt;70 лет</li> </ul>
Низкий	<input type="checkbox"/> SCORE <1%

**Таблица 6.3.** Оптимальные значения липидных параметров в зависимости от категории риска пациента

Параметр	Низкий риск	Умеренный риск	Высокий риск	Очень высокий риск
Общий ХС	Рекомендовано измерение для расчета риска по SCORE			
ХС-ЛПНП, ммоль/л	<3,0	<2,6	<1,8	<1,4
ХС-ЛПВП, ммоль/л	Мужчины >1,0; женщины >1,2			
ТГ, ммоль/л	<1,7			
ЛП(а), мг/дл	<50		<30	

У всех взрослых старше 40 лет рекомендуется проведение скрининга для оценки общего риска с использованием шкалы оценки 10-летнего сердечно-сосудистого риска. В зависимости от категории сердечно-сосудистого риска определены целевые уровни основных липидных параметров (**табл. 6.4**).

**Таблица 6.4.** Целевые уровни основных липидных параметров в зависимости от категории сердечно-сосудистого риска (российские национальные рекомендации Национального общества по изучению атеросклероза, 2020 г.)

ХС-ЛПНП	<b>Очень высокий риск:</b> целевой уровень ХС-ЛПНП <1,4 ммоль/л или на 50% ниже исходного уровня. <b>Высокий риск:</b> целевой уровень ХС-ЛПНП <1,8 ммоль/л и на 50% ниже исходного уровня. <b>Умеренный риск:</b> целевой уровень ХС-ЛПНП <2,6 ммоль/л. <b>Низкий риск:</b> целевой уровень ХС-ЛПНП <3,0 ммоль/л
ХС-неЛПВП	ХС-неЛПВП рекомендуется определять при гипертриглицеридемии, метаболическом синдроме, СД. Целевые уровни ХС-неЛПВП составляют <2,2, 2,6 и 3,4 ммоль/л при очень высоком, высоком и умеренном риске соответственно
АпоВ	АпоВ целесообразно определять у пациентов с гипертриглицеридемией, СД, ожирением или имеющим очень низкий уровень ХС-ЛПНП. Вторичные цели АпоВ составляют <65, 80 и 100 мг/дл у пациентов с очень высоким риском, высоким и умеренным риском соответственно
ТГ	Уровень <1,7 ммоль/л указывает на низкий риск, более высокие уровни указывают на необходимость поиска причин повышения ТГ
ЛП(а)	Целевого уровня для данного показателя нет, но уровень ЛП(а) >180 мг/дл указывает на очень высокий сердечно-сосудистый риск, ЛП(а) >50 мг/дл — на высокий риск

## Глава 6. Клиническая биохимия

Классические лабораторные показатели нарушений липидного обмена остаются базовыми скрининговыми тестами. При этом в связи с клиническими рекомендациями по достижению целевых уровней общего ХС и ХС-ЛПНП произошло смещение диагностической востребованности их определения, особенно при лечении новыми липидоснижающими препаратами, направленными на внутриклеточный и внутриядерный механизм регуляции липидного метаболизма. Выяснение патофизиологических механизмов развития атеросклероза сопровождается внедрением в клиническую практику специфических лабораторных маркеров, отражающих липидотранспортную систему, активность иммуновоспалительных и повреждающих процессов в сосудистой стенке. ЛП(а) является независимым фактором риска развития ССЗ, включая ИМ и инсульт, связанных с тромбозом и атеросклерозом, и может быть основой для разработки новых методов лечения. Лабораторные исследования в сочетании с данными инструментальных методов позволяют с высокой степенью достоверности установить диагноз ССЗ и проводить эффективную лекарственную терапию.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.2.2. Биохимические исследования при некрозе сердечной мышцы

Маркерами, позволяющими оценить некроз кардиомиоцитов, являются тропонин I, тропонин T, МВ-КК, белок, связывающий жирные кислоты, МГ. Эти маркеры высвобождаются в кровоток сразу после некроза клеток миокарда, их уровни увеличиваются с разной скоростью. ДС и ДЧ этих маркеров к повреждениям кардиомиоцитов значительно превышают соответствующие характеристики ранее использованных ферментов.

**Тропонины сердечные.** Сердечная мышца отличается от всех других мышц тем, что постоянно без остановки сокращается в течение всей жизни человека, это обеспечивается специфичностью белков. Выделены и идентифицированы сердечные тропонины: сердечный тропонин I и сердечный тропонин T. К ним получены специфические антитела, с использованием которых наработаны тест-системы, обладающие высокой ДС и ДЧ выявления разрушений кардиомиоцитов.

В кардиомиоцитах присутствуют цитоплазматические изоформы тропонина и миофибриллярные структурированные молекулы тропонина.

**Референсные значения** в сыворотке крови: сердечный тропонин I <0,1 мкг/л, сердечный тропонин T <0,01 мкг/л.

Не все тропониновые тесты дают одинаковый результат, поэтому рекомендовано использовать референсные интервалы, предложенные производителем, и внутрилабораторные референтные интервалы.

**Диагностическое значение.** При ИМ цитоплазматические изоформы тропонина первыми освобождаются в систему циркуляции, их выявляют иммунологически в крови пациента через 2–6 ч от начала боли в груди, а их пиковые уровни регистрируются в период от 12 до 36 ч от момента кардиологической катастрофы. Максимальные концентрации структурных тропонинов регистрируются через 24–48 ч и формируют вторую волну повышения, сохраняются на избыточном уровне в течение 10 сут после манифестации события, а иногда и дольше. Таким образом, сердечный тропонин является ранним маркером как раннего, так и отдаленного повреждения миокарда.

С введением в клиническую практику диагноза ОКС, включающего нестабильную стенокардию, ИМ без подъема сегмента ST, ИМ с подъемом сегмента ST, возникла необходимость определения в системном кровотоке фактически следовых количеств сердечного тропонина. Масштабные проспективные исследования показали: даже небольшое повышение уровня кардиальных тропонинов у пациентов с ОКС связано с повышенным риском неблагоприятных исходов. Это привело к пересмотру диагностических критериев, в которых под ИМ попадали только случаи с очаговым некрозом, вызванным окклюзией коронарной артерии. Новые критерии устанавливали, что *любая степень миокардиального некроза, вызванного ишемией, должна обозначаться как ИМ*, то есть под это определение попадали и мелкоочаговые некрозы, которые часто не выявляются функциональными методами, но регистрируются лабораторными маркерами, отражающими повреждение и некроз кардиомиоцитов. В результате было показано, что при ОКС даже незначительное повышение уровней тропонинов указывает на необходимость агрессивного клинического вмешательства, так как эти незначительные изменения связаны с риском повторного ОКС, повторной госпитализации и летальности.

**Причины подъема тропонинов, не связанные с ОКС:** гипертонический криз, тахи- или брадикардия, легочная эмболия или тяжелая легочная гипертензия, миокардит, расслоение аорты, заболевания аортального клапана или гипертрофическая кардиомиопатия, ушиб сердца, катетерная абляция, кардиостимуляция, биопсия миокарда, гипотиреоз, кардиомиопатия, критические заболевания, особенно сепсис и дыхательная недостаточность. Такой широкий спектр причин повышения тропонинов стал причиной разработки технологии высокочувствительных тропонинов для диагностики ишемического повреждения миокарда.

**Высокочувствительные сердечные тропонины (hs-cTn).** Лабораторные высокочувствительные методы позволяют достоверно оценивать уровни сердечного тропонина T и сердечного тропонина I в таких низких диапазонах, как 0,003–0,006 нг/мл (3–6 пг/мл); некоторые экспериментальные методы выявляют до 0,001 нг/мл (1 пг/мл), что соответствует уровню нанотехнологий и фактически регистрирует единичные молекулы. Принципиально важными для правильного включения теста в группу высокочувствительных, согласно критериям IFCC, высокочувствительный тест на тропонин должен обнаруживать тропонин не менее чем у 50% здоровых людей.

Разнообразие новаторских технологий, повышающих аналитическую чувствительность, у разных производителей наборов привели к ситуации, когда «сравнение между собой значений абсолютных концентраций тропонинов, полученных с помощью тестов различных производителей, не всегда корректно», хотя крупные производители объединились под эгидой IFCC и выполнили процедуру гармонизации результатов измерения.

Наряду с этим международные общества (ассоциации) кардиологов достигли консенсуса по применению и интерпретации тропониновых тестов, который звучит следующим образом:

- предпочтительными маркерами для диагностики ИМ являются сердечный тропонин Т или сердечный тропонин I;
- повышенная концентрация сердечного тропонина — это уровень, превышающий таковой для 99-го перцентиля;
- конкретные значения концентрации тропонина, характерные для 99-го перцентиля, установленные производителем, могут быть найдены в инструкциях к тестам или в недавних публикациях;
- дискриминирующее значение 99-го перцентиля, необходимое для принятия решения о постановке или исключения диагноза ИМ, должно быть определено в лаборатории для каждого специфического теста.

## Глава 6. Клиническая биохимия

Рекомендуется измерение hs-cTn при поступлении у пациентов с подозрением на острую сердечную недостаточность в рамках панели лабораторных анализов, включая полный анализ крови, электролиты, функцию почек, уровень глюкозы в крови, тесты на функцию ЦЖ и печени, с основной целью — исключить ОКС.

**Миоглобин** является одним из ключевых соединений, определяющих интенсивность окислительного метаболизма в миокарде, выступает как депо кислорода в мышцах. МГ локализуется в разных участках миоцитов. Благодаря мобильности, отсутствию прочных связей с внутриклеточными структурами, а также небольшой молекулярной массе он быстро выходит из кардиомиоцита при его повреждении, попадает в кровь, выводится почками с мочой.

*Референсные значения:* мужчины — 19–92 мкг/л, женщины — 12–76 мкг/л.

*Диагностическое значение.* При ОИМ МГ появляется в кровотоке практически при начале ишемического разрушения кардиомиоцитов. Повышение уровня МГ в крови наблюдают через 2–4 ч после появления боли при ОИМ, степень повышения зависит от площади поражения миокарда. Это самый «короткоживущий» маркер ОИМ, так как он активно выводится почками. Его уникальная диагностическая ценность заключается в высокой ДЧ с первых часов после сердечного события, однако низкая ДС (около 50%) делает его малоприменимым для диагностики ИМ. Если уровень МГ остается повышенным после острого приступа ИМ, это свидетельствует о расширении зоны инфаркта. Повторные повышения уровня МГ в крови на фоне уже начавшейся нормализации свидетельствуют об образовании новых некротических очагов. МГ важен для диагностики активного расширения зоны некротического повреждения миокарда, для диагностики повторного ИМ.

*Влияющие факторы.* МГ появляется в крови при повреждении скелетных мышц, при нарушении почечного кровотока и снижении фильтрации в почках. Это привело к исключению МГ из перечня маркеров, рекомендованных для определения у больных с ОКС (по данным российских и европейских рекомендаций по лечению пациентов с ИМ). Однако при отсутствии возможности определения hs-cTn, при необходимости определения наличия некроза миокарда в первые часы заболевания и для оценки эффективности проводимого лечения МГ может быть использован в реальной клинической практике. При интерпретации результатов надо учитывать, что отрицательный тест косвенно свидетельствует об отсутствии ИМ, в то время как положительный требует подтверждения другими кардиомаркерами.

**Сердечный белок, связывающий жирные кислоты (сБСЖК).** Свободные жирные кислоты являются субстратами энергетического обмена, причем сердечная мышца — единственная ткань, которая нуждается в свободных жирных кислотах постоянно. Поглощение свободных жирных кислот кардиомиоцитами происходит путем активного транспорта, который осуществляет особый переносчик — сБСЖК. Этот белок обеспечивает перенос свободных жирных кислот с плазматической мембраны кардиомиоцитов на внешнюю мембрану митохондрий, где жирные кислоты окисляются и используются для образования АТФ.

сБСЖК — маркер, предложенный для раннего выявления некроза миокарда. сБСЖК за счет низкой молекулярной массы (15 кДа), присутствия в цитоплазме кардиомиоцита и особенностей распределения в организме (основная часть содержится в миокарде) обладает кинетикой освобождения в кровь, сходной с кинетикой МГ, однако является более специфичным. Динамика нарастания уровня сБСЖК наиболее выражена в первые часы после развития ангинозного приступа (его уровень повышается через 1–2 ч после начала болевого приступа), достигая максимума через 4–6 ч. Возвращение к нормальному уровню происходит через 12–24 ч после начала ишемии. Высокая специфичность и значительная прогностическая ценность определения содержания сБСЖК в течение первых 3 сут после развития ОИМ расширяют временные рамки использования этого теста.

**Рекомендации по лабораторной диагностике повреждения миокарда при ОКС.** Международные общества кардиологов рекомендуют использовать тропонин I и тропонин Т в качестве маркеров некроза миоцитов. При этом уточняют, что определение hs-cTn в крови у пациентов с ОКС должно быть проведено при первом же анализе крови. Рекомендовано определение hs-cTn сразу при первом контакте с пациентом, если доступен тест hs-cTn с валидированным алгоритмом. Некоторые производители тестов указывают на гендерные отличия в пороге принятия клинического решения для тропонина I. Дополнительное тестирование через 3 ч рекомендуется проводить, если первые два измерения по алгоритму 0–1 ч не могут быть расценены как положительные, а клиническое состояние пациента все еще наводит на мысль об ОКС.

В стандартах оказания скорой медицинской помощи больным с ОКС, пациентам с подозрением на ОИМ возможно определение кардиомаркеров, в том числе тропонина, МВ-КК, сБСЖК и МГ методом иммунохроматографии на тест-полосках. Метод позволяет вне лабораторных условий в течение нескольких минут выявить эти маркеры заболевания. Время первого повышения маркеров: 1–3 ч — для МГ и сБСЖК, 3–4 ч — для МВ-КК и сердечного тропонина.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.2.3. Биохимические исследования при сердечной недостаточности

**Мозговой натрийуретический пептид В-типа** (BNP) и его аминотерминальный N-концевой фрагмент (NT-proBNP) нашли наиболее широкое распространение среди маркеров, используемых в клинической практике при сердечной недостаточности. BNP является ключевым звеном сердечно-почечной оси. Основные эффекты BNP направлены на уменьшение нагрузки на миокард: это усиление диуреза, увеличение экскреции натрия и снижение артериального давления. Связываясь со специфическими рецепторами в органах-мишенях, BNP вызывает вазодилатацию, подавление секреции ренина.

*Референсные значения:* менее 100 пг/мл.

*Диагностическое значение.* Повышение уровня BNP обнаружено у пациентов при стабильной и нестабильной стенокардии, ОИМ, пороках клапанов сердца. BNP секретируется миоцитами желудочков сердца в ответ на повышение напряжения миокарда при увеличении давления или объема крови, при механическом растяжении предсердий (физическая нагрузка, изменение положения тела). Уровень BNP коррелирует с функциональным классом сердечной недостаточности, эффективностью лечения пациентов с ССЗ и обладает прогностической значимостью у пациентов с ОКС, сердечной недостаточностью и пороками сердца. Повышенные уровни BNP в плазме крови позволяют выявить дисфункцию левого желудочка раньше, чем появятся ее клинико-инструментальные признаки, в том числе изменения при электрокардиографии и эхокардиографии. Уровень BNP у больных тяжелой застойной сердечной недостаточностью увеличивается пропорционально угрозе остановки сердца и является прогностическим показателем летального исхода. Динамика BNP позволяет оценить эффективность лечения пациентов с сердечной недостаточностью: позитивный эффект лечения сопровождается снижением уровня BNP в плазме крови пациентов. У пациентов с одышкой основная ценность BNP/NT-proBNP-тестов заключается в возможности дифференциальной диагностики острой одышки несердечной этиологии и застойной сердечной недостаточности. Измерение BNP/NT-proBNP при неотложной помощи может быть использовано для установления диагноза «застойная сердечная недостаточность», когда клиническая картина не выражена или стерта. Включение теста на NT-proBNP в протокол обязательных тестов у пациентов с сердечной недостаточностью рекомендовано Европейским обществом кардиологов. Нормальный уровень BNP у нелеченых пациентов практически позволяет исключить поражение сердца, что делает диагноз «хроническая сердечная недостаточность» маловероятным. При постепенном (неостром) дебюте симптомов заболевания значения NT-proBNP и BNP ниже 125 пг/мл и 35 пг/мл соответственно свидетельствуют об отсутствии хронической сердечной недостаточности.

**ST2 — фактор подавления опухолеобразования** — представитель семейства рецепторов IL-1. Он имеет четыре изоформы, в клинической практике наиболее востребовано определение растворимой формы (sST2). ST2 — маркер, который используется в первую очередь для прогнозирования риска сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, а также летальности пациентов с ранее установленной сердечной недостаточностью. sST2 представляет собой циркулирующую форму мембранного рецептора IL-33, высвобождающуюся в ответ на закупорку сосудов, воспалительные и профибротические стимулы. Уровень sST2 не зависит от возраста, пола, функции почек или фенотипа сердечной недостаточности с низкой фракцией выброса и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса, что повышает его надежность и ценность в клинической практике. Измерение концентрации sST2 эффективно при оценке прогноза не только у пациентов с сердечной недостаточностью и сниженной фракцией изгнания левого желудочка, но и у пациентов с удовлетворительной фракцией изгнания. Однако он может меняться при сопутствующих воспалительных заболеваниях, СД и артериальной гипертензии. Несмотря на эти ограничения, sST2 является сильным предиктором исхода при сердечной недостаточности, что позволяет прогнозировать смертность и госпитализацию при острой или хронической сердечной недостаточности независимо от NT-proBNP, hs-cTn и фракции выброса левого желудочка.

Уровень sST2 тесно связан с тяжестью сердечной недостаточности: одним из главных преимуществ этого теста является возможность выявить сердечную недостаточность у больных еще на бессимптомной стадии. Большое прогностическое значение имеет изменение уровня sST2 у пациентов после ОИМ: повышение уровня sST2 у таких пациентов свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Определение концентрации sST2 вместе с оценкой уровней NT-proBNP позволяет существенно увеличить прогностическое значение относительно течения сердечной недостаточности и летального исхода.

Среднее содержание sST2 у здоровых взрослых лиц составляет 18 нг/мл, уровень маркера выше 35 нг/мл свидетельствует о риске осложнений заболевания. В среднем уровень sST2 в плазме крови мужчин выше, чем у женщин, и увеличивается с возрастом.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.3. Биохимические исследования при сахарном диабете

#### 6.3.1. Характеристика сахарного диабета

Глюкоза является основным источником энергии для любых тканей, особенно для мозга, чтобы он мог поддерживать свои нормальные функции. Гомеостаз глюкозы регулируется гормоном инсулином. СД — нарушение регуляции с повышенным уровнем глюкозы в крови. Повышенная концентрация глюкозы возникает либо из-за недостаточного количества инсулина, либо из-за инсулинорезистентности, либо из-за того и другого. Национальные институты здравоохранения определили диабет как «хроническое заболевание, при котором организм не может регулировать уровень сахара в крови». СД связан с широким спектром осложнений, такими как невропатия, ретинопатия, нефропатия, а также повреждение сердца и кровеносных сосудов. При отсутствии лечения СД может привести к органной недостаточности. Основными причинами осложнений СД принято считать глюко- и липотоксичность. Патология этого заболевания сложна, включая аутоиммунное разрушение  $\beta$ -клеток ПЖ, что приводит к недостаточному содержанию инсулина и в итоге к инсулинорезистентности. Устойчивость к инсулину при СД

обусловлена сниженным действием инсулина на ткани-мишени, такие как печень, скелетные мышцы и жировая ткань. Нормальное влияние инсулина на метаболизм углеводов — гипогликемия, в жировом обмене он способствует липогенезу и уменьшает распад липидов, усиливает биосинтез ХС, активизирует синтез белков, уменьшая катаболизм белка. Нарушение регуляции метаболизма углеводов, белков и липидов вызывает гипергликемические состояния.

Глава 6. Клиническая биохимия

6.3.2. Классификация сахарного диабета

Из-за сложности метаболизма и неоднородности СД сложно классифицировать. Наиболее широко принятая классификация была предложена Американским диабетическим фондом (ADA) в 1997 г. СД обычно классифицируется как тип 1 (около 10% больных), тип 2 (85–90% больных), другие типы и гестационный СД (GDM)<sup>57</sup>. Этот подход получил развитие и детализацию, он часто используется при исследованиях в патологии и фармакологии. Однако в 2018 г. была предложена новая уточненная классификация — тяжелый аутоиммунный диабет I типа (SAID), СД II типа поделен по тяжести течения и некоторым особенностям патогенеза на четыре подтипа: тяжелый инсулинодефицитный диабет (SIDD), тяжелый инсулинорезистентный диабет (SIRD), умеренный диабет, связанный с ожирением (MOD), умеренный возрастной сахарный диабет (MARD), а также редкие состояния, такие как латентный аутоиммунный диабет взрослых, вторичные диабет. На основании проведенного анализа специалисты смогли выделить пять видов диабета.

Группа 1 (SAID): объединяет пациентов с СД I типа и латентным аутоиммунным диабетом взрослых (LADA). Характеризуется началом в молодом возрасте, тяжестью достижения метаболического контроля, нарушением синтеза инсулина и наличием антител к глутаматдекарбоксилазе.

Группа 2 (SIDD): пациенты с высоким уровнем HbA<sub>1c</sub>, нарушением секреции инсулина и инсулинорезистентностью средней тяжести. В этой группе наиболее велик риск развития ретинопатии.

Группа 3 (SIRD): характерен для пациентов с ожирением и тяжелой резистентностью к инсулину. Для этой группы максимально повышен риск повреждения почек. Именно для пациентов этой группы наиболее часто терапию назначают с ошибками.

Группа 4 (MOD). Характерен для пациентов, у которых заболевание развилось в относительно молодом возрасте.

Группа 5 (MARD). Самая большая группа (примерно 40%), состоит из наиболее пожилых пациентов. Исследователи отмечают, что данная классификация позволит адаптировать подходы к терапии СД и сделать ее более успешной. При пересмотре классификации СД эксперты ВОЗ (2019) исходили из того, что в идеале классификация необходима для определения тактики лечения, стимуляции исследований этиопатогенеза, обеспечения основы эпидемиологических исследований.

Глава 6. Клиническая биохимия

6.3.3. Лабораторная диагностика сахарного диабета

**Глюкоза.** Основными в постановке диагноза являются результаты лабораторных исследований уровня гликемии (табл. 6.5).

Таблица 6.5. Диагностические критерии сахарного диабета и других нарушений углеводного обмена

Диагностические критерии СД
<div><input type="checkbox"/> Классические симптомы СД или гипергликемического кетоацидотического состояния в сочетании с концентрацией глюкозы в плазме крови <math>\geq 11,1</math> ммоль/л, или</div> <div><input type="checkbox"/> Уровень глюкозы в плазме крови натощак <math>\geq 7,0</math> ммоль/л, и/или</div> <div><input type="checkbox"/> Уровень глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки <math>\geq 11,1</math> ммоль/л при проведении перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ), и/или</div> <div><input type="checkbox"/> HbA<sub>1c</sub> <math>&gt; 6,5\%</math></div>
<div><input type="checkbox"/> Диабетический кетоацидоз и/или повышенный уровень кетонов в крови/моче (может отсутствовать на доклинической стадии)</div>
<div><input type="checkbox"/> Наличие одного или более аутоантител, ассоциированных с СД 1-го типа. При этом отсутствие аутоантител не исключает наличие СД 1-го типа (идиопатического)</div>
Нарушение толерантности к углеводам
<div><input type="checkbox"/> Уровень глюкозы в плазме крови натощак менее 7,0 ммоль/л при уровне глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки от 7,8 до 11,1 ммоль/л</div>
Повышение гликемии натощак
<div><input type="checkbox"/> Уровень глюкозы в плазме крови натощак в диапазоне 6,1–7,0 ммоль/л, уровень глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки до 7,8 ммоль/л</div>
Гестационный СД
<div><input type="checkbox"/> Глюкоза натощак <math>\geq 5,1</math>–<math>&lt; 7,0</math> ммоль/л в плазме венозной крови.</div> <div><input type="checkbox"/> Через 1 ч после приема внутрь декстрозы (Глюкозы<sup>★</sup>) в дозе 75 г — более 10,0 ммоль/л в плазме венозной крови.</div> <div><input type="checkbox"/> Через 2 ч после приема внутрь декстрозы (Глюкозы<sup>★</sup>) в дозе 75 г — более 8,5 ммоль/л в плазме венозной крови</div>

Диагноз СД у лиц без симптомов никогда не должен ставиться на основании однократно определенного ненормального значения глюкозы крови. Гипергликемия, выявленная при наличии острой инфекции, травмы или

стресса, может быть транзиторной и не должна сама по себе относиться к диагнозу СД. Необходимо повторное подтверждение значением глюкозы крови в диабетическом диапазоне либо натощак, либо случайно, либо при выполнении ПГТТ. Диагностические критерии СД по уровню глюкозы представлены в **табл. 6.6**.

**Таблица 6.6.** Диагностические критерии сахарного диабета по уровню глюкозы

Показатель	Концентрация глюкозы, ммоль/л	
	Капиллярная кровь	Венозная плазма
<b>Норма</b>		
Натощак	<5,6	<6,1
Через 2 ч после ПГТТ	<7,8	<7,8
<b>СД</b>		
Натощак	≥6,1	≥7,0
Через 2 ч после ПГТТ	≥11,1	≥11,1
Случайное определение	≥11,1	≥11,1
<b>Нарушенная толерантность к глюкозе</b>		
Натощак	<6,1	<7,0
Через 2 ч после ПГТТ	≥7,8—<11,1	≥7,8—<11,1
<b>Нарушенная гликемия натощак</b>		
Натощак	≥5,6—<6,1	≥6,1—<7,0
Через 2 ч после ПГТТ	<7,8	<7,8
<b>Норма у беременных</b>		
Натощак		<5,1
Через 1 ч после ПГТТ		<10,0
Через 2 ч после ПГТТ		<8,5
<b>Гестационный СД</b>		
Натощак		≥5,1—<7,0
Через 1 ч после ПГТТ		≥10,0
Через 2 ч после ПГТТ		≥8,5—<11,1

## Глава 6. Клиническая биохимия

**ПГТТ** проводится в том случае, если неясен диагноз. Если же диагноз СД не вызывает сомнений из клинической картины и повышенного уровня глюкозы натощак или после еды, то проведение ПГТТ не показано. Показания для проведения ПГТТ и его протокол представлены в **табл. 6.7**.

**HbA<sub>1c</sub>** в крови рекомендуется исследовать всем лицам с подозрением на СД для уточнения диагноза (**табл. 6.8**).

Пациентам с СД 2-го типа исследование HbA<sub>1c</sub> рекомендуется с периодичностью 1 раз в 3 мес с целью определения степени достижения целевых показателей гликемического контроля и стратификации риска развития осложнений СД.

**Таблица 6.7.** Пероральный глюкозотолерантный тест

Показания	Выполнение
<input type="checkbox"/> Сомнительные результаты при измерении глюкозы в крови натощак/случайно. <input type="checkbox"/> Неожиданная глюкозурия, в том числе при беременности. <input type="checkbox"/> Клинические признаки СД при нормальном уровне глюкозы в крови. <input type="checkbox"/> Диагностика акромегалии	<input type="checkbox"/> Пациент должен придерживаться обычного питания с содержанием по крайней мере 150 г углеводов в день в течение 3 дней. <input type="checkbox"/> Сохранять обычную физическую нагрузку. <input type="checkbox"/> Пробу проводят натощак при воздержании от пищи в течение 8–14 ч. <input type="checkbox"/> Измерить утром уровень глюкозы в плазме крови натощак. <input type="checkbox"/> Растворить 75 г декстрозы (Глюкозы <sup>▲</sup> ) в 300 мл воды, выпить за 5 мин. <input type="checkbox"/> Определить концентрацию глюкозы в плазме крови через 2 ч [детям — 1,75 г декстрозы (Глюкозы <sup>▲</sup> ) на 1 кг массы тела, но не более 75 г]. <input type="checkbox"/> Во время проведения теста пациент должен быть спокоен, не курить, не пить воду. <b>Внимание!</b> Не использовать сахарозу вместо декстрозы (Глюкозы <sup>▲</sup> )

**Таблица 6.8.** Диагностические критерии сахарного диабета по уровню гликированного гемоглобина

Состояние	Уровень HbA <sub>1c</sub>	Комментарий

Норма HbA <sub>1c</sub>	<6,0% (<42 ммоль/моль)	Метод должен быть сертифицирован
«Серая» зона	6,0–6,4% (42–47 ммоль/моль)	Не исключается возможность диагноза СД по уровню глюкозы крови
Подозрение на СД	≥6,5% (≥48 ммоль/моль)	Диагноз ставится на основании двух цифр диабетического диапазона (дважды определенный HbA <sub>1c</sub> или HbA <sub>1c</sub> + глюкоза крови)

В норме HbA<sub>1c</sub> составляет менее 6% общего Hb. Измерение концентрации HbA<sub>1c</sub> показано для выявления нарушенной толерантности к глюкозе, «скрытых» или доманифестных форм СД, используется для оценки компенсации СД, эффективности лечения. Уровень HbA<sub>1c</sub> является интегральным показателем углеводного обмена за предшествующие 8–12 нед и отражает риск развития осложнений СД. Для большинства пациентов с СД адекватным является целевой уровень HbA<sub>1c</sub> менее 7%.

В случае уменьшения времени присутствия эритроцитов в системе циркуляции (например, гемолитическая анемия, сфероцитоз, овалоцитоз, гемолиз) относительное количество HbA<sub>1c</sub> снижается. При полицитемии или спленэктомии возникает ложное повышение уровня HbA<sub>1c</sub>. Тест на HbA<sub>1c</sub> неприменим при инсулиноме. Для состояний, при которых меняется скорость обновления эритроцитов, таких как беременность, гемолитическая анемия или ЖДА, диагностика СД должна проводиться на основе показателей гликемии. Кроме того, зачастую низкие показатели HbA<sub>1c</sub>, особенно у пациентов с СД 1-го типа или с СД 2-го типа, находящихся на инсулинотерапии или принимающих препараты сульфонилмочевин, обусловлены эпизодами гипогликемии.

**Кетоновые тела** в крови или моче лицам с диагностированным СД рекомендуется определять для оценки степени метаболических нарушений. При обнаружении кетоновых тел в моче ≥5 ммоль/л у лиц с СД показана госпитализация в стационар. Кетоацидоз может быть первым признаком не диагностированного ранее СД I типа или может возникнуть у больных, у которых используемая доза инсулина становится неэффективной, увеличивается потребность в инсулине, в частности при инфекциях, острых заболеваниях, таких как ИМ, травма, эмоциональные нарушения.

**Антитела к антигенам  $\alpha$ -клеток ПЖ** в крови (GADA, ICA, IAA, IA-2A, Zn-T8A) рекомендуется определять при подозрении на аутоиммунный СД для дифференциальной диагностики с другими типами СД. Иммунологическими маркерами аутоиммунного инсулита считаются аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA), аутоантитела к структурам островковых клеток (ICA), аутоантитела к инсулину (IAA), аутоантитела к тирозинфосфатазе (IA-2), аутоантитела к транспортеру цинка 8 (Zn-T8A). Исследование проводится для дифференциальной диагностики СД 1-го типа и латентного аутоиммунного диабета взрослых с другими типами СД, а также при необходимости у родственников первой степени родства с целью оценки риска развития СД. Присутствие двух и более специфичных аутоантител характерно для СД 1-го типа. Рутинный скрининг на островковые аутоантитела у людей с СД 2-го типа в настоящее время не рекомендуется.

## Глава 6. Клиническая биохимия

**Молекулярно-биологическое исследование мутаций** по генетическим маркерам и использование показателей генетического риска рекомендуются для лиц, которые не могут быть четко классифицированы как страдающие СД 1-го или 2-го типа, пациентам с нетипичной картиной СД 1-го типа для исключения других моногенных форм СД. Рутинное генетическое тестирование у людей с СД 2-го типа не имеет значения.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4. Биохимические исследования при патологии печени

**Жировая болезнь печени** (предыдущее название — «неалкогольная жировая болезнь печени») является наиболее распространенным заболеванием печени во всем мире. Жировая болезнь печени определяется как аномальное накопление жира (>5%) в гепатоцитах при отсутствии значительного потребления алкоголя (>30 г/сут у мужчин, >20 г/сут у женщин или определяется как ≥14 напитков в неделю для мужчин или ≥7 напитков в неделю для женщин) и исключения вторичных причин жировой болезни печени (например, гепатит С или болезнь Вильсона–Коновалова). Понятие «жировая болезнь печени» включает две морфологические формы с различным прогнозом: жировой гепатоз и стеатогепатит. Спектр жировой болезни печени варьирует от простого стеатоза до агрессивного стеатогепатита с потенциально прогрессирующим фиброзом печени до цирроза и ГЦР.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.1. Профили ферментов при патологии печени

Распределение ферментативной активности сыворотки может иметь ключевое значение при определении типа органной патологии. В табл. 6.9 представлены данные повышения активности ферментов печеночного профиля при разных по этиологии заболеваниях печени.

**Таблица 6.9.** Относительное повышение активности сывороточных ферментов при заболеваниях печени

Острый вирусный гепатит	Значительное ↑ трансаминаз: АЛТ > АСТ ~ ЛДГ >> ГГТ ~ ЩФ; АСТ/АЛТ ≤1,0
-------------------------	---



Острый некроз печени (интоксикация)	Значительное ↑ трансаминаз: АСТ > АЛТ ~ ГлДГ; АСТ/АЛТ >2,0
Алкогольное поражение печени	Умеренное ↑ трансаминаз: ГГТ > АСТ > АЛТ > ~ ЩФ; АСТ/АЛТ >1,0
Обструкция желчевыводящих путей	Умеренное ↑ трансаминаз: ЩФ ~ ГГТ > АЛТ > АСТ; АСТ/АЛТ <1,0
Хронический гепатит	Умеренное ↑ трансаминаз АСТ > АЛТ ~ ЛДГ ~ ГГТ > ЩФ; АСТ/АЛТ >1,0
Цирроз печени	Слабое ↑ трансаминаз: АСТ > АЛТ ~ ГГТ (цирроз после гепатита); ГГТ >> АСТ (алкогольный цирроз, билиарный цирроз); АСТ/АЛТ >2,0
Метастазы в печень	Слабое ↑/умеренное ↑ трансаминаз: ЩФ ~ ГГТ > АСТ > АЛТ; АСТ/АЛТ >2,0

Примечание. АЛТ, АСТ, ЛДГ — ферменты, которые находятся в гепатоцитах и используются для диагностических целей. ГГТ и ЩФ — ферменты билиарного тракта.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.2. Шкала функционального состояния печени

Для оценки тяжести цирроза печени распространенной международной шкалой, которая основана на лабораторных показателях, является шкала Чайлда–Пью, оригинальное название — Child–Pugh classification (табл. 6.10).

**Таблица 6.10.** Шкала оценки функции печени при циррозе по Чайлду–Пью

Характеристика	1 балл	2 балла	3 балла
Энцефалопатия	Нет	I–II степень или компенсируется медикаментозно	III–IV степень или рефрактерная
Асцит	Нет	Незначительный	Умеренный
Альбумин	>35 г/л	28–35 г/л	<28 г/л
Протромбин (превышение верхней границы) или международное нормализованное отношение (МНО)	На 1–3 с <1,7	На 4–6 с 1,7–2,3	Более 6 с >2,3
Билирубин	<34,2 мкмоль/л (1–2 мг/дл)	34,2–51,3 мкмоль/л (2–3 мг/дл)	>51,3 мкмоль/л (>3 мг/дл)

Примечание. Интерпретация: поражение (нарушение функции) печени классифицируется как Child–Pugh класса А, В или С в зависимости от суммы баллов, полученных для каждого параметра. Класс А: 5–6 баллов, класс В: 7–9 баллов и класс С: 10–15 баллов.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.3. Маркеры жировой болезни печени

При жировой болезни печени уровень АЛТ в плазме крови выше, чем уровень АСТ, однако при выраженном фиброзе соотношение АСТ/АЛТ выше 1. Оценка этого показателя служит простейшей моделью анализа выраженности фиброза. Несмотря на свою простоту, это соотношение имеет хорошую отрицательную прогностическую ценность и может быть использовано для исключения наличия фиброза.

**Fibro Test** дает возможность на основе определения содержания в сыворотке α2-макроглобулина, гаптоглобина, АпоА-1, ГГТ, общего билирубина рассчитывать индекс фиброза. Тест имеет высокую надежность при выраженных стадиях фиброза — прогностическая ценность отрицательного и положительного результата составляет 90 и 70% соответственно.

**Шкала ELF** (European Liver Fibrosis Test). В формулу для расчета входят значения в сыворотке крови гиалуроновой кислоты, тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) и аминоконцевого пропептида проколлагена типа III (P3NP):

$$ELF = -7,412 + (\ln[\text{гиалуроновая кислота}] \times 0,681) + (\ln[\text{P3NP}] - 0,775) (\ln[\text{TIMP-1}] \times 0,494).$$

При ROC-анализе значение AUROC для обнаружения прогрессирующего фиброза с помощью данного теста равнялось 0,90, ДЧ и ДС составили 89 и 96% соответственно. С высокой точностью фиброз печени можно исключить при  $ELF = -1,455$  (отрицательное прогностическое значение — 98%).  $ELF \geq 0,676$  свидетельствует о наличии выраженного фиброза (положительное прогностическое значение — 80%).

Биомаркеры и шкалы оценки фиброза, а также транзитная эластография — неинвазивные методы оценки риска развития фиброза/цирроза печени. Биомаркеры/шкалы предоставляют диагностическую информацию, которая позволяет избежать биопсии печени, особенно при незначительном поражении печени. При выраженном фиброзе или циррозе печени эффективность сывороточных биомаркеров/шкал недостаточна, диагноз желательно подтверждать с помощью биопсии печени, при этом необходимо учитывать клиническое состояние пациента.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.4. Маркеры алкогольной болезни печени

При хронической алкогольной интоксикации нарушения биохимических процессов в тканях становятся перманентными — в центре метаболических нарушений оказываются последствия окисления большого количества этанола, ацидоз и накопление ацетальдегида. Во всех случаях, даже на фоне выраженного фиброза, при хронической алкогольной интоксикации в гистологических препаратах имеются признаки стеатоза и внутрипеченочного холестаза разной степени.

*Синдром воспаления* — лейкоцитоз, повышение СОЭ, СРБ. При выраженном воспалительном процессе нередко лейкомоидные реакции, нейтрофильный лейкоцитоз до  $15\text{--}20 \times 10^9/\text{л}$ , повышение СОЭ до 40–50 мм/ч.

*Цитолиз* — повышение АСТ, АЛТ, преимущественное повышение конъюгированного (прямого) билирубина.

При хроническом течении заболевания, как правило, наблюдается относительно незначительное увеличение активности трансаминаз. При алкогольном поражении печени преобладает повышение АСТ, коэффициент АСТ/АЛТ составляет 2,0–4,0 и более. Объясняется это токсическим внутриклеточным поражением в первую очередь митохондрий и выходом из них АСТ.

*Холестаз*. Повышение ЩФ, ГГТ, ХС, прямого билирубина, желчных кислот в крови, желчных пигментов в моче, исчезновение стеркобилина в кале. Увеличение конъюгированного (прямого) билирубина отражает внутри- и внепеченочный холестаз. При холестатической форме многократно повышается активность ГГТ, иногда вместе с ЩФ. Диагностически значимым является повышение концентрации ГГТ с ее последующим снижением на фоне воздержания от приема алкоголя.

*Гепатодепрессивный синдром* (печеночно-клеточная недостаточность) — признаки нарушения функций печени: снижение уровня общего белка, альбумина, протромбина, фибриногена, ХС; гипербилирубинемия (прямая фракция). Уровень билирубина общего — свидетельство тяжести заболевания.

*Показатели свертываемости крови* (ПВ — протромбиновое время) могут указывать на осложнения заболевания.

С одной стороны, протромбин синтезируется гепатоцитами, с другой — для его синтеза необходим жирорастворимый витамин К, для всасывания которого в ЖКТ необходимы желчные кислоты, синтезируемые печенью.

Витамин К используется также при синтезе факторов свертывания VII, IX, X и антикоагулянтов протеинов С и S.

Нарушения в системе гемостаза проявляются венозными кровотечениями.

*Маркерами злоупотребления алкоголем* являются метаболиты взаимодействия ацетальдегида с Hb и трансферрином — ацетальдегид-модифицированный Hb и безуглеводный (десилизированный, карбогидратдефицитный) трансферрин (CDT). Повышение концентрации CDT в крови происходит при ежедневном приеме 50–80 г и более этанола в сутки на протяжении 1–2 нед (давностью не более 2–3 нед). После нескольких недель перерыва потребления алкоголя CDT нормализуется даже у хронических алкоголиков.

*Признаки печеночной недостаточности* нарастают при тяжелом течении алкогольного гепатита и цирроза печени: гипопроteinемия вследствие снижения синтетической функции печени, гиперурикемия, гипертриглицеридемия, тромбоцитопения, электролитные нарушения (гипомагниемия, гипокалиемия), коагулопатия. Необходимо оценивать показатели синтетической функции печени (протромбин, ХС, АпоА-1, гаптоглобин), признаки гиперспленизма, обусловленного развитием портальной гипертензии (количество тромбоцитов).

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.5. Маркеры аутоиммунного гепатита

Аутоиммунный гепатит (АИГ) — хроническое прогрессирующее воспалительное заболевание печени.

Предполагаемый патогенез заключается во взаимодействии генетической предрасположенности, триггера окружающей среды и сбоя нативной иммунной системы, приводящего к хроническому воспалению гепатоцитов и последующему фиброзу печени. Характеризуется наличием типичных аутоантител, повышением уровня  $\alpha$ -глобулинов и реакцией на иммуносупрессивную терапию. В качестве патогенетических факторов АИГ рассматривались гепатотропные вирусы, бактерии, лекарственные препараты и другие токсические вещества.

*АИГ 1-го типа* — классическая форма заболевания, чаще всего встречается у женщин молодого возраста, характеризуется наличием АНА и антигладкомышечных антител (АГМА), а также гипергаммаглобулинемии с повышением IgG в сыворотке крови примерно в 1,5 раза. Иммуногенетически 1-й тип АИГ связан с факторами лейкоцитарных антигенов главного комплекса гистосовместимости человека (Human Leukocyte Antigen — HLA) DR3 и DR4, хорошо отвечает на иммуносупрессивную терапию.

*АИГ 2-го типа* характеризуется наличием печеночно-почечных микросомальных антител (LKM-1). Часто при этом также выявляются антитела к антигенам ЩЖ и антитела к париетальным клеткам желудка. Антигеном-мишенью для LKM-1 является цитохром P450 2D6 (CYP-2D6) рибосом эндоплазматической сети гепатоцитов. Заболевание нередко возникает в детском возрасте, второй пик его частоты приходится на возрастной период 35–65 лет. Клиническое течение этой формы АИГ отличается большей остротой и более быстрым прогрессированием с исходом в цирроз печени. Фактически к моменту первой постановки диагноза цирроз печени выявляется уже у 40–70% больных АИГ 2-го типа. Таким образом, прогноз при АИГ 2-го типа является менее благоприятным.

*АИГ 3-го типа* — характерным признаком являются антитела к растворимому антигену печени (SLA). Эти антитела идентичны антителам, направленным против антигена печени и ПЖ (LP).

*Лабораторные показатели*, характерные для АИГ:

- повышение уровня  $\alpha$ -глобулинов или IgG в сыворотке крови примерно в 1,5 раза;
- появление аутоантител, не обладающих ни органной, ни видовой специфичностью.

Если при повторных исследованиях антитела обнаруживаются в повышенных титрах (у взрослых  $\geq 1:80$ , у детей  $\geq 1:40$ ) и выявляется повышенный уровень  $\alpha$ -глобулина и трансаминаз, то диагноз АИГ вполне вероятен.

Среди аутоантител наиболее важными являются аутоантитела АНА, АГМА. АГМА обнаруживаются несколько реже, чем АНА, но зато в титрах 1:100 и выше, в связи с чем АГМА считаются более специфичными для АИГ, чем АНА. АГМА выявляются почти у 80% детей с АИГ, направлены против актина микрофиламентов миоцитов и перекрестно реагируют с актинсодержащими микрофиламентами гепатоцитов. АНА обнаруживаются у 40–80% больных АИГ и являются наиболее часто выявляемыми при АИГ антителами. Антигенами для этих антител служит гетерогенная группа веществ, таких как ядерная ДНК, функциональные и структурные белки ядра или центромеры. АНА также обнаруживаются и при других аутоиммунных заболеваниях, не связанных с поражением печени.

LKM-1 особенно часто обнаруживаются у больных АИГ 2-го типа. АНА и АГМА у таких пациентов могут отсутствовать. Наиболее часто это заболевание встречается у детей и подростков. Антигеном-мишенью для LKM-1 является цитохром P450 2D6 (CYP-2D6) рибосом эндоплазматической сети гепатоцитов. LKM-1 встречаются также у больных хроническим HCV. Диагностическая точность, ДС и ДЧ АНА, АГМА и LKM-1 составляют 74, 99 и 43% соответственно. LKM-2 обнаруживаются при АИГ 2-го типа, индуцированном приемом лекарственных препаратов, LKM-3 выявляются примерно у 13% больных с вирусом гепатита D (HDV).

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.6. Маркеры вирусных гепатитов

Лабораторная диагностика вирусных гепатитов проводится иммунохимическим (серологическим) и молекулярно-биологическим методами исследования.

**Гепатит А.** HAV вызывается РНК-содержащим энтеровирусом, относящимся к роду *Hepatovirus*. Все генотипы имеют один и тот же антиген — HAVAg, что свидетельствует о принадлежности их к одному серотипу и определяет моноклональный характер вырабатываемых антител (анти-HAV).

Гепатит А проявляется в типичных случаях общим недомоганием, повышенной утомляемостью, анорексией, тошнотой, рвотой, иногда желтухой (темная моча, обесцвеченный стул, пожелтение склер и кожных покровов), в том числе сопровождающиеся повышением уровня аминотрансфераз сыворотки крови. В настоящее время наблюдается значительное число случаев заболевания HCV со «стертой» клинической картиной, малосимптомной, безжелтушной формами, что существенно осложняет диагностику.

Случаи гепатита А классифицируются как:

- подозрительный случай–случай, соответствующий вышеуказанному клиническому описанию;
- подтвержденный случай–случай, соответствующий вышеуказанному клиническому описанию и подтвержденный лабораторно, или случай, который соответствует клиническому описанию, выявленный у человека, имевшего контакт с лабораторно подтвержденным случаем гепатита А в течение 15–35 календарных дней до появления симптомов заболевания. При наличии эпидемического очага с множественными случаями гепатита А диагноз ставится на основании клинико-эпидемиологических данных.

Лабораторная диагностика гепатита А осуществляется:

- иммунохимическим (серологическим) методом — в сыворотке крови определяют наличие антител иммуноглобулинов классов М и G к HAV (anti-HAV IgM и anti-HAV IgG);
- молекулярно-биологическим методом — выявляют РНК HAV в сыворотке (плазме) крови и (или) фекалиях.

Лабораторным критерием подтверждения случая гепатита А является обнаружение anti-HAV IgM в сыворотке крови и (или) РНК HAV в сыворотке (плазме) крови и (или) фекалиях.

Выявление anti-HAV-IgG свидетельствует о наличии протективного иммунитета.

Критериями оценки тяжести HCV являются уровень билирубина и протромбиновая активность и в меньшей степени — повышение уровня АЛТ (табл. 6.11).

**Таблица 6.11.** Интерпретация степени тяжести вирусного гепатита А по результатам лабораторных исследований

Признак	Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень
Билирубин общий	До 100 мкмоль/л	100–170 мкмоль/л	170–200 мкмоль/л и более
Протромбиновая активность	До 80%	80–60%	60–40%, при крайне тяжелой форме — <40%
АЛТ	До 500 ед/л (до 10 норм)	До 1000 ед/л (10–20 норм)	Более 20 норм

**Гепатит Е.** Вирус гепатита Е (HEV) был открыт в 1983 г. российским ученым М.С. Баяляном, который исследовал вспышку гепатита в Афганистане, заразил себя материалом, собранным от болеющих неизвестным гепатитом, и затем охарактеризовал заболевание. По клинической симптоматике гепатит Е часто схож с другими вирусными гепатитами, прежде всего с гепатитом А. Беременные с острым гепатитом Е, особенно в II или III триместре, подвергаются более высокому риску острой печеночной недостаточности, потери плода. Описаны тяжелые формы острого гепатита Е у больных с иммунодефицитом, с циррозом печени и у пожилых людей.

Случаи гепатита Е классифицируются как:

- 1) подозрительный случай острого гепатита Е:

- случай, соответствующий вышеуказанному клиническому описанию при исключении маркеров HAV, HBV, HCV;
- случай, соответствующий клиническому описанию в эпидемическом очаге гепатита Е либо при посещении пациентом неблагополучных по гепатиту Е регионов мира в течение инкубационного периода;
- случай острого гепатита у лиц, профессионально связанных с уходом за животными, переработкой животноводческой продукции (в том числе специалисты в области ветеринарии, работники боен, мясокомбинатов, молочно-товарных ферм, животноводческих хозяйств, биофабрик, ветеринарных лабораторий);
- случай острого гепатита у лиц, употреблявших недостаточно термически обработанное мясо, а также сырую печень свиньи или кабана;

2) подтвержденный случай острого гепатита Е — случай, соответствующий клиническому описанию и подтвержденный лабораторно;

3) подозрительный случай хронического гепатита Е — случай, соответствующий вышеуказанному клиническому описанию;

4) подтвержденный случай хронического гепатита Е — случай, соответствующий клиническому описанию и подтвержденный лабораторно.

## Глава 6. Клиническая биохимия

Лабораторная диагностика вирусного гепатита Е проводится иммунохимическим (серологическим) и молекулярно-биологическим методами исследования. Иммунохимическим (серологическим) методом в сыворотке крови определяют наличие anti-HEV-IgM и anti-HEV-IgG. Молекулярно-биологическим методом определяют РНК HEV в сыворотке (плазме) крови и (или) фекалиях.

Лабораторным критерием подтверждения случая острого гепатита Е является обнаружение anti-HEV-IgM и anti-HEV-IgG в сыворотке (плазме) крови или выявление РНК HEV в сыворотке (плазме) крови и (или) фекалиях. Лабораторным критерием подтверждения случая хронического гепатита Е является обнаружение РНК HEV в сыворотке (плазме) крови в течение 3 мес и более.

При любом варианте течения острого гепатита Е у иммунокомпетентных лиц выявляются anti-HEV-IgM с конца инкубационного периода до 2–8 нед клинических проявлений (есть данные, что они могут сохраняться до полугода). Anti-HEV-IgG выявляются с начала клинических проявлений с пиком примерно 4 нед после появления симптомов острого гепатита Е и остаются положительными не менее года. Длительность и стойкость иммунитета при гепатите Е неизвестны.

При остром гепатите Е длительность вирусемии составляет в среднем 3–6 нед и у большинства больных исчезает в течение 2 нед после появления симптомов. С фекалиями HEV выделяется с последних дней инкубационного периода до 4–6 нед от начала клинических проявлений заболевания. При хроническом гепатите Е выделение вируса может продолжаться в течение многих лет.

**Генатум В.** Возбудителем HBV является ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Hepadnaviridae*, роду *Orthohepadnavirus*. Выделяются 10 генотипов (от А до J) HBV, их распределение варьирует по географическим и этническим зонам.

Основными источниками HBV являются больные хроническими формами инфекции, заражение HBV от больных в острой стадии имеет место лишь в 4–6% случаях. Основными факторами передачи HBV являются кровь и другие биологические жидкости организма (сперма, вагинальное отделяемое, слюна), основными факторами передачи HBV являются кровь или ее компоненты, в меньшей степени — другие биологические жидкости человека (эякулят, вагинальный секрет, слезная жидкость, слюна и др.).

Окончательный диагноз острого и хронического HBV устанавливается при комплексном учете эпидемиологических, клинических, биохимических, иммунохимических и молекулярно-биологических данных.

Лабораторная диагностика HBV проводится иммунохимическим и молекулярно-биологическим методами исследования.

Определение антигенов и антител в сыворотке крови проводится иммунохимическими методами (ИФА, иммунохемилюминесцентный анализ и др.). ИФА используется в большинстве случаев как метод скрининга, который позволяет выявить наличие или подтвердить отсутствие специфических антигенов или антител. Методы иммунохимического анализа, включая иммунохемилюминесцентный анализ, позволяют выявлять и в ряде случаев определять концентрацию антигенов вируса гепатита В (HBeAg, поверхностного антигена — HBsAg) и антител к антигенам вируса гепатита В (анти-HBs-, анти-HBe-, анти-HBe-IgG, анти-HBe-IgM) в сыворотке или плазме крови. **HBsAg** (поверхностный антиген HBV) — основной маркер скрининга для выявления лиц, инфицированных HBV. Обнаруживается в сыворотке крови через 4–6 нед от момента инфицирования. Выявление в течение более чем 6 мес свидетельствует о формировании хронической инфекции. Возможность определения концентрации HBsAg в сыворотке крови позволила использовать тест как дополнительный критерий при дифференциальной диагностике хронического гепатита В (ХГВ) и неактивного носительства вируса: концентрация HBsAg ниже 1000 МЕ/мл с большей вероятностью свидетельствует в пользу неактивного носительства вируса, хотя иногда может наблюдаться и при ХГВ. Кроме того, данный показатель в ряде случаев может применяться при мониторинге противовирусной терапии ХГВ с целью прогнозирования ее эффективности.

Лица, у которых впервые выявлен HBsAg или ДНК HBV, должны быть обследованы на наличие анти-HDV-IgG (лабораторный маркер гепатита D).

**Анти-HBs** — антитела к поверхностному антигену HBV. Как правило, выявляются у больных, перенесших инфекцию, и у лиц, которым проведена вакцинация от гепатита В. Определение концентрации анти-HBs используется для оценки

напряженности поствакцинального иммунитета. Защитным является уровень антител выше 10 мМЕ/л.

При концентрации ниже этого значения рекомендуется ревакцинация.

**Анти-НВс** — антитела к белку нуклеокапсида вируса гепатита В. Анти-НВс класса IgM являются маркером острого гепатита, однако могут выявляться и при обострении хронического гепатита, и при реактивации инфекции. Анти-НВс-IgG — маркер как перенесенной, так и хронической инфекции, сохраняются пожизненно и могут быть единственным серологическим маркером латентной формы инфекции.

**НВеAg** — неструктурный белок HBV, косвенно указывающий на активную репликацию вируса. Является одним из ключевых маркеров при обследовании больных ХГВ, необходим для определения фазы течения инфекции (НВеAg-позитивный или НВеAg-негативный ХГВ) и контроля эффективности противовирусной терапии.

**Анти-НВе** — антитела к НВеAg, обнаруживаются в сыворотке крови после исчезновения НВеAg и продолжают персистировать многие годы. Сероконверсия по НВеAg является признаком благоприятного течения заболевания и свидетельствует о снижении активности вирусной репликации.

## Глава 6. Клиническая биохимия

Варианты сочетания маркеров HBV при разных формах и фазах хронической инфекции гепатита представлены в табл. 6.12.

В соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Острый вирусный гепатит В у взрослых» рекомендуется всем пациентам с подозрением на острый HBV проведение серологических исследований по определению антител и антигенов к HBV методом ИФА для подтверждения этиологического фактора заболевания как критерия установления диагноза острого гепатита В. Самым достоверным специфическим маркером острого гепатита В являются анти-НВс-IgM, которые появляются в конце инкубационного периода и сохраняются в течение всего периода клинических проявлений. Через 4–6 мес от начала заболевания анти-НВс-IgM исчезают и появляются анти-НВс-IgG (они сохраняются пожизненно). У вирусносителей HBV анти-НВс-IgM в крови отсутствуют.

**Таблица 6.12.** Лабораторные маркеры вируса гепатита В при разных вариантах инфекции

Маркер	Острый гепатит В	Перенесенный гепатит В	Иммунитет после вакцинации	Фаза иммунной толерантности	ХГВ, НВеAg-позитивный	ХГВ, НВеAg-негативный	Носительство HBV
HBsAg							
Анти-НВс							
Анти-НВс-IgG	+	—	—	+	+	+	+
Анти-НВс-IgM	—	+	+	—	—	—	—
Анти-НВс-IgM	—/+	+	—	+	+	+	+
Анти-НВс-IgM	+	—	—	—	—	—	—
НВеAg	+/-	—	—	+	+	—	—
Анти-НВе	—/+	+	—	—	—	+	+
ДНК HBV	+	—	—	+++	++	+	+/-

Рекомендовано проведение серологических исследований — определение суммарных антител классов М и G (anti-HCV-IgG и anti-HCV-IgM) к HCV в крови, антител класса М и G (anti-HEV-IgM) к HEV в крови иммунохимическими методами всем пациентам с подозрением на острый гепатит с целью дифференциальной диагностики острого вирусного гепатита и определения микст-инфицирования.

Молекулярно-биологические методы (ПЦР, ПЦР-РВ, обратная гибридизация с зондами, прямое секвенирование) позволяют выявлять ДНК HBV и РНК HDV (в плазме крови или ткани печени), определять их концентрацию в плазме крови (вирусную нагрузку) и генотип HBV, обнаружить мутации в геноме HBV, связанные с устойчивостью вируса к противовирусным препаратам. ДНК HBV начинает определяться в крови в среднем через месяц после инфицирования и является первым диагностическим маркером гепатита В, опережая появление HBsAg на 10–20 дней. Исследование на ДНК HBV позволяет проводить раннюю диагностику острого гепатита, выявлять скрытые (латентные) формы гепатита и мутантные по HBsAg штаммы вируса.

Рекомендуется определение ДНК HBV в крови методом ПЦР, качественное и количественное исследование пациентов с подозрением на острый HBV как критерий ранней диагностики и установления уровня вирусной нагрузки.

**Количественное определение ДНК HBV.** Вирусная нагрузка измеряется в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). Большинство современных тестов для количественного определения ДНК HBV основано на ПЦР-РВ и имеет широкий линейный диапазон измерений — от 5–200 до  $\times 10^8$ – $10^9$  МЕ/мл. Количественное определение ДНК HBV является принципиально важным условием обследования больных ХГВ. Этот анализ используется для уточнения фазы течения, а также для мониторинга эффективности противовирусного лечения, для оценки вирусологического ответа при лечении.

**Гепатит D** инфицирует только больных гепатитом В. HDV заимствует три белка вирусной оболочки HBV: для проникновения внутрь, для выхода из гепатоцита, а также для репродукции. Геном HDV состоит из одноцепочечной РНК длиной около 1700 нуклеотидов. В ядре инфицированной клетки HDV использует РНК-полимеразу хозяина для репликации. HDV может сохраняться во время регенерации печени путем передачи РНК HDV через клеточное деление, даже в отсутствие HBV. Инфицирование HDV может произойти одновременно с HBV (коинфекция) или

путем суперинфекции на фоне ХГВ. Серьезные случаи острого гепатита чаще наблюдаются при коинфекции HBV/HDV, чем при первичной моноинфекции HBV. Суперинфекция HDV на фоне HBV, как правило, приводит к хроническому гепатиту D с худшим клиническим исходом, с быстрым прогрессированием и развитием цирроза печени.

## Глава 6. Клиническая биохимия

Наличие анти-HDV-антител (IgG или общих) у HBsAg-положительных лиц указывает на контакт с HDV, но не свидетельствует о продолжающейся инфекции, поскольку антитела против HDV могут циркулировать длительное время. Антитела IgM против HDV (anti-HDV IgM) обнаруживаются в течение первых 2–3 нед после острой инфекции HDV и прогрессируют до хронической формы. Анти-HDV IgM не являются прямым маркером репликации HDV и не подходят для ее мониторинга.

Для подтверждения активной инфекции HDV необходимо обнаружение в сыворотке РНК HDV. Для генотипа HDV характерна высокая генетическая изменчивость, поэтому для обеспечения точности диагностики инфекции HDV и мониторинга противовирусного лечения рекомендуется использовать стандартизированные тесты в режиме ПЦР-РВ. Высокий уровень РНК HDV указывает на прогрессирование болезни, а исчезновение из крови — на ремиссию. Уровень РНК HDV в крови может колебаться, становясь временно неопределяемым, поэтому инфекционный статус HDV должен основываться не менее чем на двух определениях с интервалом от 3 до 6 мес. Кроме того, уровень РНК HDV снижается со временем у пациентов с циррозом печени, как правило, одновременно с уменьшением активности аминотрансфераз.

**Гепатит С (HCV)** вызывается РНК-содержащим вирусом, характеризующимся высокой генетической вариабельностью. В настоящее время выделяют шесть генотипов и более 90 субтипов HCV. Вариабельность генома HCV обуславливает изменения в строении антигенных детерминант, которые определяют выработку специфических антител, что препятствует элиминации вируса из организма и созданию эффективной вакцины против HCV. Инкубационный период длится от 14 до 180 календарных дней, чаще составляя 6–8 нед. Часто развивается хроническая форма, которая прогрессирует до цирроза печени без активной клинической картины. Биохимические изменения в сыворотке не выражены, большинство показателей часто в пределах нормы, желтуха развивается не более чем у 20% инфицированных HCV.

Окончательный диагноз острого и хронического гепатита С устанавливается при комплексном учете эпидемиологических, клинических, биохимических, иммунохимических и молекулярно-биологических данных. Диагноз острого или хронического гепатита С подтверждается только при выявлении в сыворотке (плазме) крови РНК HCV или core Ag HCV с учетом данных эпидемиологического анамнеза и результатов клинико-лабораторных исследований (активность АЛТ, концентрация билирубина, определение размеров печени и др.). Лица с anti-HCV в сыворотке (плазме) крови при отсутствии у них РНК HCV или core Ag HCV подлежат повторному обследованию на наличие anti-HCV и РНК HCV через 6 мес.

Контингенты, подлежащие обязательному обследованию на наличие HBsAg и anti-HCV, приведены в приложениях 16 и 17 к СанПиН 3.3686-21. Контингенты, подлежащие обязательному одновременному обследованию на наличие anti-HCV и РНК HCV, приведены в приложении 18 к СанПиН 3.3686-21. У лиц с иммунодефицитом (больные онкологическими заболеваниями, пациенты на гемодиализе, пациенты, находящиеся на лечении иммунодепрессантами, и др.), а также в ранний период острого гепатита С (до 12 нед после заражения) anti-HCV могут отсутствовать. В данных группах пациентов диагностика гепатита С проводится с помощью одновременного выявления anti-HCV и РНК HCV. Лица, у которых выявлены anti-HCV, подлежат обследованию на наличие РНК HCV или core Ag HCV (с использованием диагностического набора реагентов, позволяющих выявлять core Ag HCV в концентрации, эквивалентной 3000 МЕ/мл РНК HCV и менее).

В МО исследование на наличие антител к HCV с применением экспресс-тестов должно сопровождаться обязательным дополнительным исследованием сыворотки (плазмы) крови пациента на наличие anti-HCV, а при необходимости — одновременным обследованием на наличие anti-HCV и РНК HCV классическими иммунохимическими и молекулярно-биологическими методами. Выдача заключения о наличии или отсутствии антител к HCV только по результатам экспресс-теста не допускается.

Генотип HCV определяется до начала лечения, так как от него зависят продолжительность курса и успех лечения. Геном HCV представляет собой одноцепочечную молекулу РНК длиной около 9400–9600 нуклеотидов. Для него характерны: уникальная открытая рамка считывания, короткие 5'- и 3'-нетранслируемые участки (UTR) и участки с высокой частотой мутаций. Выявление и количественное определение РНК-HCV помогает диагностировать гепатит С и оценивать эффективность во время и после лечения. Для большинства доступных в настоящее время количественных анализов РНК-HCV нижний предел обнаружения составляет примерно 12–15 МЕ/мл. Если количественный тест не имеет такого уровня чувствительности, то может быть использован качественный.

Качественные анализы могут обнаруживать очень низкие уровни РНК-HCV, часто менее 10 МЕ/мл, и предоставить результаты как положительные или отрицательные. Для подтверждения диагноза гепатита С или устойчивого вирусологического ответа, определяемого как отсутствие детекции РНК-HCV через 12 нед после завершения лечения, можно использовать качественные тесты. Anti-HCV не обеспечивают стойкого иммунитета против HCV.

Лечение проводится противовирусными препаратами прямого действия; возможно полное устранение вирусной РНК.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.4.7. Маркеры рака печени

ГЦР — наиболее частая (около 85% случаев) злокачественная опухоль печени, исходящая из гепатоцитов. Реже встречается холангиоцеллюлярный рак — злокачественная опухоль, исходящая из эпителия внутрипеченочных желчных протоков. ГЦР развивается чаще всего на фоне цирроза печени (около 80% случаев) или хронического воспаления любой этиологии: HBV и HCV, алкогольного и неалкогольного стеатогепатита, токсических повреждений печени. При воспалении активируется синтез активных форм кислорода (АФК), что создает среду, способствующую мутагенезу, опухолевой прогрессии и выживанию клеток, имеющих злокачественный фенотип. Хронический гепатит с повторяющимися циклами некроза и регенерации индуцирует генетические изменения, меняющие системы репарации ДНК. Интеграция вирусной ДНК происходит при воспалении в процессе пролиферации гепатоцитов, в опухолях чаще всего наблюдается встраивание участков, кодирующих белок HBx. HBx представляет собой транскрипционный белок, который активирует большое количество клеточных генов, включая гены контроля пролиферации и апоптоза. Воздействуя на митохондрии, HBx увеличивает уровень АФК, что в сочетании с интенсивной пролиферацией повышает риск появления и накопления мутаций. Наиболее высокая частота интеграции HBV в геном ГЦР описана в районе генов *TERT*, определяющих репликативное бессмертие клеток (10–15%), гистоновой метилтрансферазы KMT2B/MLL2, регулирующей конформацию хроматина и экспрессию генов (5–10%), и циклина E, контролирующего переход из G1 в S-фазу клеточного цикла (5%).

Диагноз основывается на определении уровня АФП, результатах визуальных методов и иногда биопсии печени. Согласно клиническим рекомендациям «Рак печени (гепатоцеллюлярный)», разработанным Ассоциацией онкологов России (2020), рекомендуется пациентам с подозрением на ГЦР или установленным диагнозом ГЦР с целью определения этиологии и выраженности сопутствующего заболевания печени, а также выявления показаний к назначению сопутствующей противовирусной терапии провести исследование на наличие антител к HBsAg и HCV; при положительном результате теста на HBsAg необходимо исследование на наличие HBeAg, анти-HBe и количественное определение ДНК HBV.

**α-Фетопротеиновый тест.** В 1970 г. в Государственном комитете СССР по делам изобретений и открытий зарегистрировано открытие в области биохимии, связанное с синтезом биологически активных веществ у человека и высших животных в период их эмбрионального развития. Авторы этой работы — Ю.С. Татарinov и В.Н. Масюкевич. α-Фетопротеиновый тест — метод выявления эмбриональных сывороточных глобулинов (α-фетопротеинов) с помощью реакции преципитации в агаре. АФП рекомендуется определять для оценки агрессивности заболевания, прогноза его течения, контроля эффективности лечения. Результат анализа на АФП считается положительным, если уровень АФП >100 нг/мл или он увеличивался на 7 нг/мл в месяц по результатам трех последовательных измерений. Высокий уровень АФП редко наблюдается при других заболеваниях, кроме тератокарциномы яичка — опухоли, которая встречается крайне редко. Более низкий уровень АФП менее специфичен и может отражать процессы регенерации печени при острых и хронических вирусных гепатитах.

Для уточняющей диагностики раннего и высокодифференцированного ГЦР Международная консенсусная группа по опухолям печени рекомендует панель из трех иммуногистохимических маркеров — HSP70 (HSPA7), глипикана 3 (GPC3) и глутаминсинтетазы (GS), а для выявления прогностически неблагоприятных случаев — цитокератин 19 (CK 19).

Наиболее эффективным методом лечения больных ГЦР является резекция печени, однако частота рецидивов заболевания в течение 5 лет после операции составляет, по разным оценкам, от 70 до 100%. Нередко при диагностике ГЦР выявляют несколько опухолевых узлов. В печени как паренхиматозном органе, не имеющем внутриорганных ограничительных структур, предсформированы все условия для неограниченного свободного роста опухоли и внутриорганных метастазирования. Мультифокальный ГЦР и рецидивы заболевания возникают в результате образования независимых опухолей *de novo*, развития опухолей из сателлитных узелков в результате метастазирования первичной опухоли. Мультицентрический рост ГЦР является достаточно распространенным явлением, поскольку гепатоканцерогенез протекает на фоне имеющихся у пациента хронических заболеваний печени. Независимые фокусы роста ГЦР чаще образуются на фоне хронического цирроза печени. От происхождения мультифокальных и рецидивирующих ГЦР зависят как прогноз выживаемости, так и тактика лечения пациента, поэтому важной задачей является определение клональности и межопухолевой гетерогенности ГЦР.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.5. Биохимические исследования при патологии почек

Важное обстоятельство, связанное с необходимостью точной оценки почечной функции, заключается в том, что при дозировании большинства лекарств необходимо учитывать степень почечной недостаточности. Кроме того, даже умеренное снижение почечной функции является фактором риска развития ССЗ. Лабораторные тесты позволяют оценить основные функциональные характеристики почек: фильтрацию в клубочках и реабсорбцию в канальцах. Фильтрация традиционно определяется по клиренсу креатинина. Постепенно в клиническую практику для оценки клубочковой фильтрации вводится показатель цистатин С (ЦсС). Степень повреждения почек оценивается в основном по экскреции белка и его компонентов. Исследование биохимических маркеров в моче достаточно проблематично из-за нестандартизованности и агрессивности среды, поэтому даже при патологии почек предпочтение отдается исследованию компонентов сыворотки крови. Для оценки воспаления паренхимы почек используется маркер липокалин-2 (L2), также известный как липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL).

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.5.1. Скорость клубочковой фильтрации



Важнейшим показателем болезни почек считается изменение СКФ. Лабораторными методами СКФ оценивается по изменению концентрации в крови метаболитов (креатинин, ЦсС), которые фильтруются в клубочках почек, в канальцах не реабсорбируются и не секретируются.

**Клиренс креатинина.** Уровень креатинина в сыворотке начинает повышаться, когда СКФ снижена на 50–75%. Определение клиренса креатинина по пробе Реберга (клиренс эндогенного креатинина за сутки) является приемлемым для определения СКФ, особенно при уровне ниже 100 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup>. Измерив концентрацию креатинина в сыворотке крови (она равна концентрации креатинина в первичной моче) и моче, а также объем мочи, выделяемой за определенное время (обычно сутки), можно рассчитать клиренс креатинина, характеризующий СКФ по формуле: Клиренс креатинина (мл/мин) = КР мочи × диурез (мл)/КР сыворотки × время сбора мочи (мин),

$$\text{Клиренс креатинина (мл/мин)} = \frac{\text{КР мочи} \times \text{диурез (мл)}}{\text{КР сыворотки} \times \text{время сбора мочи (мин)}}$$

где КР — концентрация креатинина.

Фильтрация в почках зависит от роста и массы тела, поэтому клиренс креатинина рассчитывают на стандартную среднюю поверхность тела, равную 1,73 м<sup>2</sup>. Для этого в направлении на исследование, кроме объема мочи, собранной за сутки, указывают рост и массу тела (**табл. 6.13**).

**Таблица 6.13.** Референсные значения клиренса креатинина

Возраст, лет	Мл/мин на 1,73 м <sup>2</sup>	
	Мужчины	Женщины
<1	65–100	65–100
1–30	88–146	81–134
30–40	82–140	75–128
40–50	75–133	69–122
50–60	68–126	64–116
60–70	61–120	58–110
>70	55–113	52–105

Оценка стадии почечной патологии при ХБП осуществляется по расчетной величине — расчетной скорости клубочковой фильтрации (рСКФ) как пригодный в амбулаторной и клинической практике скрининговый метод, наиболее полно отражающий количество и суммарный объем работы нефронов (**табл. 6.14**).

**Таблица 6.14.** Стадии хронической болезни почек по уровню расчетной скорости клубочковой фильтрации

Стадия	Определение	СКФ, мл/мин на 1,73 м <sup>2</sup>
I*	Высокая и оптимальная	>90
II*	Незначительно сниженная	60–89
IIIa	Умеренно сниженная	45–59
IIIб	Существенно сниженная	30–44
IV	Резко сниженная	15–29
V	Терминальная почечная недостаточность	<15

\* Стадии I и II требуют подтверждения с использованием маркеров почечного повреждения. При их отсутствии ХБП не диагностируется.

При этом референсным значением рСКФ считается >60 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup>. Результат <60 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> рассматривается как патологический. Формула рСКФ (англ. CKD-EPI) рекомендована к применению для взрослых 18–70 лет (**табл. 6.15**).

**Таблица 6.15.** Формулы расчета расчетной скорости клубочковой фильтрации у пациентов

Женщины	
Если КР ≤62 мкмоль/л	рСКФ = 144 × (0,993 года) × ((КР/88,4)/0,7)–0,328
Если КР >62 мкмоль/л	рСКФ = 144 × (0,993 года) × ((КР/88,4)/0,7)–1,210
Мужчины	
Если КР ≤80 мкмоль/л	рСКФ = 141 × (0,993 года) × ((КР/88,4)/0,9)–0,412
Если КР >80 мкмоль/л	рСКФ = 141 × (0,993 года) × ((КР/88,4)/0,9)–1,210

## Глава 6. Клиническая биохимия

Примечание. КР — креатинин сыворотки, мкмоль/л.

При отсутствии возможности скрининга рСКФ с помощью электронного калькулятора допускается расчет по формуле Кокрофта–Голта с обязательным приведением к стандартной площади поверхности тела 1,73 м<sup>2</sup>.

Многие инструкции по применению лекарственных препаратов, которые требуют коррекции дозы при изменениях функционального состояния почек, составлены именно на основе формулы Кокрофта–Голта.



**ЦсС** — негликозилированный протеин массой 13 кДа продуцируется на постоянном уровне всеми ядродержащими клетками и присутствует в больших количествах во всех биологических жидкостях, выводится из организма только почками. ЦсС свободно фильтруется в клубочках, не секретируется в канальцах, реабсорбируется и расщепляется в клетках почечных канальцев. Уровень в плазме и в моче не зависит от мышечной массы, возраста, пола, этнической принадлежности.

Референсные значения в сыворотке крови: 0,62–1,15 мг/л.

Концентрация ЦсС в сыворотке крови обратно коррелирует с СКФ и может быть чувствительнее сывороточного креатинина для оценки СКФ. ЦсС является маркером функции клубочков в случае отсутствия увеличения уровня креатинина, например при оценке нефротоксичности антибиотиков у новорожденных. Повышение уровня ЦсС после инфаркта является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о нарушении фильтрационной функции почек. С другой стороны, низкий уровень ЦсС служит одной из причин снижения эластичности мембран и впоследствии развития атеросклероза и аневризмы брюшной аорты, то есть низкая концентрация этого маркера является фактором риска вторичных сердечно-сосудистых нарушений. ЦсС повышен при тубулярной дисфункции и является предиктором плохого исхода в гетерогенной группе пациентов без начальной олигурии. По мнению экспертов, ЦсС как индикатор СКФ лучше креатинина.

- Повышение креатинина в сыворотке начинается только после снижения СКФ  $\geq 50\%$ , ранних стадий снижения СКФ креатинин «не видит».
- При СКФ 40–90 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  нет пропорциональности между повышением креатинина и снижением СКФ, в этом диапазоне креатинин дает ложноотрицательные результаты.
- Уровень креатинина относительно инерционен; его стационарный уровень устанавливается только через 2–3 дня после наступления ОБП.
- ЦсС позволяет определить СКФ в «слепом диапазоне» креатинина.

Определение ЦсС в сыворотке рекомендуют для скрининга ХБП, особенно на начальных стадиях, когда креатинин сыворотки малочувствителен, оценки СКФ у пациентов со сниженной мышечной массой, у детей и пожилых.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.5.2. Белки мочи

Повышение экскреции белка с мочой, **протеинурия**, сопровождается практически любую патологию почек. В норме в результате фильтрации плазмы крови через гломерулярный фильтр происходит практически полное разделение белков от электролитов и низкомолекулярных полипептидов, попадающих в плазменный фильтрат. Размеры пор базальной мембраны гломерулярного фильтра соответствуют размерам альбумина (примерно 60 кДа). Слой гликокаликса с анионными окончаниями формирует электростатический заряд на поверхности фенестрированного эндотелия, базальной мембраны и подоцитов. В результате крупные белки не проникают через почечный фильтр, альбумин отталкивается электростатическим зарядом и также не проникает через гломерулярную мембрану. Белки меньших размеров, чем альбумин, фильтруются в клубочках почек. Белки с молекулярной массой менее 20 кДа практически беспрепятственно проникают через почечный фильтр. Основная часть этих белков (95–99%) реабсорбируется в извитом проксимальном отделе нефрона.

Протеинурии при патологических состояниях делятся на преренальные, ренальные (селективные и неселективные) и постренальные. Основные их характеристики представлены в табл. 6.16.

**Таблица 6.16.** Виды протеинурии и их маркерные белки

Тип протеинурии	Причина	Масса белков, кДа	Экскреция, г/24 ч	Маркерный белок
Преренальная	Увеличенный синтез низкомолекулярных белков, распад тканей	Нб, МГ, моноклональные Ig (белок Бенс-Джонса)	0,1–50	Увеличение количества общего белка. Содержание альбумина в пределах нормы
Селективная гломерулярная	Увеличенная проницаемость клубочков для анионных белков средней молекулярной массы	50–70, в основном альбумин и трансферрин	0,03–0,3	Альбумин, трансферрин
Неселективная гломерулярная	Увеличенная проницаемость клубочков для высокомолекулярных белков	50–>150	1,5–20	Альбумин, Ig
Тубулярная	Снижение реабсорбции низкомолекулярных белков клетками почечного эпителия проксимального отдела нефрона	10–70	0,15–15	$\alpha_1$ -Микроглобулин, $\alpha_2$ -микроглобулин, $\alpha$ -NAG, ЦсС, ретинолсвязывающий белок
	Увеличенная секреция белка клетками почечного эпителия дистального отдела нефрона	80–100	0,02–0,2	Белок Тамма–Хорсфола
Смешанная	Увеличенная гломерулярная проходимость	10–>150	0,15–20	Альбумин, $\alpha_1$ -микроглобулин, общий

	высокомолекулярных белков с вторичным нарушением или насыщением тубулярной реабсорбции			белок
Постренальная	Кровотечение или воспаление мочевыводящих путей	Плазменные белки, IgA	Различное	α <sub>2</sub> -Макроглобулин, АпоА-1

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.5.3. Липокалин-2/NGAL

Л2, также известный как NGAL, белок с молекулярной массой 25 кДа, связан с реакциями врожденного антимикробного иммунитета, дифференцировкой, пролиферацией и выживанием клеток. Синтез Л2 эпителиальными клетками, в том числе в проксимальных канальцах почек, стимулируется при воспалении. Л2 секретируется в мочу толстой частью восходящей петли Генле и собирающими трубками, где он выполняет функцию антимикробной и антиокислительной защиты хелатированием железа. Основным лиганд Л2 — сидерофоры — молекулы, связывающие железо. Плазменный Л2 свободно фильтруется клубочками, большая его часть эффективно реабсорбируется в проксимальных канальцах, возвращая таким путем железо клеткам. Уровни в моче и плазме коррелируют, если синтез Л2 повышен. В моче Л2 появляется только при повреждении проксимальных канальцев за счет роста синтеза Л2 *de novo* в дистальных отделах нефрона, что и происходит при ОБП. Ранняя диагностика ОБП с помощью определения уровня NGAL в моче или плазме позволяет принять клиническое решение в кратчайшее время и меры, чтобы остановить ухудшение функции почек.

*Референсные значения:*

- в моче здоровых доноров — 0,7–9,6 нг/мл;
- в плазме крови здоровых доноров — 37–106 нг/мл.

В сыворотке крови повышение концентрации Л2 определяется раньше, чем рост сывороточного креатинина. Ранний и резкий подъем уровня Л2 в моче и сыворотке наблюдается при повреждении канальцев, связанном с ишемией-реперфузией, при ишемическом повреждении почек после операции на сердце с подключением к аппарату искусственного кровообращения. Рост концентрации Л2 в моче наблюдается при ОБП за счет острого тубулярного некроза или тубулоинтерстициальной нефропатии.

В отличие от единственного определения креатинина в сыворотке, единственное определение Л2 в моче позволяет выявить ОБП у пациентов с разными механизмами повреждения, даже когда время повреждения неизвестно, что надежно дифференцирует ОБП от прerenальной азотемии и ХБП. Маркер помогает предсказать неблагоприятный исход. Л2 может быть использован в диагностике ОБП в момент первичного обследования пациента, даже когда изменения уровня креатинина сыворотки минимальны.

Л2 является перспективным маркером ХБП: он обратно пропорционален СКФ при почечной дисплазии, обструктивной уропатии и гломерулярных заболеваниях почек. У больных с аутомным доминантным поликистозом почек Л2 коррелирует со степенью остаточной СКФ и тяжестью заболевания. Л2 является ранним маркером хронического тубулоинтестинального повреждения у пациентов с волчаночным нефритом, может повышаться при почечных инфекциях. У пациентов с васкулитами с поражением почек повышение уровня Л2 в плазме коррелировало со снижением ренальной функции.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.6. Биохимические маркеры метаболических заболеваний костной ткани

Биохимические маркеры метаболизма костной ткани дают информацию о патогенезе заболеваний скелета и скорости ремоделирования. Они могут использоваться для контроля эффективности лечения в короткие сроки и идентифицировать больных с быстрой потерей костной массы. Биохимические маркеры показывают усредненную скорость ремоделирования всего скелета, а не отдельных его областей. Различают биохимические маркеры формирования и резорбции кости, характеризующие функции остеобластов и остеокластов.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.6.1. Маркеры формирования костной ткани

К биохимическим маркерам формирования кости относятся костный изофермент щелочной фосфатазы (КЩФ), остеокальцин (ОК), карбокси- и аминотерминальные пропептиды проколлагена I типа.

**КЩФ** (остаза) представляет собой гликопротеид, находящийся на поверхности остеобластов. Количественное определение КЩФ дает полезную информацию о костном ремоделировании, эффективности антирезорбтивной терапии.

*Метод исследования:* иммунохимический анализ.

*Референсные значения:*

- мужчины — 4–21 мкг/л;
- женщины, пременопауза — 3–15 мкг/л;

- женщины, постменопауза — 4–23 мкг/л.

**Диагностическое значение.** Значительное увеличение КЩФ наблюдается при повышенной активности остеобластов: у детей в период активного роста костей, в последний триместр беременности, при переломах, возобновлении движений после длительного постельного режима, деформирующем остите, рахите, миеломе, гиперпаратиреозе, остеогенной саркоме, костном туберкулезе. Специфичность КЩФ, а также такие характеристики ее метаболизма, как время полужизни в крови, составляющее 1–2 сут, отсутствие метаболизма в печени, выведение из крови почками, приближают КЩФ к идеальным маркерам активности остеобластов. Повышение активности КЩФ при рахите отмечается чаще, чем увеличение содержания неорганического фосфора; при выздоровлении активность КЩФ нормализуется позднее, чем уровень Са и Р, примерно в те же сроки, что и рентгенологические показатели. Интерпретация данных исследования КЩФ бывает затруднена, что связано с половыми и возрастными особенностями ее активности.

**Остеокальцин** — неколлагеновый кальцийсвязывающий белок с молекулярной массой 5,7 кДа, синтезируется остеобластами, определяется в сыворотке крови. ОК обогащен гаммакарбоксиглутаминовой кислотой, для его синтеза требуется витамин К. Более 90% синтезируемого остеобластами ОК у молодых и около 70% у взрослых людей включается в костный матрикс, а остальная часть попадает в кровоток.

**Референсные значения:** сыворотка крови — 3–13 мкг/л.

Выводится ОК из кровотока почками, при снижении клубочковой фильтрации уровень ОК в крови может быть повышенным. Наличие в кровотоке фрагментов ОК из-за частичного его разрушения в сосудистом русле под воздействием циркулирующих протеаз или его разрушения в процессе резорбции кости также может приводить к повышенным значениям. Кроме того, уровень ОК в крови подвержен большим суточным колебаниям. Вместе с тем получена хорошая корреляция между уровнем ОК в крови и данными инвазивных методов оценки процесса формирования кости при разных метаболических поражениях скелета. Поэтому, несмотря на все вышеописанные ограничения, ОК в крови рассматривается как один из самых информативных биохимических маркеров формирования кости и скорости ремоделирования.

**Карбокси- и аминотерминальные пропептиды проколлагена I типа** (англ. P1CN и P1NP). Коллаген I типа — основной белок, составляющий 90% органического матрикса кости. Он синтезируется остеобластами в виде предшественника проколлагена I типа, представляющего собой большую молекулу, содержащую с С- и N-концов частично глобулярные фрагменты (P1CN и P1NP), они отделяются от основной молекулы с помощью специфических пептидаз. Фрагменты поступают в межклеточную жидкость и кровоток. N-терминальный пропептид проколлагена I-го типа (P1NP) обладает большей стабильностью и диагностической ценностью, чем С-терминальный фрагмент (P1CP), который распадается в кровотоке через 6–8 мин.

**Референсные значения P1NP:**

- мужчины — <36 нг/мл;
- женщины — 20–76 нг/мл.

Содержание P1NP в крови прямо пропорционально количеству вновь синтезированного и встроенного в ткань коллагена. При заболеваниях костей, сопровождающихся отклонениями метаболизма костной ткани и нарушенным соотношением разрушения и формирования костного матрикса, увеличивается продукция коллагена I-го типа и, соответственно, P1NP.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.6.2. Маркеры резорбции костной ткани

Биохимические маркеры резорбции кости пиридинолин (ПИД) и дезоксипиридинолин (ДПИД), карбокси- и аминотерминальные телопептиды коллагена I типа попадают в кровоток из зоны резорбции.

**ПИД и ДПИД** — элементы поперечных связей, формирующихся между концевой областью одной молекулы коллагена и спиралевидной областью другой, способствуют стабилизации коллагена. Наиболее специфичным для костей является ДПИД, поскольку он содержится преимущественно в костях и в небольшом количестве — в дентине, аорте и связках. ПИД, помимо костей, присутствует в достаточном количестве в хрящах. ПИД и ДПИД не метаболизируются в организме, а экскретируются с мочой. Для оценки резорбции используется отношение их концентрации к концентрации креатинина в моче. Для анализа используют суточную или утреннюю мочу.

**Референсные значения ДПИД в моче:** 10,3–20 нмоль на 1 ммоль креатинина.

**Карбокси- и аминотерминальные телопептиды коллагена I типа** образуются в тканях, которые содержат коллаген I типа. В целях диагностики преимущественно определяют С-концевые телопептиды коллагена I типа (синонимы: С-терминальный телопептид сыворотки, b-CrossLaps). Молекулярная масса телопептидов составляет от 9 до 20 кД, они эффективно выводятся с мочой. Концентрация карбокси- и аминотерминальных телопептидов коллагена I типа в сыворотке тесно коррелирует со скоростью резорбции кости. Для определения аминотерминальных телопептидов коллагена I типа используют ИФА с моноклональными антителами против поперечносвязанных молекул коллагена I типа (CrossLaps). CrossLaps можно использовать для определения телопептидов коллагена как в сыворотке, так и в моче. В период менопаузы маркер CrossLaps увеличивается в сыворотке почти в 2 раза. Динамическое определение уровня телопептидов имеет значение для прогнозирования восстановления минеральной плотности кости при проведении антирезорбционной терапии у женщин в постменопаузальный период, у пациентов с остеопенией и болезнью Педжета. Преимущество использования CrossLaps состоит в том, что данный маркер костной резорбции позволяет быстро оценить эффективность всех видов терапии остеопороза уже через 3 мес после начала лечения. Увеличение CrossLaps от среднего значения нормы на 2SD ассоциируется с двукратным повышением риска перелома шейки бедра.

*Референсные значения:*

- мужчины <0,70 нг/мл;
- женщины <0,57 нг/мл.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.6.3. Маркеры ремоделирования кости при заболеваниях скелета

У здоровых людей в результате деятельности остеобластов резервированная полость полностью заполняется вновь образованной костью. Для всех заболеваний скелета характерны те или иные нарушения ремоделирования кости, что сопровождается возникновением отклонений уровня биохимических маркеров. При остеопорозе область резорбции заполняется лишь частично, что ведет к прогрессирующему истончению трабекул и даже их исчезновению из-за перфоративной резорбции.

Первичный остеопороз сопровождается отчетливым повышением ПИД и карбокситерминальных телопептидов коллагена I типа. У женщин при остеопорозе вследствие дефицита эстрогенов показана линейная зависимость между ДПИД и среднегодовой потерей плотности кости шейки бедра. Риск переломов шейки бедра наибольший при сочетании высокой экскреции ДПИД с низкой плотностью кости. Из других заболеваний скелета наибольшая экскреция ДПИД наблюдается при раке грудной железы с метастазами в кость из-за большого, хоть и локального разрушения скелета. Из метаболических заболеваний скелета самая высокая экскреция ДПИД и ПИД — при первичном гиперпаратиреозе, болезни Педжета и гипертиреозе, что связано с самой большой скоростью ремоделирования кости.

Биохимические маркеры формирования кости при различных заболеваниях скелета изменяются по-разному, при этом важен уровень каждого маркера в отдельности, поскольку они характеризуют разные функции остеобластов.

При первичном гиперпаратиреозе, остеопорозе у женщин после менопаузы выявлено повышение как КЩФ, так и ОК, но если при гиперпаратиреозе степень повышения обоих маркеров аналогична, то при остеопорозе повышение ОК незначительное, а КЩФ отчетливое. При гипертиреозе и акромегалии оба маркера в пределах нормы или незначительно повышены, а при гипопаратиреозе снижены. Для ХБП характерно повышение ОК при нормальной величине КЩФ, а для гиперкортицизма, остеопении и метастазов в кость — повышение КЩФ и снижение ОК. Для интерпретации результатов определения биохимических маркеров формирования кости необходимо знать состояние резорбции кости. Особенно трудна оценка повышения уровня биохимических маркеров формирования кости, которая при сочетании с усилением резорбции свидетельствует, как правило, об ускорении ремоделирования с потерей костной массы. Например, при гипертиреозе наблюдается увеличение ПИД более чем в 3 раза, указывающее на увеличение резорбции и ускорение ремоделирования. Вместе с тем ОК и КЩФ повышаются незначительно, что свидетельствует об отставании процессов формирования кости от процессов резорбции.

В основе возникновения постменопаузального остеопороза лежит дефицит эстрогенов, который первично влечет за собой активизацию процесса резорбции кости с вторичным усилением процесса формирования вследствие спаренности обоих процессов. Потери костной массы возникают в результате преобладания резорбирующих кость процессов и могут быть как быстрыми, так и медленными в зависимости от степени усиления резорбции и степени нарушения соотношения между процессами ремоделирования кости. Поэтому для постменопаузального остеопороза характерно увеличение таких маркеров резорбции, как ПИД, ДПИД, карбокситерминальных телопептидов коллагена I типа и оксипролина (ОП), а также различной степени выраженности увеличение маркеров формирования кости — ОК, КЩФ и карбокситерминальных пропептидов проколлагена. По соотношению изменения маркеров резорбции и формирования можно судить о скорости костных потерь, предсказать риск перелома кости, а также выбрать оптимальную терапию (при высокой скорости костного оборота предпочтительны препараты, подавляющие резорбцию, а при низкой — препараты, стимулирующие формирование кости).

Остеопороз при первичном гиперпаратиреозе развивается в результате первичного усиления процесса резорбции кости остеокластами под действием паратиреоидного гормона и процесса формирования кости вследствие вторичной активизации остеобластов. Таким образом, при первичном гиперпаратиреозе имеет место высокая скорость ремоделирования, которая неизбежно сопровождается потерями костной массы и характеризуется значительным повышением уровня как маркеров резорбции (ПИД, ДПИД), так и маркеров формирования кости (ОК и КЩФ). Остеопороз при гипертиреозе, как и при первичном гиперпаратиреозе, развивается вследствие активизации остеокластов, то есть первичного усиления резорбтивных процессов в скелете. Изменения со стороны костного оборота и биохимических маркеров резорбции и формирования аналогичны изменениям при первичном гиперпаратиреозе.

Патогенез костных потерь при избытке глюкокортикоидов связывают с прямым подавлением глюкокортикоидами формирования кости остеобластами, а также с увеличением резорбции кости вследствие активизации остеокластов, вызываемой паратиреоидным гормоном. Его уровень повышается в ответ на гипокальциемию (вторичный гиперпаратиреоз), возникающую в результате вызываемого глюкокортикоидами нарушения всасывания кальция в кишечнике и снижения реабсорбции кальция в почках. Таким образом, на тканевом уровне происходит подавление формирования кости. При этом резорбция кости может быть либо нормальной, либо усиленной, что и приводит к нарушению баланса между этими двумя процессами в местах ремоделирования кости и, соответственно, к потере костной массы.

## Глава 6. Клиническая биохимия

При остеопорозе, вызванном экзогенным и эндогенным гиперкортицизмом, наблюдают снижение ОК и нормальный уровень КЩФ. Глюкокортикоиды стимулируют продукцию остеобластами КЩФ, поэтому ее нормальные значения у больных остеопорозом могут объясняться комбинацией двух противоположных влияний глюкокортикоидов на остеобласты (усиления продукции КЩФ каждой клеткой и уменьшения числа продуцирующих клеток). Глюкокортикоиды подавляют синтез коллагена I типа остеобластами. Значительных изменений со стороны показателей резорбции кости при глюкокортикоидном остеопорозе не выявлено.

Для большинства заболеваний скелета характерно ускорение ремоделирования с усилением резорбции, поэтому для контроля лечения используют главным образом маркеры резорбции кости. Исследование ПИД и ДПИД после 3 мес лечения эстрогенами женщин с постменопаузальным остеопорозом выявляет снижение резорбции кости. Более длительное лечение ведет к дальнейшему уменьшению ДПИД, сопровождаемому нарастанием плотности кости. Лечение бисфосфонатами женщин, страдающих остеопорозом, также ведет к прогрессирующему снижению уровня ДПИД с достижением нормальных величин к 6 мес лечения. Лечение бисфосфонатами при болезни Педжета сопровождается закономерным снижением уровня ПИД, ДПИД, ОП и КЩФ, ДПИД нормализуется к 4-му, ПИД — к 5-му, ОП — к 7-му, а КЩФ — только к 24-му месяцу терапии. Такое же отсроченное снижение КЩФ характерно для гипертиреозного остеопороза. На фоне лечения карбимазолом<sup>69</sup>, радиоактивным йодом, а также после тиреоидэктомии уровни ПИД и ОК снижались уже через месяц, в то время как уровень КЩФ через месяц повышался и снижался лишь через 4 мес. Возможно, такая динамика КЩФ обусловлена активацией репаративных процессов в скелете. Определение уровня ПИД и ДПИД до и после операции удаления аденомы паращитовидных желез демонстрирует хорошую эффективность операции.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.7. Биомаркеры повреждения нервной ткани

#### 6.7.1. Нейронспецифическая энолаза

NSE входит в группу гликолитических ферментов. Она содержится в цитоплазме нейронов (изофермент  $\alpha\alpha$ ) и нейроэндокринных клеток (изофермент  $\alpha\beta$ ) и считается биомаркером повреждения нейронов. NSE — единственный биомаркер, который может непосредственно оценить функциональное повреждение нейронов. Было обнаружено, что высокие концентрации NSE при ЧМТ соответствуют тяжести повреждения мозга. Одной из основных проблем, связанных с использованием NSE в качестве маркера повреждения мозга, является гемолиз. Эритроциты содержат большое количество NSE, поэтому гемолиз может вызвать заметное увеличение NSE в крови.

Обычно NSE обнаруживается уже через 6 ч после травмы мозга, увеличивается в первые 12 ч после травматического события и после этого снижается с возможным вторичным пиком в летальных случаях. Среднее время полураспада NSE составляет 24 ч при легкой и тяжелой ЧМТ, но может варьировать при тяжелой ЧМТ от 48–96 ч и до 10–14 дней.

*Референсные значения.* Уровень NSE более  $>10$  мкг/л считается патологическим.

Исследования в педиатрической популяции показали, что уровень NSE  $>15$  нг/мл в течение 24 ч после ЧМТ был связан с внутричерепными повреждениями. Еще одной особенностью NSE является ее медленное выведение из плазмы, что приводит к трудностям в проведении различий между первичными и вторичными повреждениями мозга.

NSE — специфический сывороточный маркер НЭО клеток системы APUD, представленных в различных тканях, и опухолей, имеющих нейроэндокринное происхождение. К этим опухолям относятся нейробластома, ретинобластома, медуллярная карцинома ЦЖ, карцинома островковых клеток ПЖ, карциноид, феохромоцитома, мелкоклеточный рак легких. Активность фермента коррелирует с клиническим статусом и используется при мониторингировании онкозаболевания и в прогностических целях (значительное повышение NSE говорит о неблагоприятном прогнозе), особенно при мелкоклеточном раке легких и нейробластоме.

## Глава 6. Клиническая биохимия

### 6.7.2. Белок S100B

Кальцийсвязывающие белки семейства S100 локализованы в цитоплазме и ядре разных клеток, они важны в регуляции ряда клеточных процессов, включая пролиферацию и дифференциацию. Белок S100B локализован преимущественно в астроцитах и шванновских клетках ЦНС. Небольшое количество S100B также обнаруживается в периферических участках, включая адипоциты, меланоциты и другие клетки.

*Референсные значения:*

- дети: 0–2 года — 63–387 нг/л; 3–19 лет — 43–204 нг/л;
- взрослые: 20–60 лет — 20–100 нг/л; свыше 60 лет — 15–129 нг/л.

Для взрослых принят порог клинического решения — более 100 нг/л.

S100B используется в качестве инструмента скрининга, мониторинга и прогнозирования при лечении пациентов с травматической ЧМТ, тест включен в несколько руководств в качестве скринингового перед проведением компьютерной томографии головы. Уровень S100B значительно выше у детей с ЧМТ по сравнению со здоровыми лицами и выше у детей с более низкими показателями по шкале комы Глазго. Высокий уровень S100B при поступлении связан с плохим исходом при выписке из больницы. Исход через 6 мес после травмы, оцениваемый по шкале исхода Глазго, связан с уровнем S100B при поступлении и через неделю после травмы. Время до пика уровня S100B было связано с нейрокогнитивными результатами. Установлено, что уровень S100B при поступлении

сразу после ЧМТ связан с плохим исходом через 12 мес после травмы. Показана высокая корреляция между NSE и S100B при ЧМТ.

Уровень S100B в сыворотке крови может быть повышен при разных неопластических и невропатологических состояниях, включая меланому, злокачественные опухоли периферического нервного ствола, шванному, параганглиому стромальных клеток, гистиоцитому и саркомы. В клинической практике S100B в основном используется как белковый опухолевый маркер для оценки состояния пациентов с меланомой. Уровень S100B в сыворотке крови может отражать опухолевую нагрузку, коррелировать с ответом на лечение, выявлять пациентов с повышенным риском рецидива заболевания, прогнозировать прогноз и может быть использован в качестве ранних биомаркеров рецидива опухоли.

#### **Рекомендуемая литература**

1. Везали Е.В., Малинникова Е.Ю., Долгов В.В. Интерпретация лабораторных исследований при заболеваниях печени. М. ГЭОТАР-Медиа 2025, 160 с.
2. Долгов В.В., Годков М.А. и др. Качество лабораторных исследований для эффективной диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 128 с.
3. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / Под ред. В.В. Долгова. М.–Тверь, Триада, 2015. 418 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. В 2 т. / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
5. Клиническая лабораторная диагностика: учебник в 2 томах. Т. 1 / Под ред. В.В. Долгова. М.: Лабдиаг, 2017. 688 с.
6. Клинические рекомендации «Рак печени (гепатоцеллюлярный)»: 2020 г. <https://rccrst.ru/content/klinicheskie-rekomendaczii/>
7. Лапосота М., Маккэффри П. Клинические лабораторные методы. Атлас наиболее часто выполняемых исследований / Пер. с англ. под ред. В.В. Долгова, М.А. Годкова, А.В. Бугрова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 224 с.
8. Ройтман А.П., Арабидзе Г.Г. и др. Интерпретация лабораторных исследований при атеросклерозе и его осложнениях. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 128 с.
9. Селиванова А.В., Аметов А.С. и др. Интерпретация лабораторных исследований при сахарном диабете. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 160 с.

## **Глава 7. Лабораторная иммунология**

Иммунная система состоит из генеративных или центральных лимфоидных органов, в которых лимфоциты созревают и приобретают способность реагировать на антигены, и периферических (или вторичных) лимфоидных органов, в которых инициируются адаптивные иммунные реакции на патогены. Основными генеративными лимфоидными органами являются тимус, где развиваются Т-клетки, и кроветворный костный мозг — место выработки всех клеток крови, где созревают В-лимфоциты и практически все другие клетки иммунной системы. Периферические лимфоидные органы организованы таким образом, чтобы обеспечить прямой контакт между клетками иммунной системы и антигенами для развития адаптивных иммунных реакций. ЛУ представляют собой инкапсулированные высокоорганизованные скопления лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета, которые расположены по ходу лимфатических сосудов. Селезенка играет важную роль в реализации иммунного ответа на антигены, поступающие с кровью. Кровь фильтруется в селезенке, протекая через сеть синусоид, содержащих макрофаги, которые захватывают микроорганизмы и их продукты. В периферических лимфоидных органах Т- и В-лимфоциты распределены в разных, но тесно сопряженных областях. В-клетки сосредоточены в фолликулах (В-зона), расположенных в коре ЛУ, где они несколько месяцев «ожидает» контакта с растворимым антигеном, который поступает с лимфой. Т-лимфоциты сосредоточены в периартериолярных лимфоидных зонах, окружающих мелкие артериолы. В фолликулярных зонах В-клетки непосредственно взаимодействуют с антигенами, а в Т-зависимых зонах происходит презентация антигенов ДК и макрофагами. В-клетки, активированные антигеном после его распознавания, пролиферируют и формируют новую структуру — герминативный центр, в нем происходит их дальнейшая дифференцировка, цель которой — повышение специфичности синтезируемых антител. Лимфоидная система покровных тканей (кожа и слизистые оболочки) расположена под эпителием кожи, ЖКТ, дыхательных путей, урогенитального тракта и конъюнктивы соответственно. Глоточные миндалины и пейеровы бляшки кишечника представляют собой анатомически очерченные лимфоидные ткани в слизистой оболочке. Большое количество лимфоцитов, присутствующих в слизистых оболочках (уступающее только ЛУ), отражает огромную площадь поверхности этих тканей. Например, площадь слизистой оболочки кишечника составляет до 400 м<sup>2</sup>, а респираторного тракта с учетом бронхиального дерева и альвеол — 200 м<sup>2</sup>. Лимфоциты постоянно перемещаются между лимфоидными и другими тканями и оседают в определенных местах. Наивные лимфоциты мигрируют посредством кровотока и лимфоток по периферическим лимфоидным органам, где концентрируются антигены и инициируются иммунные реакции. Иммунная защита организма подразделяется на врожденный иммунитет, который обеспечивает немедленную защиту от микробной инвазии, и адаптивный (или приобретенный) иммунитет, который развивается медленнее и обеспечивает более специализированную защиту от инфекций. Врожденный иммунитет (природный или естественный) всегда присутствует у здоровых индивидов, он направлен на блокирование вторжения патогенов и их быструю элиминацию в случае успешного проникновения в ткани хозяина. Приобретенный иммунитет называется также специфическим, или адаптивным, иммунитетом и связан с тем, что для развития эффективной защиты требуются пролиферация и дифференцировка лимфоцитов в ответ на микроорганизмы и другие антигены (то есть он адаптируется к специфической реакции на чужеродный материал). Врожденный иммунитет филогенетически является более древним, в то время как специфический адаптивный иммунитет сформировался гораздо позднее.

## **Глава 7. Лабораторная иммунология**

## 7.1. Врожденные реакции иммунитета

### 7.1.1. Компоненты врожденного иммунитета

Компоненты врожденной иммунной системы включают эпителиальные барьеры, фагоциты, NK-клетки, белки плазмы. Врожденные иммунные реакции проявляются в виде фагоцитоза, воспаления и противовирусной защиты.

Первую раннюю линию врожденной защиты представляют эпителиальные барьеры кожи и слизистых оболочек, которая реализуется не только с помощью физических преград, но и посредством производства природных антибиотиков, синтезируемых в эпителии.

Инфекция начинается, когда патоген преодолевает один из анатомических барьеров. В случае повреждения эпителия вступают в действие другие механизмы раннего врожденного иммунитета: антимикробные ферменты, такие как лизоцим, который расщепляет клеточные стенки бактерий; противомикробные пептиды, такие как дефенсины, которые непосредственно лизируют мембраны бактериальных клеток; система комплемента, нацеленная на патогены, как для лизиса, так и для усиления фагоцитоза микроорганизмов макрофагами. Эти предварительно сформированные растворимые молекулы присутствуют во внеклеточной жидкости, крови и эпителиальных секретах и способны убить патоген либо ослабить его действие. Эпителиальные клетки обладают фагоцитарной активностью, продуцируют противомикробные вещества, цитокины, инициирующие и поддерживающие воспаление. Клеточные и гуморальные компоненты врожденной иммунной системы представлены в **табл. 7.1**.

**Таблица 7.1.** Клеточные и гуморальные компоненты врожденной иммунной системы

Компоненты	Основные функции
<b>Клеточные компоненты</b>	
Эпителий	Препятствие проникновению микроорганизмов
Интраэпителиальные лимфоциты	Киллинг микроорганизмов
Тучные клетки	Индукция провоспалительных медиаторов (гистамин, TNF- $\alpha$ , гепарин, лизосомальные гидролазы и протеазы), локализованных в цитоплазме
Нейтрофилы	Фагоцитоз и киллинг микроорганизмов
Эозинофилы	Участие в иммунном ответе против паразитов и в аллергических реакциях
Альвеолярные макрофаги M1, M2	Ранний фагоцитоз и киллинг микроорганизмов, секреция провоспалительных цитокинов, регуляция воспаления и репарации тканей
Лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILC)	Продукция цитокинов, содействие иммунному ответу, активация фагоцитов, иммунорегуляция
NK	Лизис инфицированных и опухолевых клеток. Активация макрофагов
<b>Эффекторный протеин</b>	
Комплемент	Киллинг микроорганизмов, опсонизация патогенов для фагоцитоза, хемотаксис лейкоцитов, воспаление
Коллектин (маннозосвязывающий лектин — MBL)	Опсонизация патогенов. Активация комплемента по лектиновому пути
Сурфактант (содержится в легких)	Уменьшение поверхностного натяжения в альвеолах. Бактерицидная — белки SP-A и SP-D нейтрализуют токсичный LPS грамотрицательных бактерий. Стимуляция активности альвеолярных макрофагов. Опсонизация фагоцитоза различных частиц макрофагами
Пентраксины (СРБ)	Опсонизация патогенов для фагоцитоза. Воспаление
Факторы свертывания	Ограничение инфицированной ткани

Врожденный иммунитет состоит из эволюционно древних типов гемопоэтических клеток, включая ДК, моноциты, тканевые макрофаги, гранулоцитарные клеточные популяции и NK (NK-лимфоциты). Идентифицированы лимфоидные клетки врожденного иммунитета (Innate lymphoid cell — ILC), которые играют важную роль в контроле тканевого гомеостаза при развитии инфекции, хронического воспаления, метаболических заболеваний и рака. Контакт патогена с клетками иммунной системы, которые присутствуют практически во всех тканях, является ключевым моментом. Наиболее важная роль во включении иммунных процессов принадлежит макрофагам. Благодаря наличию на поверхности и в цитоплазматических гранулах макрофагов рецепторов, распознающих образы патогенности (молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном, Pathogen-associated molecular patterns — PAMP), макрофаги фиксируют патоген, активируются и выделяют активные белковые субстанции — провоспалительные *цитокины*, которые расширяют зону активации клеток врожденного иммунитета. Цитокины вовлекают в сферу защитной реакции эпителиальные, эндотелиальные клетки, ДК. Распространению патогена сначала препятствует воспалительный ответ, который привлекает эффекторные клетки и молекулы врожденного иммунитета из крови в ткани, одновременно запускается процесс свертывания в мелких кровеносных сосудах ниже по кровотоку, за счет чего патогены не могут распространяться с током крови. Высоким защитным потенциалом обладают нейтрофилы, которые реализуют фагоцитоз, поступающие позднее моноциты, дифференцируясь в макрофаги, также выполняют фагоцитарные функции и способны стимулировать пролиферацию клеток, содействовать процессам репарации тканей. Кроме того, происходит синтез белков острой фазы, синтезируются бактерицидные вещества, активируется система

комплемента, реализуются гуморальные факторы врожденного иммунитета. В реакции на патоген участвуют и другие факторы первой линии защиты: лимфоидные клетки NKT, которые служат ранним источником IFN $\alpha$ , что приводит к усилению активации макрофагов;  $\alpha\alpha$ T-клетки, а также В-клетки маргинальной зоны селезенки, В1-лимфоциты, которые производят антитела широкой специфичности с низким сродством к антигену, что важно на начальном этапе инфицирования.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Клеточный врожденный иммунный ответ действует несколько дней. За это время может быть индуцирован опосредованный В- и Т-лимфоцитами адаптивный иммунный ответ, если ДК доставили антигены патогена в регионарную лимфоидную ткань. Кинетика развития врожденного и адаптивного иммунного ответа может варьировать при разных инфекциях.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.1.2. Распознавание во врожденном иммунитете

Клетки врожденной иммунной системы активируются рецепторами распознавания образов патогенности (PRR), которые обнаруживают структуры, типичные для микроорганизмов (PAMP). PRR экспрессируются фагоцитами, ДК и другими типами клеток и локализованы в разных клеточных компартментах, где могут быть обнаружены патогены и их продукты. Эти рецепторы присутствуют на поверхности клеток, где они встречают внеклеточные патогены; в эндосомах, которые поглощают микробные продукты; в цитозоле, где они выполняют функцию сенсоров цитоплазматических бактерий и продуктов повреждения клеток. Мембранные клеточные рецепторы обеспечивают не только распознавание PAMP, но и передачу сигнала внутрь клетки вплоть до генома через внутриклеточные сигнальные пути. Цитозольные рецепторы при распознавании патогена участвуют в процессах формирования фагосомы. Циркулирующие в крови и межклеточной жидкости секретируемые рецепторы распознают PAMP, связываясь с ними на поверхности патогенов.

Охарактеризовано пять основных семейств клеточных рецепторов врожденного иммунитета: Toll-подобные рецепторы (TLRs), лектиновые рецепторы С-типа (CLRs), NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-подобные рецепторы (RLRs) и цитозольные ДНК-сенсоры (CDSs). NLRs и RLRs относятся к цитозольным рецепторам распознавания бактериальных и вирусных продуктов. Для полноценной реализации функций врожденного иммунитета необходимо дополнительное распознавание рецепторами (PRR) «сигналов опасности» — молекулярных паттернов, связанных с повреждением (Damage-associated molecular patterns — DAMP), — веществ, продуцируемых клеткой в состоянии стресса: белков теплового шока, компонентов ядра, митохондрий и др.

У человека обнаружено 10 разных TLRs, каждый из которых связывает определенные типы молекул патогена. Рецепторы TLR-3, TLR-7, TLR-8 и TLR-9, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами, расположены в эндосомах, где высвобождаются ДНК и РНК поглощенного патогена. TLRs, специфичные к микробным белкам, липидам и полисахаридам (многие из которых присутствуют в клеточных стенках бактерий), локализованы на поверхностях клеток, где они распознают продукты внеклеточно расположенных микроорганизмов. Так, TLR-2 распознает несколько гликолипидов и пептидогликаны на грамположительных бактериях и некоторых паразитах; TLR-3 специфичен в отношении двухцепочечных РНК вирусов, а TLR-7 и TLR-8 специфичны к одноцепочечной РНК; TLR-4 распознает бактериальный ЛПС грамотрицательных бактерий; TLR-5 специфичен к белку бактериальных жгутиков — флагеллину. Бактериальную ДНК TLR-9 отличают по неметилированной последовательности гуанина и цитозина (GpC) (которая у млекопитающих обычно метилирована).

Активация TLRs после связывания их лиганда приводит к привлечению адаптерных белков, таких как MYD88, TIRAP, TRIF и TRAM. Далее сигналы распространяются через активацию цитозольных адаптерных белков IRAKs-TRAF6 и комплекса IKK, и это приводит к активации факторов транскрипции. К наиболее важным факторам транскрипции, которые активируются сигналами TLRs, относятся члены семейства ядерных белков NF $\kappa$ B, они способствуют экспрессии провоспалительных цитокинов и эндотелиальных молекул адгезии, играют важную роль в воспалении, а также регуляторные факторы IFN-IRF, которые стимулируют выработку противовирусных цитокинов — интерферонов I типа.

Характерной особенностью функционирования системы врожденного иммунитета является способность вовлекать в защиту «неиммунные» клетки других типов, прежде всего клетки сосудистого эндотелия, эпителия слизистых оболочек, кожи, печени. Активация этих клеток осуществляется под влиянием патогенов и провоспалительных цитокинов, секретируемых макрофагами и другими клетками врожденного иммунитета. На эндотелиальных и многих эпителиальных клетках конститутивно экспрессированы не только паттерн-распознающие рецепторы, но и рецепторы для цитокинов IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и др. Эндотелиальные и эпителиальные клетки активируются после связывания соответствующих цитокинов и приобретают некоторые черты клеток врожденного иммунитета: они экспрессируют молекулы адгезии (ICAM-1, ICAM-3, селектины и их рецепторы и др.), секретируют провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), колониестимулирующие факторы и хемокины, приобретают способность к фагоцитозу (благодаря экспрессии Fc $\gamma$ -рецепторов и рецепторов для комплемента). Когда стимуляция от клеток врожденного иммунитета прекращается, эти «неиммунные» клетки утрачивают макрофагоподобные свойства и возвращаются к своим прямым функциям.

Моноциты крови и тканевые макрофаги участвуют в противоинфекционной защите при хронических инфекционных процессах, а также при инфекциях, возбудители которых — облигатные или факультативные внутриклеточные паразиты (вирусы, хламидии, риккетсии, микоплазмы). Для этих заболеваний характерно увеличение концентрации



в крови моноцитов, возрастание их фагоцитарной активности, способности продуцировать цитокины, оксид азота, неоптерин и другие медиаторы воспаления (**табл. 7.2**).

**Таблица 7.2.** Основные заболевания и состояния, сопровождающиеся моноцитозом (количество моноцитов в крови — более  $0,75 \times 10^9/\text{л}$ )

Основные причины	Интерпретация изменений
Инфекции	Характерно для инфекций с гранулематозом (туберкулез, подострый бактериальный эндокардит, сифилис, бруцеллез, висцеральные микозы, саркоидоз, инфекционный мононуклеоз) и на фоне нейтропении
Гематологические заболевания	Миелоидная метаплазия, лейкоз, ММ, лимфома
Коллагенозы	РА, СКВ, узелковый периартериит, ПМ
Заболевания ЖКТ	Язвенный колит, региональный энтерит, тропическая энтеропатия, паразитозы
ЛС	Высокие дозы глюкокортикоидов

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.1.3. Фагоцитоз

После проникновения в ткани микроорганизмы распознаются, поглощаются и уничтожаются фагоцитами. Процесс фагоцитоза инициируется, когда определенные рецепторы на поверхности клеток врожденного иммунитета, на макрофагах, нейтрофилах и ДК взаимодействуют с поверхностью патогена. Патоген после поглощения заключается в фагосому, предназначенную для убийства и разрушения патогена. Фагоцит получает сигналы от разных рецепторов, активирующих несколько ферментов, в частности оксидазу, которая быстро формируется в мембране фагосом (преимущественно в нейтрофилах) и превращает молекулярный кислород в супероксидный анион и свободные радикалы, что вызывает окислительный (респираторный) взрыв. Свободные радикалы, АФК токсичны для поглощенных микроорганизмов. Индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) продуцируется преимущественно в макрофагах, она катализирует превращение аргинина в оксид азота, который также является микробицидным веществом. Другая группа ферментов, лизосомные протеазы, разрушают микробные белки. Эти микробицидные вещества продуцируются преимущественно в фагосомах и фаголизосомах, где они воздействуют на поглощенные бактерии, но не повреждают фагоциты. Фагосома сливается с лизосомой, содержащей десятки разнообразных ферментов, которые активируются и фрагментируют патоген. Фагоцитированный материал загружается в молекулы главного комплекса гистосовместимости (Major histocompatibility complex — МНС) I, II класса и CD-1 и экспрессируется на клеточной мембране для презентации Т-лимфоцитам с последующей индукцией адаптивного иммунитета.

Нейтрофилы, помимо уничтожения микроорганизмов путем фагоцитоза, используют еще один механизм разрушения, который направлен на внеклеточные патогены. Во время инфекции некоторые активированные нейтрофилы подвергаются самоуничтожению (особый вид программируемой клеточной гибели), в процессе которого ядерный хроматин не деградирует, как это происходит при апоптозе, а высвобождается во внеклеточное пространство и образует матрицу фибрилл, известную как внеклеточные ловушки нейтрофилов (Neutrophil extracellular traps — NETs). Это нити ДНК, содержащие гистоны и различные антимикробные белки гранул нейтрофилов. NETs захватывают микроорганизмы, которые затем могут быть более эффективно фагоцитированы другими нейтрофилами или макрофагами. Для образования внеклеточной ловушки нейтрофилов необходима генерация реактивных форм кислорода. Полагают, что NETs помогает сдерживать распространение патогена из очага воспаления. В некоторых случаях ферменты и АФК, высвобождаемые во внеклеточное пространство, могут повреждать ткани организма хозяина. По этой причине воспаление, которое обычно является защитной реакцией организма на инфекции, может также повреждать ткани.

Увеличение в крови содержания полиморфноядерных лейкоцитов и накопление юных форм этих клеток — ранняя реакция фагоцитов на инфекционные агенты. Возрастает функциональная активность, которую оценивают по фагоцитарной способности, а также по изменению активности некоторых ферментов (МПО, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) и увеличению концентрации в крови белков, продуцируемых полиморфноядерными лейкоцитами (лизоцим, прокальцитонин и др.). Полиморфноядерные лейкоциты особенно значимы в качестве антимикробных агентов при инфекциях, вызываемых бактериями и грибами, при защите от капсульных микроорганизмов и возбудителей пиогенных инфекций (**табл. 7.3**).

**Таблица 7.3.** Основные заболевания и состояния, сопровождаемые нейтрофилией (количество нейтрофилов в крови превышает  $8 \times 10^9/\text{л}$ )

Причины нейтрофилии	Интерпретация изменений
Влияние раздражителей (спорт, адреналин, анестезия, гипертермия, пароксизмальная тахикардия)	Быстрый переход гранулоцитов из краевого прилегания в циркулирующую кровь за счет нейтрофилов, расположенных маргинально вдоль стенок мелких кровеносных сосудов или секвестрированных в селезенке
Введение ядов	Связь со степенью тканевого распада
Лекарства и токсины (экстракты наперстянки,	Связь со степенью тканевого распада

свинец, ртуть, бензол)	
Введение глюкокортикоидов или их избыточная продукция в организме (болезнь Иценко–Кушинга)	Нейтрофилия — следствие перехода нейтрофилов из краевого прилегания в сосудах в циркулирующую кровь в ответ на выбросы адреналина и адренокортикоидов
Острая бактериальная инфекция	Стимуляция выброса нейтрофилов из костного мозга и их усиленная продукция
Неинфекционное воспаление (уремия, подагра)	Гранулоцитоз вторичен по отношению к воспалению, связанному в одном случае с азотемией, в другом — с отложением кристаллов солей
Злокачественные опухоли	Некроз быстрорастущих опухолей при недостаточности их кровоснабжения. Некоторые опухоли (карциномы МЖ, легких, почек, фибро- и липосаркомы) вырабатывают субстанцию, стимулирующую развитие нейтрофилии. Паранеопластический синдром при солидных опухолях может вызвать нейтрофилию за счет секреции нейтрофилстимулирующего фактора роста
Восстановление костного мозга после агранулоцитоза	Феномен превышения, характеризующийся гранулоцитозом (например, при лечении мегалобластной анемии)
Гематологические заболевания	Автономная продукция нейтрофилов
Спленэктомия	Нейтрофилия вследствие нарушения секвестрирования гранулоцитов в селезенке
Лейкемоидная реакция	Диагноз исключения. Может сопровождать острые и хронические инфекции, интоксикации, злокачественные новообразования, включая метастазы в костный мозг (карцинома МЖ и предстательной железы). Синдром Дауна может сопровождаться особой лейкомоидной реакцией, при которой картина крови и костного мозга неотличима от характерной для острого миелолейкоза

## Глава 7. Лабораторная иммунология

При дефектах развития нейтрофильных лейкоцитов меняется их содержание в крови, возникают морфологические и функциональные нарушения (**табл. 7.4**). В основе отклонений — ферментопатии, нарушение созревания клеток, синтеза адгезивных молекул, разнообразных рецепторов и др.

**Таблица 7.4.** Заболевания и состояния, сопровождающиеся нейтропенией (количество нейтрофилов в крови менее  $1,5 \times 10^9/\text{л}$ )

Причины нейтропении	Интерпретация изменений
Лекарственные препараты	Дозозависимая супрессия костного мозга (бензол, антиметаболиты, антрациклины) или идиосинкразическая реакция (анти tireоидные, противосудорожные, антигистаминные препараты, фенотиазиды, сульфаниламиды и транквилизаторы)
Ионизирующее излучение	Дозозависимая супрессия костного мозга
Вирусные инфекции	Грипп, корь, ветряная оспа, краснуха, инфекционный гепатит, ВИЧ-инфекция
Бактериальные инфекции	Тифоидная и паратифоидная лихорадка, туляремия, иногда бруцеллез, септицемия
Коллагенозы	СКВ, синдром Фелти, РА
Аутоиммунная нейтропения	Следствие образования антинейтрофильных антител
Нарушения гемопоэза	Тяжелая недостаточность витамина В <sub>12</sub> и фолиевой кислоты приводит к нарушению созревания нейтрофилов в костном мозге. В периферической крови при этом встречаются большие гиперсегментированные нейтрофилы
Заболевания крови	АА, ОЛ, МДС
Врожденная патология	Семейная нейтропения с аутосомно-доминантным типом наследования; циклическая нейтропения с неясной этиологией; хроническая идиопатическая нейтропения и синдром Костманна, при котором задерживается созревание нейтрофилов в костном мозге

Увеличение в крови количества эозинофилов и накопление продуктов их метаболизма (эозинофильный катионный белок, эозинофильные нейротоксин и пероксидаза) характерно для аллергических заболеваний, паразитарных инфекций и опухолей (**табл. 7.5**). Эозинофилы при этой патологии активно осуществляют свои эффекторные функции.

**Таблица 7.5.** Основные заболевания и состояния, при которых возможна эозинофилия (количество эозинофилов в крови превышает  $0,45 \times 10^9/\text{л}$ )

Причины эозинофилии	Комментарии
---------------------	-------------

Аллергические заболевания	Бронхиальная астма, крапивница, ринит, атопический дерматит, лекарственная аллергия, поллиноз
Инфекционные заболевания	Инфекции, сопровождаемые стимуляцией Th2-зависимого иммунного ответа: гельминтозы (аскаридоз, стронгилоидоз, трихинеллез, токсокароз, филяриоз, шистоматоз), протозоозы (вызванные только <i>Dientamoeba fragilis</i> и <i>Isospora belli</i> ), микозы (аспергиллез, кокцидиоз), вирусные инфекции (ВИЧ-инфекция)
<b>Последствия медикаментозной терапии</b>	
Генерализованные реакции	Лекарственные препараты, стимулирующие продукцию IL-3, IL-5 и гранулоцитарного и моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), усиливающие эозинофилопоз в костном мозге; нестероидные противовоспалительные препараты; антимикробные агенты; цитокины IL-2 и GM-CSF
Поражение легких	Лекарственно-индуцируемый легочный эозинофильный инфильтрат
Поражение почек	Острый интерстициальный нефрит, сопровождается эозинофилией и эозинофиурией (вызывают препараты бензатина бензилпенициллина и его производные, сульфаниламиды, рифампицин, каптоприл, аллопуринол, ципрофлоксацин и др.)
Поражение сердца	Острый некротизирующий эозинофильный миокардит может развиваться как реакция на препараты ранитидин или клозапин
Миелоидная эозинофильная лейкемия	Симптомы заболевания сходны с миелопролиферативной патологией (высокая концентрация витамина B <sub>12</sub> , спленомегалия, анемия, миелоидная дисплазия, цитогенетические нарушения)
Гиперэозинофильный синдром	Заболевание связано с дефектом генов $\alpha$ -рецептора к тромбоцит-зависимому ростовому фактору (хромосома 4) и сцепленным с X-хромосомой дефектом развития эозинофилов. Синдром диагностирован у больных с генетически опосредуемой высокой экспансией CD4 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> Th2-подобных лимфоцитов, вырабатывающих IL-5; сопровождается гематологическими нарушениями, поражением кожи, сердечно-сосудистой и нервной систем, легких и других органов
Неопластические заболевания (Т- и В-лимфомы, лимфома Ходжкина, миелоидные лейкемии, карциномы, аденокарциномы и др.)	При лимфоме Ходжкина и Т-клеточных лимфомах эозинофилия коррелирует с гиперпродукцией IL-5
Разнообразные поражения легких	Патология легких на вредных производствах сопровождается эозинофильной инфильтрацией легких и эозинофилией
Острая и хроническая эозинофильная пневмония	Неясного генеза эозинофильная инфильтрация альвеол и интерстиции легких, эозинофилия. Вызывают лекарственные препараты, аллергены, табакокурение, высокая концентрация в воздухе химических вредностей и металлов

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.1.4. Воспаление

Основной механизм противодействия врожденной иммунной системы инфекциям и повреждениям тканей состоит в стимуляции острого воспаления, проявляющегося в очаге повреждения накоплением лейкоцитов, белков плазмы и выходящей из сосудов жидкости. В обычных условиях лейкоциты и белки плазмы циркулируют в крови и рекрутируются в очаги инфекции и повреждения, где выполняют разные эффекторные функции, направленные на уничтожение микроорганизмов и репарацию тканевых повреждений. Наиболее многочисленными лейкоцитами, мигрирующими из крови в очаги острого воспаления, обычно являются нейтрофилы, однако со временем возрастает число моноцитов крови, которые в тканях превращаются в макрофаги и становятся доминирующими. Миграция фагоцитов в очаг воспаления происходит с помощью молекул адгезии: селектинов, которые экспрессированы на клетках эндотелия и захватывают нейтрофилы через молекулы сиалил-Льюис (CD15s), интегринов и хемокинов. Взаимодействие лейкоцитов с эндотелием происходит через интегрин LFA-1.

Среди наиболее важных гуморальных факторов врожденного иммунитета — белки сыворотки крови, секретов слизистых оболочек, которые синтезируются клетками иммунной системы и могут оказывать бактерицидное, опсонизирующее действие на организмы: белки комплемента, антитела и реагенты острой фазы. Поступление этих компонентов в очаг воспаления зависит от обратимых изменений кровеносных сосудов в инфицированной или пораженной ткани. Эти изменения включают усиление кровотока в тканях вследствие расширения артериол, повышение адгезивности лейкоцитов к эндотелию, повышение проницаемости капилляров и венул. Все эти изменения индуцированы цитокинами и низкомолекулярными медиаторами, первоначально образующимися в ответ на стимуляцию PAMP и DAMP резидентными клетками в тканях — тучными клетками, макрофагами

и эндотелиальными клетками. По мере развития воспалительного процесса источником медиаторов становятся вновь поступающие в очаг воспаления активированные лейкоциты.

**Противомикробные пептиды** — катионные белки, которые обладают выраженными антибактериальными свойствами к широкому спектру возбудителей. Часто их называют эндогенными антибиотиками: дефензины и кателицидины. При взаимодействии с патогеном они осуществляют быстрый иммунитет. Механизм взаимодействия обеспечивается разностью зарядов их мембран. Катионные белки, встраиваясь в мембрану микробной клетки, образуют поры, вследствие чего бактериальная клетка теряет ионы калия, аминокислоты, внутрь клетки поступает вода, обеспечивая ее гибель.

Показано, что  $\alpha$ -дефензины входят в состав азурофильных гранул нейтрофилов и обнаруживаются также в НК, макрофагах, В- и Т-лимфоцитах. Кроме того,  $\alpha$ -дефензины синтезируются клетками Панета (HD5, HD6), играя важную роль в регуляции количественного и качественного состава микробиоты кишечника.  $\alpha$ -Дефензины секретируются эпителиальными клетками ЖКТ, респираторного тракта, кератиноцитами, являясь первым барьером на пути различной инфекции. В настоящее время наиболее изучены четыре представителя  $\alpha$ -дефензинов HBD-1, HBD-2, HBD-3, HBD-4. При этом HBD-2 синтезируется эпителиоцитами слизистой желудка, бронхов, альвеол и не встречается в тканях слюнных желез, тонкой кишки, желчевыводящих путей.

В связи с увеличением резистентности бактерий к существующим антибиотикам создаются новые лекарственные вещества на основе дефензинов, которые могут использоваться для лечения различных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций.

Гликопротеины, связанные с острофазным ответом, содержащиеся в плазме, помогают распознавать PAMP и функционируют как медиаторы врожденного иммунитета, относятся к белкам острой фазы. Различные белки острой фазы повышаются с разной скоростью и на различных уровнях в ответ на повреждение тканей (например, воспаление, инфекция, злокачественная неоплазия, различные заболевания или расстройства, травма, хирургические процедуры, лекарственная реакция). Повышенный синтез этих белков происходит вскоре после травмы и инициируется и поддерживается провоспалительными цитокинами. TNF и IL-1 $\alpha$  индуцируют выработку белков острой фазы в гепатоцитах: пентраксины, например сывороточный амилоид А (SAA), сывороточный амилоид Р (SAP) и СРБ, которые выступают в роли опсонов. Эти пентраксины, связываясь с компонентами бактериальной клеточной стенки и апоптотическими клетками, усиливают фагоцитоз. TNF и IL-1 $\alpha$  также индуцируют выработку IL-6 мононуклеарными фагоцитами, эндотелиальными клетками и фибробластами, и он является еще одним мощным индуктором белков острой фазы. Более 20 белков острой фазы играют определенную роль в воспалении. Белком острой фазы, который связывается с мембраной определенных микроорганизмов и активирует комплемент, является СРБ. Реактанты острого воспаления включают компоненты комплемента (C3 и C4), фибриноген, транспортные белки, протеолитические ферменты ( $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин). Профили воспалительных изменений дают подробную информацию, но редко дают серьезные доказательства для постановки диагноза или лечения (табл. 7.6).

**Таблица 7.6.** Основное диагностическое значение белков острой фазы

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Мониторинг прогресса активности диагностированного заболевания.</li> <li><input type="checkbox"/> Оценка ответа на терапию при воспалительных заболеваниях (РА, ювенильный хронический артрит, АС, синдром Рейтера, псориатическая артропатия, васкулит, ревматическая лихорадка).</li> <li><input type="checkbox"/> Выявление осложнений известного заболевания (отложение иммунного комплекса, послеоперационная инфекция)</li> </ul> |
|---|

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Вырабатываемый печенью под контролем IL-6, СРБ является параметром воспалительной активности. Концентрация его в сыворотке крови может увеличиваться в 1000 раз при остром воспалении. Стойкое повышение СРБ также может наблюдаться при хронических воспалительных заболеваниях (аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования).

Липополисахаридсвязывающий белок (LBP) циркулирует в плазме. Он синтезируется печенью в ответ на грамотрицательные бактериальные инфекции. LBP связывается с липополисахаридом и образует комплекс с CD14, который присоединяется к TLR-4 и активирует сигнальный каскад фагоцитов. Маннозосвязывающий лектин (MBL) относится к кальцийзависимым лектинам С-типа (коллектинам), вырабатываемым печенью в ответ на инфекцию. MBL связывается с углеводными остатками маннозы и фукозы, которые экспрессируются на поверхности микробных клеток. MBL может связываться с рецептором компонента комплемента C1q на макрофагах для усиления фагоцитоза и активировать систему комплемента через лектиновый путь. Фиколины — белки плазмы, способные связываться с несколькими типами бактерий для последующей активации комплемента. Сурфактантный белок А и сурфактантный белок D являются коллектинами, экспрессируемыми в легких, могут связывать микробы и подавлять их рост. Они функционируют как опсоны, способствующие фагоцитозу альвеолярными макрофагами.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.1.5. Система комплемента

Комплемент — основной компонент врожденного иммунитета, это совокупность растворимых белков, присутствующих в крови и других жидкостях организма. Система комплемента состоит из более чем 30 различных белков, которые вырабатываются преимущественно печенью. В отсутствие инфекции эти белки циркулируют в неактивной форме. В присутствии патогенов или антител, связанных с патогенами, система комплемента активируется. Отдельные белки комплемента взаимодействуют друг с другом, образуя несколько разных путей

активации комплемента, каждый из которых в конечном итоге приводит к уничтожению патогена либо напрямую, либо путем облегчения его фагоцитоза и индукции воспалительных реакций, которые помогают бороться с инфекцией. Существует три пути активации комплемента: классический, альтернативный и лектиновый.

При классическом пути компонент комплемента C1 присоединяется к антителам классов IgM, IgG1 или IgG3, связавших антигены на поверхности микроорганизмов. Активированные компоненты C1 последовательно присоединяют компоненты комплемента C4b и C2b, которые образуют C3-конвертазу. C3-конвертаза расщепляет C3, образуя C3b. C3b ковалентно связывается с C4b2b, образуя C5-конвертазу. Затем C5-конвертаза активирует поздние стадии активации комплемента, что приводит к образованию комплекса мембранной атаки (МАС), включающего C5b–C9, который направлен на повреждение клеточных мембран и, соответственно, цитолиз.

Лектиновый путь активируется маннансвязывающим лектином MBL или фиколинами, связывающимися с микробными поверхностями. Затем MBL связывается с MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP)-1, -2 и -3, которые расщепляют C4 и C2 для активации каскада комплемента, как в классическом пути активации комплемента. Альтернативный путь инициируется небольшими количествами C3b, которые спонтанно образуются в плазме. Обычно C3b, который остается не связанным с поверхностью бактериальной клетки, быстро гидролизует и инактивируется. C3b, связанный с микробом, становится сайтом связывания, что приводит к образованию C3-конвертазы, которая активирует более поздние стадии активации комплемента, как в классическом пути.

Компоненты комплемента также функционируют как опсоины. Бактерии, покрытые C3-компонентом комплемента, могут подвергаться фагоцитозу через рецепторы комплемента на фагоцитах (CR3). На систему комплемента влияют регуляторные белки, подавляющие его действие: ингибитор C1-эстеразы, пропердин, фактор H, фактор I, CD55 и CD59 и др. Некоторые протеолитические фрагменты белков системы комплемента, особенно C3a и C5a, являются хемоаттрактантами лейкоцитов (главным образом нейтрофилов и моноцитов), а также активаторами эндотелиальных и тучных клеток, способствуя перемещению лейкоцитов и белков плазмы в ткани на участке активации системы комплемента при воспалении.

Система комплемента может вызывать значительное повреждение тканей в ответ на аномальные стимулы.

Биологические эффекты активации комплемента могут проявляться как реакция на персистирующую инфекцию или ответ аутоантител на собственные антигены. При этих инфекционных или аутоиммунных состояниях воспалительные или литические эффекты комплемента могут вносить значительный вклад в патологию заболевания. Активация комплемента связана с внутрисосудистым тромбозом. Уровни комплемента могут быть ненормальными при определенных болезненных состояниях, таких как РА и СКВ, а также при некоторых генетических нарушениях. Врожденные или приобретенные дефекты синтеза отдельных компонентов комплемента характеризуются высокой чувствительностью к пиогенным и капсульным инфекциям и склонностью к возникновению аутоиммунных заболеваний. Аутоиммунные заболевания при дефиците компонентов C4, C2 и C3 развиваются из-за нарушения выведения из циркуляции иммунных комплексов, в том числе комплексов «аутоантиген–аутоантитело» (табл. 7.7). Повышенная активность комплемента, обусловленная количественными и качественными дефектами ингибитора первого компонента комплемента (C1inh), проявляется развитием ангионевротического отека, решающим фактором в патогенезе которого является гиперактивация анафилотоксинов C3a и C5a.

**Таблица 7.7.** Заболевания, ассоциирующиеся с недостаточностью белков системы комплемента и их рецепторов

Белки	Клинические проявления
Clq	СКВ и сходные синдромы, уртикарные васкулиты
Clr–Cls	СКВ и сходные синдромы, васкулиты
C2	СКВ и сходные синдромы, гломерулонефриты, дерматиты, васкулиты
C3	Аутоиммунные гломерулонефриты, коллагенозы, рецидивирующие пиогенные инфекции
C4	СКВ и сходные синдромы
C5	Частые нейссерияльные инфекции, СКВ и сходные синдромы
C6; C7; C8; C9	Рецидивирующие нейссерияльные инфекции
Пропердин	Рецидивирующие пиогенные инфекции, молниеносное течение менингококкового сепсиса
Фактор D	Рецидивирующие пиогенные инфекции
C1inh	Псевдоаллергический ангионевротический отек, склонность к аутоиммунным заболеваниям
Фактор H	СКВ и сходные синдромы, гломерулонефриты
Фактор I	Рецидивирующие пиогенные инфекции и синдромы, подобные СКВ
DAF; HRF; CD59	Гемолиз
CR1	СКВ и сходные синдромы
CR3	Позднее отпадение пупочного канатика, рецидивирующие пиогенные инфекции, лейкоцитоз

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.1.6. Врожденные лимфоидные клетки

Особый интерес в реализации иммунного ответа и в патогенезе различных заболеваний вызывают ILC, которые происходят от общего лимфоидного предшественника. К ним относятся, помимо хорошо известных NK, клетки-индукторы лимфоидной ткани — ILC1, ILC2, ILC3, а также и LTi. Разделение ILC на группы основано на экспрессии транскрипционных факторов, функционирующих в этих клетках, и спектре секретируемых цитокинов. Обнаружено,

что при повреждении тканей из-за проникновения патогенов ИЛС регулируют клетки врожденного и адаптивного иммунитета, секретируя цитокины. ИЛС локализуются в тканях и редко выявляются в крови. Особенно многочисленно представлены ИЛС в слизистых. От других иммунных клеток ИЛС можно отличить по отсутствию антигенных рецепторов, подобных Т- и В-клеточным рецепторам, а также наличию фенотипических маркеров, присущих ДК или клеткам миелоидного ряда.

ИЛС вносят вклад в защиту от патогенной бактериальной инфекции на ранней ее стадии, быстро реагируя на патогены, а также управляя другими иммунными клетками. Активность ИЛС стимулируется цитокинами, которые продуцируются поврежденными эпителиальными и другими клетками на участках инфекции.

**НК-клетки** — основные клетки иммунобиологического надзора, нацелены на уничтожение вирусинфицированных и опухолевых клеток до формирования адаптивного иммунного ответа. НК-клетки проявляют врожденную киллерную активность, не имея специфических рецепторов к антигенам, и активируются сигналами от рецепторов с противоположными функциями (ингибирующей и активирующей), которые взаимодействуют с соответствующими лигандами на клетках-мишенях. КIR распознают молекулы МНС I на поверхности собственных здоровых клеток, что не вызывает «подозрений» со стороны НК-клеток. В том случае, когда экспрессия МНС I снижена или отсутствует, что свидетельствует об инфицировании или трансформации клетки, индуцируются активирующие рецепторы НК-клеток, и «профессиональные убийцы» начинают продуцировать цитокины и литические вещества, убивающие клетки-мишени. НК-клетки реализуют эффекторные функции при соблюдении двух условий: утери клеткой МНС I и экспрессии ею же стресс-индуцированных лигандов. Таким образом, механизм активации НК-клеток подчинен «гипотезе потери своего». Здоровые клетки такие лиганды не экспрессируют и не теряют МНС I, что предохраняет их от атаки НК-клеток. Как правило, ингибирующие сигналы доминируют над активирующими эффектами, предотвращая спонтанную активацию НК-клеток. НК-клетки секретируют цитокины, в частности IFN $\alpha$ , который стимулирует макрофаги для уничтожения фагоцитированных микроорганизмов, что также способствует ранней защите от внутриклеточных патогенов. Линейными маркерами для НК-клеток служат CD16, CD56; для NK субпопуляций — CD2, CD8, CD57.

Содержание CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> классических НК-клеток у взрослых составляет 0,07–0,48×10<sup>9</sup>/л. Дефицит содержания или функциональная несостоятельность НК-клеток характеризуются высокой чувствительностью человека к вирусам и тяжестью течения таких вирусных инфекций, как ЦМВ, опоясывающий лишай, простой герпес, инфекционный мононуклеоз и др.

**ИЛС1-клетки**, так же как НК-клетки, характеризуются продукцией IFN $\alpha$  в ответ на ИЛ-12 и ИЛ-18, секретируемые ДК и макрофагами под влиянием патогенов. ИЛС1 преимущественно локализуются в барьерных тканях, значительно меньше — в крови и селезенке. НК-клетки подвижны, тогда как клетки ИЛС1 стационарны и локализуются в тех участках ткани, которые они заселяют в процессе эмбриогенеза. Клетки ИЛС1 функционально подобны клеткам Th1-типа. Не имея цитолитических гранул, характерных для НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, они, как и Th1, участвуют в клиренсе внутриклеточных патогенов, главным образом посредством активации макрофагов путем секреции IFN $\alpha$ . За счет продукции ИЛ-12 и ИЛ-18 макрофаги и ДК могут быстро индуцировать выработку ИЛС1 клетками IFN $\alpha$ , который способствует уничтожению внутриклеточных патогенов в барьерных тканях, таких как ЖКТ и дыхательные пути, за несколько дней до реализации реакций адаптивного ответа со стороны Th.

**ИЛС2-клетки** локализуются в тканях слизистой оболочки и активируются тимическим стромальным лимфопоэтином, а также ИЛ-33 и ИЛ-25, которые вырабатываются в ответ на *паразитарные инвазии*. Предполагается, что активация клеток ИЛС2 различна в разных тканях. TSLP и ИЛ-33 продуцируются эпителиальными и стромальными клетками и макрофагами, которые распознают общие для гельминтов молекулярные структуры (хитин, полисахаридный полимер). ИЛ-33 — алармин, который высвобождается при гибели клеток, из чего следует, что важным индуктором ответа ИЛС2 является еще и повреждение тканей. Основным источником ИЛ-25 являются специализированные секреторные эпителиальные клетки, обнаруженные в тканях слизистой оболочки. Активированные ИЛС2-клетки производят большое количество ИЛ-13, который стимулирует выработку слизи бокаловидными клетками эпителия и сокращение гладких мышц слизистой оболочки, что способствует изгнанию гельминтов. ИЛС2-клетки вырабатывают также ИЛ-5, активирующий эозинофилы, которые могут убивать гельминты. ИЛС2 экспрессируют характерные поверхностные маркеры CRTH2, KLRG1, SST2, CD161 и CD25 и рецепторы к хемокинам, что обеспечивает перемещение в разные ткани организма.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**ИЛС3-клетки** играют решающую роль в ранней защите барьерных тканей от бактерий и грибов. Подобно клеткам Th17, клетки ИЛС3 чувствительны к ИЛ-23 и ИЛ-1 $\alpha$ ; эти цитокины вызывают выработку ИЛ-17 и ИЛ-22. ИЛ-17 — провоспалительный цитокин, который действует на стромальные, эпителиальные и миелоидные клетки, стимулируя выработку других провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-1 $\alpha$ , гемопоэтических факторов роста (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор — G-CSF и гранулоцитарный и моноцитарный колониестимулирующий фактор — GM-CSF) и хемокинов, которые рекрутируют нейтрофилы и моноциты. ИЛ-17 и ИЛ-22 действуют на эпителиальные клетки тканей слизистых оболочек и кожи, индуцируя выработку ими антимикробных пептидов, а ИЛ-22 способствует усилению целостности барьера. Как и в случае с другими ИЛС, цитокины, продуцируемые клетками ИЛС3, действуют опосредованно через ИЛ-6 и ИЛ-1 $\alpha$ , усиливая ответы Th17 за счет увеличения локальной продукции ИЛ-23 и ИЛ-1 $\alpha$ . Описана роль ИЛС3-клеток в развитии астмы, хронической обструктивной болезни легких, фиброза легких и кистозного фиброза.

**ИЛТ1-клетки** — индукторы лимфоидной ткани, во взаимодействии со стромальными клетками играют важную роль в формировании и развитии вторичных лимфоидных органов в период эмбриогенеза, а также в развитии иммунного ответа взрослого организма под влиянием ретиноевой кислоты, CXCL13, RANK-L и ИЛ-1, ИЛ-23 и ИЛ-6.

Транскрипционный фактор ROR $\alpha$ t регулирует дифференцировку LTi-клеток. LTi-клетки индуцируют экспрессию генов *AIRE* (autoimmune regulator), что содействует дифференцировке эпителиальных клеток тимуса в эмбриогенезе. LTi экспрессируют c-Kit, CCR6, CD25, CD127 и CD90, а также CD4. Маркером LTi у человека может служить экспрессия OX40L. Активированные LTi-клетки продуцируют преимущественно IL-17A, IL-17F и IL-22.

Клетки врожденного иммунитета, в частности NK, макрофаги и ILC, способны эффективнее развивать иммунный ответ после повторного контакта с тем же патогеном (так называемый тренированный иммунитет), который проявляется повышенной экспрессией молекул МНС и продукцией цитокинов, что свидетельствует о феномене локальной врожденной иммунной памяти. В частности, показано, что респираторная вирусная инфекция индуцирует альвеолярные макрофаги долговременной памяти с устойчивыми изменениями поверхностных маркеров, экспрессией генов, метаболизма и антимикробной чувствительности, а при повторной стимуляции продуцируют дополнительно хемокины для нейтрофилов. Поддержание памяти альвеолярных макрофагов связано с секрецией IFN $\alpha$  эффекторными CD8-Т-клетками слизистой оболочки дыхательных путей на ранней стадии противовирусных реакций. Очевидно, что врожденная иммунная память может возникать и поддерживаться локально за счет долгоживущих резидентных макрофагов до тех пор, пока инициирующее повреждение не перестанет представлять опасность для организма. Наивные NK-клетки могут дифференцироваться и превращаться в NK-клетки памяти с увеличенной продолжительностью жизни и эффекторными функциями тремя основными путями: 1) антиген-специфической стимуляцией; 2) стимуляцией, вызванной ЦМВ, возможно, с помощью NKG2C; 3) стимуляцией, вызванной цитокинами. Формирование у ILC функции, подобной проявлениям иммунологической памяти, реализуется стимуляцией экспрессии рецепторов цитокинов, несмотря на отсутствие у них антиген-специфических рецепторов.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.1.7. Цитокины

Цитокины — полипептидные продукты активированных клеток, которые контролируют различные клеточные реакции и регулируют иммунный ответ. Цитокины обладают широким спектром действия. Большинство цитокинов действуют на соседние клетки или на клетки, которые их продуцируют, но некоторые (например, IL-1) оказывают системное действие. При врожденном иммунитете цитокины опосредуют ранние воспалительные реакции на микроорганизмы и стимулируют адаптивные иммунные процессы. При адаптивном иммунитете цитокины стимулируют пролиферацию и дифференцировку антиген-специфических лимфоцитов и активируют специализированные эффекторные клетки (например, макрофаги).

При врожденных иммунных реакциях цитокины TNF, IL-1, IL-12, IFN I типа, IFN $\alpha$  и хемокины быстро вырабатываются после встречи с патогеном и действуют, вызывая воспаление и противовирусный ответ. Основными источниками этих цитокинов являются макрофаги, DC, ILC и NK-клетки, но также могут их продуцировать эндотелиальные клетки и эпителиоциты. Ранний этап воспаления индуцируется цитокинами IL-1, TNF, IL-6, IL-18, IL-33 (табл. 7.8).

Глава 7. Лабораторная иммунология

Таблица 7.8. Цитокины врожденного иммунитета, их мишени и функции

Цитокин	Главные клеточные источники	Главные клеточные мишени и биологические эффекты
TNF	Макрофаги, Т-клетки, тучные клетки	Эндотелиальные клетки: активация (воспаление, свертывание крови). Нейтрофилы: активация. Гипоталамус: лихорадка. Печень: синтез белков острой фазы. Мышцы, жировая ткань: катаболизм. Многие типы клеток: апоптоз
IL-1	Макрофаги, ДК, эндотелиальные клетки, некоторые эпителиальные клетки, тучные клетки	Эндотелиальные клетки: активация (воспаление, свертывание крови). Гипоталамус: лихорадка. Печень: синтез белков острой фазы. Т-клетки: дифференцировка Th17
Хемокины	Макрофаги, ДК, эндотелиальные клетки, Т-лимфоциты, фибробласты, тромбоциты	Лейкоциты: увеличение аффинности интегринов, хемотаксис, активация
IL-12	ДК, макрофаги	NK- и Т-клетки: продукция IFN, повышение цитотоксической активности Т-клеток: дифференцировка в Th1-клетки
IFN $\alpha$	NK- и Т-лимфоциты	Активация макрофагов. Стимуляция антительного ответа
IFN I типа (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ )	IFN $\alpha$ : ДК, макрофаги.	Все клетки: противовирусное состояние, повышение экспрессии МНС I класса.

	IFN $\alpha$ : фибробласты, эпителиальные клетки	NK-клетки: активация
IL-10	Макрофаги, ДК, Т-клетки	Макрофаги и ДК: подавляется продукция цитокинов, в том числе хемокинов, редуцируется экспрессия костимуляторных молекул и МНС II класса
IL-6	Макрофаги, эндотелиальные клетки, Т-клетки	Печень: синтез белков острой фазы. В-клетки: пролиферация в антителопродуцирующие клетки
IL-15	Макрофаги, другие	NK-клетки: пролиферация. Т-клетки: пролиферация
IL-18	Макрофаги	NK-клетки и Т-клетки: синтез IFN $\alpha$
Трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ )	Многие типы клеток	Ингибирование воспаления. Т-клетки: дифференцировка Th17, регуляторных Т-клеток

Примечание. IFN $\alpha$  и TGF $\beta$  являются цитокинами как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Цитокины трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ) и IL-10 и IL-35 регулируют иммунные реакции путем их ограничения. Компартменты гемопоэтических тканей регулируются сложной сетью взаимодействующих цитокинов. Колонистимулирующие факторы роста (CSF) и IL имеют определяющее значение в нормальной пролиферации, дифференцировке и активации гемопоэтических и лимфоидных клеточных линий.

**Цитокины** играют важную роль в нормальном иммунном ответе, но резкое высвобождение цитокинов в высоких концентрациях может вызвать цитокиновый «шторм» с тяжелыми последствиями: например, более высокие уровни цитокина IL-6 были связаны с риском смерти при инфекции второго коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 — SARS-CoV-2). Если развивается цитокиновый «шторм», могут произойти серьезные повреждения, потому что организм начинает атаковать свои собственные клетки и ткани вместо того, чтобы просто бороться с вирусом. Цитокиновый «шторм» может возникать при различных инфекционных и неинфекционных заболеваниях (например, аутоиммунных заболеваниях, ювенильном артрите, некоторых видах иммунотерапии рака, болезни «трансплантат против хозяина» и различных вирусных инфекциях). Цитокиновый ответ на инфекцию SARS-CoV-2 примерно в 50 раз выше, чем в ответ на инфекции, вызванные вирусом Зика или вирусом Западного Нила. Пневмоциты II типа в альвеолярных стенках легких приводят к дыхательной недостаточности, сепсису и цитокиновому шторму. Интенсивность воспалительной реакции в легких отражает баланс между провоспалительными цитокинами (например, TNF и IL-1 $\alpha$ ) и их растворимыми рецепторами или ингибиторами. Острое повреждение легких является распространенным следствием цитокинового шторма в альвеолярной среде легких и системном кровообращении.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**Интерфероны (IFN)** представляют собой семейство цитокинов с противовирусной, антипролиферативной и противоопухолевой активностью. IFN оказывают также влияние на врожденные и адаптивные иммунные реакции. Различают IFN I, II и III типа.

*IFN I типа* — это функционально и генетически схожие цитокины, которые объединяются в субсемейства  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ . Они обладают общими биологическими свойствами и осуществляют: 1) прямое противовирусное действие за счет индукции соответствующих генов; 2) активируют функции NK-клеток; 3) усиливают экспрессию молекул МНС I класса, повышающих презентацию антигенов цитотоксическим Т-лимфоцитам; 4) содействуют дифференцировке, усиливают киллерную активность CD8 $^{+}$  Т-лимфоцитов; 5) подавляют супрессорное действие FoxP3 $^{+}$  Т-регуляторных лимфоцитов.

Индукторами IFN I типа являются РНК вирусов, действующая соответственно через TLR-3, комбинацию TLR-7/TLR-8, а также бактериальная ДНК, содержащая неметилованные мотивы CpG, служащие лигандом для TLR-9. Вызывать выработку IFN I типа могут некоторые бактериальные молекулы, в частности ЛПС, рецептором для которого служит комплекс TLR4/CD14. Другим стимулятором продукции IFN I типа являются NETs, образующиеся в результате суицидальной гибели нейтрофильных клеток, называемой нетозом.

Для реализации противовирусного действия IFN необходима экспрессия интерферон-стимулированных генов (Interferon-stimulated gene — ISG), которые проявляют широкий спектр активности. Многие ISG контролируют вирусную, бактериальную и паразитарную инфекции. Обладая общими биологическими свойствами, они связываются с рецептором IFN I типа. В результате сигнализации от рецептора IFN I типа транскрибируется более 300 ISG, продукты которых действуют на блокирование всех стадий жизненного цикла патогенов. У вирусов подавляются прикрепление, проникновение в клетку, трансляция вирусных белков, репликация, сборка и высвобождение в окружающую среду. Разрушение и блокирование вирусных РНК и ДНК происходит под воздействием эндонуклеаз и клеточных белков. Дополнительные ISG кодируют проапоптотические белки, приводящие при определенных условиях к гибели клеток. Наиболее изученными продуктами ISG, обладающими антивирусными свойствами, являются 2'-5'-олигоденилатсинтаза (OAS), рибонуклеаза L (RNазa L) и протеинкиназа (PKR), которые, действуя совместно, приводят к деградации вирусной РНК в цитозоле зараженной клетки.

Источниками IFN I типа являются в первую очередь плазматоцитодные ДК, а также моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки, фибробласты, а при вирусной инфекции — все инфицированные ядросодержащие клетки.



*IFN III типа* имеют гомологию с генами цитокинов семейств IFN I типа и IL-10. Эти цитокины были названы IL-28A (IFN $\beta$ 3), IL-28B (IFN $\beta$ 1) и IL-29 (IFN $\beta$ 2) из-за их взаимодействия с рецепторами IL-28R $\alpha$  (IFN $\beta$ R1), IL-10R2 субъединицы рецептора IL-10. Проведение внутриклеточного сигнала от указанных рецепторов сходно с таковым IFN I типа. Продукция IFN III типа индуцируется поступлением сигналов от внутриклеточных рецепторов RLR и TLR, от ДНК-сенсора Ku70, а также от митохондриального антивирусного сигнального протеина (MAVS), локализованного во внешней мембране митохондрий и пероксисом. Вирусная инфекция может индуцировать экспрессию IFN III типа в разных клетках, но наибольшую способность проявляют активированные клетки слизистых оболочек. Врожденный иммунный ответ, опосредованный IFN I и III типа, контролируется определенными генами и обеспечивает эффективную защиту не только против вирусов, но и против внутриклеточных бактерий и паразитов. **Хемокины** обеспечивают направленное движение клеток в зону воспаления для реализации их функций (табл. 7.9). Клеточный состав воспалительного инфильтрата зависит от типов хемокинов, участвующих в процессе. При бронхиальной астме хемокины MCP-1, MCP-4, MIP-1 $\alpha$ , RANTES привлекают в бронхиолы эозинофилы, Т-клетки, базофилы, моноциты, которые поддерживают локальное воспаление. Хемокин IL-8 осуществляет целенаправленную миграцию нейтрофилов из сосудов в зону взаимодействия макрофагов с патогеном. Таким образом, клеточные и гуморальные факторы врожденного иммунитета быстро и эффективно распознают и элиминируют патогены бактерий. В алгоритм иммунного ответа включен переход от реакций врожденного иммунитета к вовлечению специфического адаптивного ответа при недостаточной эффективности врожденных факторов.

**Таблица 7.9.** Направленная миграция клеток в зону воспаления под влиянием хемокинов

Воспалительные заболевания	Инфильтрат	Хемокины
Острый респираторный дистресс-синдром	Нейтрофилы	IL-8, GRO $\alpha$ , ENA 78
Астма	Эозинофилы, Т-лимфоциты, моноциты, базофилы	MCP-1, MCP-4, MIP-1 $\alpha$ , RANTES
Бактериальная пневмония	Нейтрофилы	IL-8, ENA 78
Саркоидоз	Моноциты, Т-лимфоциты	IP-10
Гломерулонефриты	Моноциты, Т-лимфоциты, нейтрофилы	MCP-1, RANTES, IP-10
РА	Моноциты, нейтрофилы	MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8, ENA 78
Атеросклероз	Т-лимфоциты, моноциты	MCP-1, MCP-4, IP-10
Синдром раздраженной кишки	Моноциты, нейтрофилы, Т-лимфоциты, эозинофилы	MCP-1, MCP-4, MIP-1 $\alpha$ , IP-10, IL-8
Псориаз	Т-лимфоциты, нейтрофилы	MCP-1, IP-10, MIG, GRO $\alpha$ , IL-8
Бактериальные менингиты	Нейтрофилы, моноциты	IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$
Вирусные менингиты	Т-лимфоциты, моноциты	MCP-1, IP-10

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.2. Приобретенные (адаптивные) реакции иммунитета

Адаптивная иммунная система состоит из Т- и В-лимфоцитов, способных распознавать множество антигенов и обеспечивать высокоспецифичный эффективный ответ, направленный на их элиминацию. Система В-лимфоцитов развивает гуморальный иммунитет путем продукции антител для защиты от внеклеточных патогенов. Зависимый от Т-лимфоцитов клеточно-опосредованный иммунитет направлен против внутриклеточных патогенов, который реализуется посредством киллерных реакций против зараженных и опухолевых клеток. Т- и В-лимфоциты выявляются в кровотоке, лимфоидных органах и тканях. Лимфоциты развиваются из лимфоидных предшественников в генеративных (центральных) лимфоидных органах: Т-лимфоциты созревают в тимусе, В-лимфоциты — в костном мозге. Каждый Т- или В-лимфоцит формирует клон, представители которого экспрессируют специфичные рецепторы только к одной или двум антигенным детерминантам. Общая популяция лимфоцитов, насчитывающая у человека около 500 млрд, может распознавать любые антигенные эпитопы в окружающей среде и внутренней среде организма. Такое огромное разнообразие рецепторов антигена кодируется случайно формирующимися генетическими рекомбинациями исходных — зародышевых — генов с образованием функциональных генов рецепторов. Антигенсвязывающий участок TCR состоит из  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепей, входящих в состав комплекса TCR, что обеспечивает распознавание антигена. Для внутриклеточной передачи сигнала необходимы также активация корецепторов, костимулирующих и других молекул. Рецепторы к антигенам на В-лимфоцитах представлены антителами и совместно со вспомогательными сигнальными молекулами образуют В-клеточный рецепторный комплекс (BCR). Зрелые Т- и В-лимфоциты циркулируют через периферические лимфоидные органы — ЛУ, селезенку, а также через слизистые оболочки и ткани и могут оставаться в них на определенное время. Иммунная система устроена так, что клетки иммунной системы имеют доступ к антигену, проникшему в любой участок организма. Клетки врожденного иммунитета располагаются в пограничных тканях и непосредственно распознают и реагируют на чужеродный материал. Для антиген-специфических лимфоцитов необходимо чтобы антиген с током лимфы был принесен в регионарный ЛУ, где непосредственно связывается с В-лимфоцитами в фолликулярных зонах. ДК, захватив чужеродный материал из пограничных тканей, также с током лимфы поступают в регионарный ЛУ (Т-зависимую

зону), где презентуют Т-лимфоцитам антигенные детерминанты. Это взаимодействие активирует антиген-специфические Т-лимфоциты и вызывает их дифференцировку. Лимфоциты в течение своей жизни могут пройти этапы развития от наивных клеток, экспрессирующих рецепторы, но не контактировавших с антигеном, до эффекторных лимфоцитов, индуцированных взаимодействием с антигеном с последующей активацией и реализацией эффекторных функций, или до клеток иммунной памяти, которые сохраняются достаточно долго, чтобы и после повторного контакта с антигеном развить вторичный иммунный ответ быстрее, сильнее и специфичнее. Общее количество лимфоцитов в крови может существенно меняться в зависимости от патологии (**табл. 7.10**).

В норме в крови взрослых людей лимфоцитов циркулирует  $1,0-4,5 \times 10^9/\text{л}$ .

**Таблица 7.10.** Заболевания и состояния, сопровождаемые лимфоцитозом

Основные причины лимфоцитоза	Интерпретация изменений
Вирусные инфекции	Респираторные вирусы. Инфекционный гепатит. Лимфоцитоз часто определяют при инфекциях, вызываемых ВЭБ, простым герпесом 2-го типа, краснухой, аденовирусом и ЦМВ
Бактериальные инфекции	Лимфоцитоз наблюдают при коклюше, хронических инфекциях (туберкулезе, бруцеллезе)
Заболевания крови	Лимфаденопатия и спленомегалия сопровождают лимфому, ХЛЛ, ВКЛ
Посттрансфузионный синдром	Сопровождают лихорадка и спленомегалия. Причиной этого синдрома считают ЦМВ, передающийся через лейкоциты донорской крови

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.2.1. Т-лимфоциты

Основная часть Т-клеток формируется в тимусе из стволовых лимфоидных клеток, затем они дифференцируются в периферических лимфоидных органах в эффекторные клетки в ответ на антиген и содействуют синтезу антител В-клетками, воспалительным и супрессорным процессам. В тимусе происходит формирование Т-клеточных антигенсвязывающих рецепторов с широким спектром распознавания антигенов. В результате рекомбинаций зародышевых генов в каждом Т-лимфоците образуется уникальное сочетание генов, контролирующих экспрессию рецептора, способного распознавать собственные молекулы МНС I и II класса со средней степенью аффинности, что позволяет им выживать в процессе позитивной селекции. Тимоциты, несущие высокоаффинные рецепторы к аутоантигенам, как правило, уничтожаются апоптозом в процессе негативной селекции, поскольку представляют потенциальную угрозу развития аутоиммунных реакций. В то же время поддержание толерантности к собственным антигенам требует формирования регуляторных механизмов, контролирующих индукцию аутоиммунных процессов на периферии. Поэтому в тимусе в процессе негативной селекции под влиянием антиапоптотических белков часть аутореактивных Т-лимфоцитов выживает, в них экспрессируются высокоаффинный рецептор к ростовому цитокину IL-2 — CD25 (IL-2R $\alpha$ ) и транскрипционный фактор FoxP3, в результате чего они приобретают регуляторные (супрессорные) функции.

**Т-хелперы (Th)** (от англ. helper — помощник) — Т-лимфоциты, главной функцией которых является усиление адаптивного иммунного ответа. Активируют Т-киллеры, В-лимфоциты, моноциты, НК-клетки при прямом контакте, а также гуморально, выделяя цитокины. Основным признаком Th служит наличие на поверхности клетки молекулы корцептора CD4. Th распознают антигены при взаимодействии их TCR с антигеном, связанным с молекулами МНС II класса.

CD4+ Th-лимфоциты подразделяются на несколько субпопуляций в зависимости от экспрессии транскрипционных факторов, продуцируемых цитокинов и других молекул.

**Т-хелперы I типа (Th1)** дифференцируются под влиянием IL-12 и IFN $\gamma$ , экспрессируют транскрипционный фактор Tbet, в основном секретируют цитокин IFN $\gamma$ , который является мощным активатором макрофагов, натуральных и Т-киллеров. В свою очередь, активированные макрофаги M1-типа секретируют провоспалительные цитокины, в частности IL-1 $\alpha$  и TNF, синтезируют антимикробные вещества, что приводит к уничтожению фагоцитированных микроорганизмов.

**Т-хелперы II типа (Th2)** дифференцируются под влиянием IL-2 и IL-4, экспрессируют транскрипционный фактор GATA-3, продуцируют IL-4, IL-5, IL-13. IL-4 стимулирует В-клетки к дифференцировке в антителосекретирующие ПК и индуцирует «альтернативный» путь активации макрофагов M2-типа, который связан с восстановлением тканей и фиброзом; IL-5 активирует эозинофилы для уничтожения гельминтов; IL-13 стимулирует эпителиальные клетки слизистой оболочки к выделению слизи.

**Th17** дифференцируются под влиянием IL-6 и TGF $\beta$ , IL-21, IL-23, экспрессируют транскрипционный фактор ROR $\gamma$ t, производят IL-17, IL-21, IL-23, рекрутируют нейтрофилы и моноциты для организации хронического воспаления, направленного на уничтожение внеклеточных бактерий и грибов.

**Фоликулярные Т-хелперы (Tfh)** дифференцируются под влиянием цитокинов IL-6 и IL-21, экспрессируют транскрипционный фактор Bcl-6, производят IL-4 IL-21 в герминативном центре, под влиянием которых высокоаффинные В-лимфоциты трансформируются в В-клетки памяти и долгоживущие ПК иммунной памяти.

**Т-киллеры** (от англ. killer — «убийца») — цитотоксические Т-лимфоциты, главной функцией которых является уничтожение поврежденных клеток собственного организма. Мишени Т-киллеров — инфицированные или опухолевые клетки, несущие антигены в комплексе с молекулами HLA I класса. Т-киллеры являются главным компонентом антивирусного иммунитета. Основным признаком Т-киллеров служит наличие на поверхности клетки

молекулы корцептора CD8. Т-киллеры распознают антигены при взаимодействии их TCR с антигеном, связанным с молекулами МНС I класса. Основным механизмом уничтожения Т-киллерами обусловлен распознаванием зараженных или опухолевых клеток, введением в мишень протеаз гранзимов, которые активируют эндонуклеазу, индуцирующую апоптоз.

Th и Т-киллеры образуют группу эффекторных Т-лимфоцитов, непосредственно ответственных за иммунный ответ. В то же время существует другая группа клеток, регуляторные Т-лимфоциты, функция которых заключается в регулировании активности эффекторных Т-лимфоцитов. Модулируя силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию активности Т-эффекторных клеток, регуляторные Т-клетки поддерживают толерантность к собственным антигенам организма и предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний. Существуют несколько механизмов супрессии: прямой, при непосредственном контакте между клетками, и дистантный, осуществляющийся на расстоянии, например через растворимые цитокины.

Небольшая популяция Т-лимфоцитов, экспрессирующая маркеры как Т, так и NK-клеток, — NKT-клетки — могут распознавать микробные гликолипиды независимо от комплекса МНС в составе молекул CD1, что выполняет защитную роль при инфекции.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Т-клетки являются основной популяцией в периферической крови, составляют 60–70% общего числа лимфоцитов. Субпопуляции Т-лимфоцитов хелперов/регуляторов маркируются корцепторными молекулами CD4+ или CD8+ на цитотоксических Т-лимфоцитах. CD4 экспрессируются на 50–60% Т-клеток, тогда как CD8 — примерно на 30% Т-лимфоцитов, число NKT-клеток составляет менее 1%.

Для индукции иммунного ответа цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты распознают пептиды на поверхности антигенпрезентирующих клеток в комплексе с МНС I класса, активируются и размножаются (клонировать). При контакте с инфицированными или опухолевыми клетками они активируются и убивают их. Хелперные/регуляторные CD4+ Т-клетки распознают пептиды, представленные антигенпрезентирующими клетками в составе молекул МНС II класса, клонируют и секретируют цитокины, которые участвуют в реализации различных механизмов иммунитета.

**Т-регуляторные клетки (Treg)** дифференцируются под влиянием IL-2 и TGF $\beta$ , экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3, синтезируют супрессирующие цитокины IL-10, IL-35 и TGF $\beta$ , обладают регуляторными функциями, ограничивая иммунный ответ на различных стадиях его развития, поддерживают иммунную толерантность.

Индукцированные Т-регуляторные клетки (iTreg) дифференцируются под воздействием антигенпрезентирующих клеток, клонируют и подавляют избыточную активность иммунной реакции. Они могут иметь фенотип CD4+CD25+Foxp3+ или CD8+CD25+Foxp3+. Экстратимическое развитие CD4+ iTreg и CD8+ iTreg может быть вызвано множеством условий, таких как персистенция патогена и аутоантигена, высокие концентрации TGF $\beta$ , IL-10 и др.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.2.2. В-лимфоциты

В-лимфоциты дифференцируются в костном мозге и реализуют адаптивный гуморальный иммунитет путем синтеза антител. Популяция В-клеток составляет 10–20% циркулирующих в периферической крови лимфоцитов, что соответствует  $0,11-0,57 \times 10^9/\text{л}$ . Они также присутствуют в костном мозге и в фолликулах периферических лимфоидных органов. В-клетки распознают антиген с помощью мембраносвязанных антител класса IgM, экспрессируемого на поверхности вместе с сигнальными молекулами, которые образуют комплекс BCR. В то время как основная популяция Т-клеток распознает только пептидные антигены в комплексе с МНС, В-лимфоциты без участия МНС реагируют на большое число различных молекул, включая белки, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты и небольшие химические вещества (гаптены). Как и в случае с TCR, каждая В-клетка экспрессирует уникальный рецептор к антигену, который формируется в результате генетических рекомбинаций между зародышевыми генами при дифференцировке В-лимфоцитов в костном мозге. В-клетки экспрессируют несколько инвариантных молекул, которые отвечают за передачу сигнала и активацию В-клеток. Маркерами зрелых В-клеток служат мембранные молекулы CD19 и CD21 (рецептор комплемента CR2); маркерами основных субпопуляций — CD5, CD21. Поверхностными функциональными молекулами являются CD27, CD40, CD80, CD86; активирующими молекулами — CD23, CD25.

В-лимфоциты и ПК продуцируют в мембраносвязанной или секретируемой форме антитела-Ig, представляющие собой семейство структурно родственных гликопротеинов. Мембраносвязанные Ig служат рецепторами, опосредующими антигенную активацию В-клеток. Секретируемые Ig функционируют как медиаторы специфического гуморального иммунитета, активируя эффекторные механизмы, элиминирующие связанные антигены.

Все Ig имеют схожую симметричную основную структуру, состоящую из двух идентичных, ковалентно связанных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, каждая из которых соединена с одной из тяжелых цепей. Цепи состоят из двух или более независимо свернутых Ig-доменов, построенных примерно из 110 аминокислот, содержащих консервативную последовательность и межцепочечные дисульфидные связи. N-концевые домены тяжелых и легких цепей образуют V-области антигенраспознающего центра антител, неодинаковые у антител разной специфичности. Антитела классифицируют на различные изотипы и субтипы на основе различий тяжелых цепей C-области, состоящей из трех или четырех C-доменов Ig. Классы и субклассы обладают разными функциональными свойствами.

Fc-рецепторы иммуноглобулинов (FcR) представляют собой мембранные молекулы, экспрессируемые несколькими гемопоэтическими клетками, которые распознают Fc-область нескольких классов и подклассов Ig. Различают FcR для IgG (FcγRI/CD64, FcγRII/CD32 и FcγRIII/CD16), IgE (FcεR), IgA (FcαRI/CD89), IgM (FcμR) и IgA/IgM (Fcα/μR). Несколько других рецепторов, экспрессируемых на различных типах клеток, также связывают молекулы Ig: неонатальный FcR для IgG (FcRn) на эпителии кишечника, плаценте и эндотелии. Функция антител зависит, с одной стороны, от их способности распознавать антигенные эпитопы, а с другой стороны, от их динамической гибкости и способности взаимодействовать с родственными им FcR. Вовлечение FcR, экспрессируемых лейкоцитами, запускает активирующие или ингибирующие сигналы, инициируя провоспалительные, противовоспалительные и иммуномодулирующие функции в иммунных реакциях.

После стимуляции В-лимфоциты клонируют и дифференцируются в ПК, которые секретируют большое количество антител, относящихся к Ig в силу глобулярного строения молекул.

**Иммуноглобулины.** Существует пять классов изотипов Ig: IgD, IgM, IgG, IgA и IgE. До контакта с антигеном на поверхности зрелых В-клеток экспрессируется IgD, он секретируется на очень низких уровнях. Антитела класса IgM первыми продуцируются после контакта с антигеном. IgG составляют около 80% содержания всех Ig в кровотоке и имеют высокую специфичность к антигенам. IgA является основным изотипом в секрете слизистых оболочек. IgE присутствует и циркулирует в очень низких концентрациях, поскольку прикрепляется к поверхности тучных клеток. Указанные изотипы Ig различаются по способности активировать комплемент и рекрутировать воспалительные клетки и, таким образом, играют различную роль в защите организма от инфекций.

**В1- и В-клетки маргинальной зоны** охарактеризованы как врожденные, то есть «древние» В-лимфоциты, продолжающие развитие зародышевой линии, полученной от плода. Они экспрессируют рецепторы класса IgM к антигену и являются основным источником естественных антител; быстро активируются различными по химическому строению микроорганизмами. В1- и В-клетки маргинальной зоны продуцируют IL-10 при активации, который может подавлять иммунные реакции. Естественные антитела, вырабатываемые В1- и В-клетками маргинальной зоны, функционируют как первая линия защиты от микробов.

**В-регуляторные клетки (Breg)** незаменимы для поддержания толерантности и иммунного гомеостаза, хотя их количество составляет менее 10% от числа В-клеток, циркулирующих у здоровых людей. Ингибция иммунного ответа происходит за счет секреции IL-10 Breg-клетками, экспрессирующими CD24, CD1d, CD27. Breg-клетки ингибируют Th1-ответ, дифференцировку Th17-клеток, а также содействуют трансформации CD4+ Т-клеток в супрессивные Treg и регуляторные клетки 1-го типа (Tr1). Дифференцировка Breg-клеток индуцируется посредством воспалительных стимулов (через TLR), костимулирующих сигналов (CD40, CD80, CD86), микробиоты и цитокинов (IFN-α/β, IL-1α, IL-6, IL-21 и BAFF). Важность иммунорегулирующей функции иммуносупрессивных Breg-клеток выявлена при развитии различных заболеваний.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.2.3. Антигенпрезентирующие клетки

Антигенпрезентирующие клетки — ДК, макрофаги и В-лимфоциты, которые специализируются на захвате антигенов, их переработке и представлении наивным Т-лимфоцитам.

ДК являются главными антигенпредставляющими клетками для инициации Т-клеточных реакций против белковых и гликопротеиновых антигенов, расположены интерэпителиально и субэпителиально в пограничных тканях кишечника, легких, кожи, то есть в местах проникновения микроорганизмов. Они имеют многочисленные тонкие древовидные цитоплазматические отростки. ДК экспрессируют около сотни рецепторов врожденного иммунитета для захвата патогенов, включая TLR, лектиновые рецепторы С-типа. В покровных тканях после захвата патогена ДК процессируют, то есть фрагментируют патоген до антигенных детерминант и выносят их на поверхность отростков в составе молекул МНС (для пептидов) и CD1 (для непептидов). С током лимфы ДК поступают в ЛУ и закрепляются в Т-зависимой зоне. В эту зону постоянно прибывают наивные Т-лимфоциты с рецепторами к разнообразным антигенам, в том числе и к антигенным детерминантам, презентуемым ДК, что способствует главному событию в иммунном ответе — прямому взаимодействию между антигенсвязывающими рецепторами Т-клеток с антигенными эпитопами, демонстрируемые ДК.

Плазмоцитонидные ДК рециркулируют через кровь и лимфоидные органы и являются основным источником противовирусного IFN I типа (IFNα). Фолликулярные ДК присутствуют в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов селезенки и ЛУ. Эти клетки несут Fc-рецепторы для IgG и C3b и потому могут улавливать иммунные комплексы, содержащие антиген, на который осуществляется ответ. Фолликулярные ДК «позволяют» В-лимфоцитам отрывать и поглощать указанные антигены, которые будут процессироваться и презентироваться Tfh. Такой оригинальный механизм позволяет выбирать высокоспецифичные В-клетки, которые трансформируются в долгоживущие ПК и клетки иммунной памяти.

Макрофаги поглощают микроорганизмы и подготавливают антигенные детерминанты для распознавания и активации Т-лимфоцитов. Эти Т-клетки, в свою очередь, продуцируют цитокины для усиления способности макрофагов разрушать захваченные патогены.

На ранних этапах гуморального ответа В-лимфоциты также презентуют процессированные антигенные детерминанты Th2 и получают сигналы к переключению синтеза антител от IgM к IgG, IgA, IgE.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.3. Первичный и вторичный клеточный и гуморальный иммунный ответ

#### 7.3.1. Адаптивные иммунные реакции

Адаптивные иммунные реакции развиваются поэтапно и состоят из: распознавания антигена; активации, пролиферации, дифференцировки антиген-специфических лимфоцитов в эффекторные и клетки памяти; элиминации антигена; снижения интенсивности реакции и сохранения клеток памяти. Микроорганизмы и другие антигены могут проникать в организм через эпителиальные барьеры, чаще через слизистые оболочки легких, ЖКТ и урогенитального тракта. Они распознаются и захватываются резидентными ДК для переноса антигенного груза в регионарные ЛУ, через которые постоянно циркулируют Т-клетки. ДК созревают и экспрессируют высокие уровни молекул МНС, CD1 и костимуляторов. Антигены обрабатываются и выносятся на поверхность клетки в комплексе с молекулами МНС или CD1, которые презентуются антиген-специфическим наивным Т-клеткам. Наивные Т-клетки распознают антигены, активируются, пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки и клетки памяти, которые мигрируют к очагам инфекции и выполняют различные функции в иммунитете. В процессе презентации антигена основными костимуляторными молекулами для Т-клеток являются белки В7 (CD80 и CD86), которые экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках и распознаются рецептором CD28 на наивных Т-клетках. CD4<sup>+</sup> эффекторные Т-клетки-хелперы содействуют клеточному, гуморальному и воспалительному иммунному ответу. CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) убивают инфицированные клетки. Одной из самых ранних реакций CD4<sup>+</sup> хелперных Т-клеток является секреция фактора роста — цитокина IL-2 — и экспрессия рецепторов к IL-2. Это обеспечивает клонирование антиген-специфичных Т-лимфоцитов, что приводит к увеличению их численности до 100 000 и более.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.3.2. Внутриклеточные сигнальные пути

Распознавание антигена Т-клетками индуцирует ранние сигнальные события, которые включают фосфорилирование тирозина в молекулах комплекса Т-клеточных рецепторов и вовлечение адаптерных белков для передачи сигнала в ядро. Это приводит к активации нескольких промежуточных внутриклеточных биохимических посредников, которые, в свою очередь, активируют факторы транскрипции, стимулирующие транскрипцию генов, продукты которых опосредуют ответы Т-клеток. Важное воздействие на эти сигнальные пути оказывают костимулирующие молекулы. В результате формирования сигнала и передачи его от рецептора Т-клетки к ядру образуются три транскрипционных фактора — NFAT, AP-1 и NF- $\kappa$ B, вызывающие экспрессию генов, контролирующей активацию Т-лимфоцитов.

К образованию NFAT приводит сигнальный путь, не зависящий от костимуляции, который включается благодаря активации фосфолипазы C и реализуется с участием ионов Ca<sup>2+</sup>, что вызывает активацию кальциневрина, который дефосфорилирует цитозольный фактор NFAT-P. Благодаря этому NFAT-P приобретает способность мигрировать в ядро и связываться с промоторами активационных генов.

Фактор AP-1 формируется как гетеродимер под влиянием факторов, образующихся в результате реализации компонентов MAP-каскада. Значительный вклад в реализацию MAP-каскада вносят сигналы, зависящие от костимуляции через молекулу CD28.

Третий транскрипционный фактор, NF- $\kappa$ B, известен как основной транскрипционный фактор клеток врожденного иммунитета, причем основной вклад во включение этого пути вносят также костимулирующие сигналы от CD28. Сформировавшиеся транскрипционные факторы, связавшись с промоторными участками генов, индуцируют их экспрессию. Для начальных этапов реакции Т-клеток на антигенную стимуляцию особенно важна экспрессия генов ростового фактора Т-клеток IL-2 и IL-2R. В результате IL-2 выступает как аутокринный ростовой фактор, обуславливающий клонирование антиген-специфических Т-лимфоцитов.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.3.3. Гуморальный адаптивный иммунитет. Активация В-лимфоцитов

В ЛУ и селезенке при активации антигеном В-лимфоциты пролиферируют, а затем дифференцируются в ПК, которые секретируют антитела пяти классов, обладающих различными функциями.

Существует два основных пути активации В-клеток.

*Т-независимый.* Многие полисахаридные и липидные антигены имеют идентичные антигенные детерминанты (эпитопы), которые способны захватывать и сшивать несколько молекул рецепторов на каждой В-клетке и тем самым инициировать процесс их активации без участия Th.

*Т-зависимый.* В-лимфоцитам для полноценного ответа на белковый антиген требуется помощь CD4<sup>+</sup>Т-клеток хелперов. В-клетки поглощают белковые антигены, процессируют их и выносят на поверхность антигенные детерминанты в комплексе с молекулами HLA II класса для взаимодействия с Th, которые экспрессируют молекулы CD40L, секретируют цитокины и через них активируют В-клетки.

Часть клонов В-клеток дифференцируется в ПК, секретирующие антитела. Каждая ПК выделяет антитела той же специфичности, что В-клетки, которые отреагировали на данный антиген. Полисахариды и липиды стимулируют секрецию главным образом IgM-антител. Белковые антигены благодаря взаимодействию В-клеток с Th индуцируют выработку антител классов IgG, IgA и IgE, что основано на переключении генов, контролирующих синтез тяжелых цепей Ig.

При малоэффективном ответе, то есть длительном воздействии антигена, в В-клетках происходят гиперсоматические мутации в генах вариабельных участков, в результате часть из них приобретает рецепторы с более высоким сродством к антигену. Этот процесс называется созреванием аффинности. Высокоспецифичные В-клетки отбираются

и взаимодействуют с T<sub>H</sub>, что повышает качество гуморального иммунного ответа, обеспечивает дифференцировку долгоживущих ПК и клеток иммунной памяти.

Гуморальный адаптивный иммунный ответ борется с патогенами многочисленными способами. Антитела разных классов нейтрализуют токсины патогенов, уничтожают микроорганизмы с участием комплемента, содействуют их фагоцитозу через антителосвязывающий Fc-рецептор, расположенный на нейтрофилах и макрофагах.

IgA секретируется на слизистые оболочки и нейтрализует патогенные микроорганизмы. У плода IgG активно транспортируется через плаценту и защищает новорожденного до тех пор, пока его иммунная система не станет зрелой. Это форма пассивного иммунитета. IgE распознает гельминтозные паразиты, взаимодействует с тучными клетками и эозинофилами, которые уничтожают многоклеточные патогены.

Циркулирующие антитела класса IgG имеют период полураспада около 3 нед вследствие снижения их катаболизма, что превышает период полураспада большинства белков крови, включая Ig других классов. Часть долгоживущих ПК мигрируют из периферических лимфоидных органов в костный мозг, где продолжают вырабатывать антитела высокой специфичности класса IgG в течение нескольких лет.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.3.4. Иммунная память

Иммунная память является кардинальной особенностью адаптивного иммунитета. Иммунная память определяется сохранением специфических Т-лимфоцитов и ПК, продуцирующих антитела. Поддержание гуморального иммунитета также включает популяцию гомеостатически поддерживаемых В-клеток памяти, которые могут потребоваться для поддержания стабильного количества долгоживущих ПК. Пул Т-клеток памяти регулируется гомеостатическим делением низкого уровня, контролируемым цитокинами IL-7 и IL-15. Для выживания Т-клеток памяти в первую очередь важен IL-7, тогда как IL-15 имеет решающее значение для их пролиферации на низком уровне и поддержания размера клеточного пула.

После элиминации патогена большинство эффекторных лимфоцитов погибают в результате апоптоза, что приводит иммунную систему в исходное гомеостатическое состояние. Сохраняется несколько процентов высокоспецифичных Т- и В-клеток иммунной памяти. Как правило, против большинства возбудителей инфекции клетки иммунной памяти сохраняются в течение 6–9 мес, против некоторых — до 2–3 лет, и в редких случаях клетки иммунной памяти функционируют 10 лет и более (оспа, корь). Природа ограничивает длительность выживания клеток памяти, поскольку их нужно сохранять в лимфоидных и других тканях. Тем не менее процентное содержание Т-клеток-памяти среди циркулирующих Т-клеток неуклонно возрастает с годами и примерно соответствует возрасту человека. Численность клеток памяти превышает количество наивных клеток, несущих рецепторы к одинаковым антигенным детерминантам. Поэтому вторичный иммунный ответ при повторном воздействии антигена развивается быстрее, сильнее и специфичнее, то есть эффективнее, чем при первичном ответе. В связи с этим целью повторной вакцинации является формирование пула Т-, В-лимфоцитов иммунной памяти.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.3.5. Иммунный ответ на инфицирование патогенными микроорганизмами

Суммируя представленные выше реакции иммунной системы, сформулируем последовательность реагирования на инфицирование организма микробами. Ранняя реакция на микроорганизмы опосредуется врожденной иммунной системой, которая готова непосредственно реагировать на патогены. Врожденная иммунная система включает эпителиальные барьеры, фагоциты, NK-клетки и белки плазмы (систему комплемента). Врожденные иммунные реакции проявляются в виде фагоцитоза, воспаления и антивирусной защиты. Врожденный иммунитет не обладает антигенной специфичностью и иммунной памятью, но при повторной встрече с патогеном у макрофагов и киллеров повышается экспрессия рецепторов врожденного иммунитета, увеличивается синтез цитокинов, усиливаются эффекторные функции. Врожденная иммунная система использует конститутивные (исходно запрограммированные в генах) рецепторы нескольких семейств для распознавания консервативных чужеродных молекул микроорганизмов и «сигналов опасности», производимых поврежденными клетками организма.

Т- и В-лимфоциты, являясь медиаторами адаптивного иммунитета, экспрессируют специфические рецепторы к различным антигенам.

Т-лимфоциты экспрессируют TCR для распознавания антигена. Они реагируют на пептидные антигены в комплексе с молекулами МНС, представленными на поверхности антигенпрезентирующих клеток. НКТ-клетки (происходящие из тимуса) также экспрессируют TCR, но распознают и реагируют на микробные гликолипиды, презентуемые в составе молекул CD1 независимо от молекул HLA. NK (происходящие из костного мозга) убивают инфицированные и опухолевые клетки. NK-клетки распознают молекулы HLA с помощью ингибирующих рецепторов, экспрессируемых на здоровых клетках, что предотвращает гибель нормальных клеток.

В-лимфоциты (происходящие из костного мозга) экспрессируют мембраносвязанные антитела, распознающие широкий спектр антигенов. В-клетки активируются и дифференцируются в антителосекретирующие ПК и клетки иммунной памяти. Антигенпрезентирующие клетки захватывают микроорганизмы и другие антигены, транспортируют их в лимфоидные органы и демонстрируют процессированные антигенные детерминанты наивным Т-лимфоцитам. Наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками являются ДК, которые локализируются в эпителии пограничных тканей, ожидая встречи с патогеном.

В периферических лимфоидных органах происходят распознавание антигена и реакция на него. Т- и В-лимфоциты активируются для пролиферации и дифференцировки в эффекторные клетки и клетки памяти. Все органы иммунной системы связаны посредством кровотока и лимфотока, что позволяет иммунным клеткам взаимодействовать.

Клеточно-опосредованный адаптивный иммунитет — это реакция Т-лимфоцитов, НК-клеток и макрофагов, направленная на борьбу с внутриклеточными и фагоцитируемыми патогенами. Гуморальный адаптивный иммунитет опосредуется антителами, секретируемыми В-клетками и ПК, и направлен против внеклеточных микроорганизмов. Т-клетки-хелперы CD4+ помогают В-клеткам вырабатывать антитела, активируют макрофаги для уничтожения поглощенных микроорганизмов, стимулируют рекрутирование лейкоцитов и регулируют иммунные реакции на антигены. Функции CD4+ Т-клеток опосредуются секретируемыми цитокинами и экзосомами. Цитотоксические Т-лимфоциты CD8+ убивают инфицированные вирусом и опухолевые клетки, экспрессирующие в цитоплазме чужеродные антигены, а также могут продуцировать цитокины. Защитные реакции адаптивного иммунитета развиваются медленно, но являются мощными и специализированными с формированием клеток иммунной памяти. В процессе презентации под влиянием ДК происходит формирование нескольких субпопуляций Т-лимфоцитов: Th1 и Т-киллеров (CTL), содействующих клеточному иммунному ответу и реализующих его; Th2 — для помощи в продукции антител В-клетками; Th17 — для поддержания хронического воспаления, а также Treg — для подавления иммунного ответа. Указанные субпопуляции дифференцируются, активируются или ингибируются под влиянием цитокинов и других молекул. Субпопуляции Т-лимфоцитов размножаются, и в течение нескольких дней каждая клетка дает клон численностью свыше 100 000 копий. В результате взаимодействия указанных Т-лимфоцитов с клетками врожденного и адаптивного иммунитета формируется оптимальный для элиминации конкретного возбудителя тип иммунного ответа. В процессе развития первичного адаптивного иммунного ответа на антиген отмечают несколько этапов: скрытую фазу, экспоненциальное накопление эффекторных продуктов (антител, Т-киллеров) и завершение процесса. Удаление патогена и включение супрессорных механизмов приводит к резкому снижению числа участников иммунного ответа путем апоптоза. Сохраняется из них только несколько процентов Т- и В-лимфоцитов иммунной памяти. Повторное внедрение патогена в организм вызывает вторичный иммунный ответ, который развивается быстрее, сильнее и специфичнее благодаря участию в ответе клеток иммунной памяти. В процессе антительного иммунного ответа в В-лимфоцитах происходит повышение точности рецептора к антигену. Для этого происходят гиперсоматические мутации в генах, контролирующих экспрессию антиген-специфических рецепторов, в результате которых у части В-клеток возрастает аффинность рецептора. Такие В-лимфоциты подлежат отбору, критерием которого служит их способность отрывать антигены возбудителя болезни с поверхности фолликулярных ДК с последующей презентацией антигенных детерминант Tfh. Под воздействием Tfh происходит дифференцировка В-клеток в В-клетки памяти и долгоживущие ПК иммунной системы.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.4. Механизмы толерантности и иммунопатогенеза заболеваний

7.4.1. Иммунная толерантность

Иммунная толерантность — это активное состояние иммунной системы, характеризующееся отсутствием продуктивного иммунного ответа: синтеза антител, дифференцировки киллерных Т-лимфоцитов, развития воспалительных реакций. Иммунная ауто толерантность, то есть толерантность к молекулам своего организма, начинает формироваться в период эмбриогенеза, когда иммунная система запоминает основные молекулы системы гистосовместимости HLA, расположенные на поверхности клеток, в связи с чем они стали называться «молекулярными паролями своего». К некоторым тканям иммунная толерантность сформироваться не может, поскольку они отгорожены гистогематическими барьерами и недоступны для распознавания клетками иммунной системы. К «иммунопривилегированным» органам относятся головной и спинной мозг, хрусталик, семенники и яичники. Но в случае нарушения проницаемости гистогематических барьеров (например, при травме или воспалении) происходит выход «не известных» иммунной системе аутоантигенов в лимфоток, что индуцирует развитие аутоиммунного процесса (например, симпатическая офтальмия). Иммунная толерантность формируется и поддерживается по отношению не только к аутоантигенам, но и к фетоплацентарному комплексу и нормальному микробиому. В табл. 7.11 представлены виды иммунной толерантности — физиологической и индуцированной. Особый интерес представляет изучение толерантности, индуцированной патогенами и опухолями. Патогены используют один из многочисленных способов защиты от системы иммунитета путем индукции толерантности к ним, что достигается активацией клеток.

Таблица 7.11. Виды иммунной толерантности

Антиген-специфическая		Антиген-НЕСпецифическая
Естественная	Индукцированная	
1. Толерантность к своим молекулам в процессе эмбриогенеза. 2. Центральная толерантность — негативная селекция Т-клеток в тимусе и В-клеток в костном мозге. 3. Периферическая толерантность — подавление аутореактивных лимфоцитов в периферических лимфоидных органах. 4. Молекулы в иммунопривилегированных тканях (семенники, яичники, глаз, головной	1. Введение антигена в эмбрион или в первые сутки после рождения. 2. Опухолевый рост. 3. Мимикричные антигены патогенов — аутоиммунитет. 4. Эвазия патогенами — контроль над системой иммунитета.	1. Неонатальная тимэктомия. 2. Нокаут определенных генов. 3. Врожденные грубые дефекты иммунной системы. 4. Приобретенные поражения иммунной системы (инфекционные, радиационные, токсические, хирургические, лекарственные и др.)

мозг).	5. Введение антигена в высокой или низкой дозе.	
5. Толерантность к плоду при беременности.	6. Оральная толерантность к пищевым антигенам.	
6. Толерантность к нормальному микробиому	7. Пересадка трансплантата, близкого к реципиенту по тканевым антигенам	

В постнатальном онтогенезе в процессе генерации Т- и В-клеток в тимусе и костном мозге постоянно дифференцируются лимфоциты, на каждом из которых экспрессируется уникальный по специфичности антигенсвязывающий рецептор, что достигается путем рекомбинаций исходных зародышевых генных фрагментов, контролирующих синтез рецепторов к антигену. Бесконтрольность этих генных транслокаций приводит к появлению значительного количества Т- и В-лимфоцитов, имеющих рецепторы не только к чужим антигенам, но и к аутоантигенам.

Различают центральную и периферическую толерантность. В тимусе и костном мозге происходит обнаружение и удаление аутореактивных клеток — центральная толерантность. Периферическая ауто толерантность заключается в нейтрализации аутореактивных лимфоцитов с помощью ДК и Treg-клеток, имеющих супрессорную функцию. **Treg-клетки** дифференцируются в тимусе и на периферии, поэтому различают nTreg-клетки — натуральные, сформированные в тимусе, и индуцированные — iTreg, которые трансформируются из эффекторных Т-лимфоцитов в периферических лимфоидных органах и тканях. Treg-клетки предназначены не только для поддержания ауто толерантности, но и для предотвращения избыточного иммунного ответа, направленного на чужеродные антигены, включая аллергены. Они могут супрессировать иммунный ответ на всех этапах его развития, начиная от раннего врожденного ответа, во время индукции Т-клеточной активации, пролиферации и дифференцировки в лимфоидных органах, а также в течение эффекторной фазы иммунного ответа в тканях. Благодаря образованию различных субпопуляций Treg-клеток создается некая «супрессорная сеть», предназначенная для контроля силы и продолжительности иммунного ответа против антигенов на всех этапах его реализации. У людей примерно 5–10% популяции CD4+ Т-клеток в периферической крови состоят из Treg-клеток.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

При контакте с аутоантигенами, презентруемыми макрофагами и ДК, Treg-клетки активируются и синтезируют иммуносупрессирующие цитокины, такие как IL-10, IL-35 и TGF $\alpha$ , а также молекулы, подавляющие иммунный ответ на конкретный аутоантиген.

Для оптимизации ответа в процессе презентации антигенов наивным Т-лимфоцитам ДК направляет их дифференцировку на активацию либо на супрессию. Между содержащими антиген молекулами HLA-I или HLA-II класса ДК и антигенсвязывающим рецепторным комплексом Т-лимфоцита формируется иммунологический синапс — зона для межклеточных молекулярных взаимодействий, в частности между интегринами и адресными молекулами; костимулирующими или ингибирующими молекулами. В область синапса секретируются регуляторные цитокины и экзосомы. Активация Т-лимфоцитов происходит при взаимодействии его поверхностной молекулы CD28 с молекулой B7 на ДК. Если же молекула B7 соединится с молекулой CTLA-4 на Т-клетке, это препятствует ее активации и стабилизирует Т-лимфоцит.

Другим механизмом, приводящим к ингибции эффекторного Т-лимфоцита, является воздействие ДК через лиганды PD-L1 или PD-L2 при контакте с соответствующими рецепторами PD-1 или PD-2 на Т-лимфоцитах. Это взаимодействие приводит к активации тирозинкиназы, которая блокирует оба активирующих сигнальных каскада, идущих от TCR и корецепторной молекулы CD28 до факторов транскрипции, что предотвращает активацию Т-клеток. Интересно отметить, что для оптимизации иммунного ответа Th разных типов, содействующие развитию клеточного иммунного ответа — Th1, или гуморального антительного ответа — Th2, или воспалительного ответа — Th17, способны функционировать как супрессоры по отношению друг к другу.

Как это ни парадоксально, но любая иммунная реакция несет в себе потенциальную опасность для организма и требует жесткого контроля.

Изучение механизмов иммунопатологии, лежащих в основе развития многочисленных заболеваний человека, продемонстрировало критическую роль гипертрофированных процессов, когда избыточно сильный иммунный ответ приводит к повреждению органов и тканей. Для поддержания иммунной толерантности важна супрессия не только аутоиммунных процессов, но и иммунных реакций, направленных против микроорганизмов. В этом смысле Treg-клетки выполняют принципиально важные защитные функции, что реализуется посредством включения многочисленных механизмов для контроля иммунного ответа всех типов.

Treg-клетки наряду с продукцией супрессорных цитокинов способны реализовать киллерное действие, непосредственно взаимодействуя с эффекторными клетками, индуцируя в них апоптоз. Известно, что IL-2 является основным ростовым фактором для разных субпопуляций Т-лимфоцитов. Treg-клетки обладают повышенной способностью к захвату этого цитокина благодаря выраженной поверхностной экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора IL-2 (CD25), что способствует преобладающему потреблению IL-2 Treg-клетками и приводит к истощению этого цитокина в их окружении, а недостаток IL-2 ингибирует пролиферацию Т-эффекторных клеток и приводит к их апоптозу. Известны механизмы реализации супрессии по отношению к эффекторным Т- и В-субпопуляциям лимфоцитов через ДК. В необходимых случаях при презентации аутоантигена (антигена) ДК секретирует цитокины IL-10 и TGF $\alpha$ , вызывающие дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Treg-клетки, которые реализуют супрессорное действие секрецией аналогичных цитокинов. В свою очередь, сформированные Treg-клетки могут воздействовать на ДК с помощью указанных цитокинов для содействия дифференцировке новых популяций Treg-клеток по схеме: ДК  $\rightarrow$  (IL-



10 и TGF $\alpha$ ) → Treg-клетка → (IL-10 и TGF $\alpha$ ) → ДК → Treg-клетка. В результате такой «закольцовки» происходит усиление супрессорного эффекта.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.4.2. Механизмы иммунопатологии

Хроническое воспаление лежит в основе многих заболеваний и характеризуется срывом аутоотолерантности и развитием адаптивных аутоиммунных процессов. На начальном этапе появляются аутоантитела, способствующие удалению продуктов распада тканей, возникших при воспалении. При снижении активности Treg-клеток индуцируются иммунопатогенез с образованием антител, киллеров, индукция провоспалительной активности клеток, что приводит к повреждению тканей и усиливает хроническое воспаление. Этому содействуют приобретающие патогенные свойства клетки иммунной памяти. Такая пролонгация воспалительного процесса отмечена при врожденных, приобретенных иммунных дефектах, онкогенезе, аллергии, аутоиммунных заболеваниях. Классические представления о патогенезе аллергических реакций немедленного I типа основаны на продукции высокоспецифичных антител класса IgE, которые присоединяются к тучным клеткам и базофилам через FcR, выполняющих роль рецептора к аллергенам. Когда срабатывает этот рецептор, тучная клетка активируется, секретирует медиаторы воспаления и управляет через цитокины IL-4, IL-5, IL-13 ДК для формирования хелперов типа Th2. В свою очередь, Th2-клетки продуцируют цитокины IL-4, способствующие переключению синтеза В-лимфоцитов на антитела IgE, а также цитокины IL-5, IL-13 для вовлечения в ответ базофилов и эозинофилов. При бронхиальной астме в слизистых оболочках бронхов обнаруживаются все компоненты иммунной системы: несколько типов Th — Th2, Th6, Th9, Th17, Th22 с провоспалительным действием (производящие IL-4, IL-5, IL-13; IL-6, IL-9, IL-17 и IL-22), Tfh (IL-4, IL-21) и Th1 (IFN $\alpha$ ), обладающие противодействием по отношению к Th2-клеткам, регуляторные Treg-клетки (IL-10, IL-35, TGF $\alpha$ ), Breg, секретирующие IL-10.

В результате иммунная система больного с аллергией немедленного типа производит высокоспецифичные антитела к аллергенам, что поддерживает хроническое воспаление.

В реакциях гиперчувствительности II типа иммунопатогенез связан с аутоантителами, способными взаимодействовать со своими молекулами — рецепторами, белками, гликопротеинами, нуклеиновыми кислотами — и нейтрализовать их активность. Аутоантитела могут соединяться со своими клетками и разрушать их с помощью комплемента и иммунных клеток, несущих FcR, то есть антителосвязывающий рецептор. По такому типу происходит развитие более 120 аутоиммунных заболеваний: АИГА, миастении гравис, аутоиммунного тиреоидита и др. Их патогенез недостаточно изучен. Главный механизм связан со срывом иммунной толерантности к собственным молекулам. Например, поражение клапанов сердца при ревматизме вызвано иммунной реакцией против белка М-гемолитического стрептококка, структура которого близка структуре соединительной ткани. Такая антигенная мимикрия характерна для многих патогенов, позволяет возбудителям болезни определенное время ускользать от иммунной реакции в силу толерантности к собственным антигенам.

Тип III иммунопатологии связан с образованием иммунных комплексов, когда из хронического очага воспаления выделяются продукты тканевого распада и антигены возбудителей, на которые развивается антителый иммунный ответ. В результате в кровотоке формируются иммунные комплексы, состоящие из антигена, антител и активированных компонентов комплемента. Иммунные комплексы выводятся из кровотока с помощью несущих рецептор к C3-компоненту комплемента моноцитов/макрофагов, экспрессирующих FcR. При этом крупные иммунные комплексы оседают на эндотелии сосудов легких и гломерул, имеющих низкую скорость кровотока, куда хемотаксические факторы, образованные при активации компонентов комплемента — C3a и C5a, привлекают нейтрофилы, индуцирующие сосудистое воспаление и тромбоз, что отрицательно влияет на трофику тканей. Иммунные комплексы откладываются также в суставах при РА, поэтому на пике циркуляции иммунных комплексов ярче проявляются симптомы болезни. Отложение иммунных комплексов в гломерулах блокирует функции почек, вызывает гломерулонефрит, нередко приводящий к летальному исходу.

Гиперчувствительность IV типа обусловлена реакциями эффекторных Т-лимфоцитов. Активированные под влиянием патогенов Th1 продуцируют главный цитокин IFN $\alpha$ , мобилизующий клеточный ответ, что стимулирует макрофаги на продукцию провоспалительных IL-1, IL-6, IL-12, TNF и других цитокинов, которые в высоких концентрациях повреждают ткани. Активированные NK и цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) распознают зараженные клетки и убивают их перфорин-гранзимзависимым механизмом, а также индуцируют апоптоз в клетках через Fas-рецептор (CD95).

В последние годы стало понятным, что патогенными свойствами обладают Т- и В-клетки иммунной памяти, специфичные к антигенам патогена и собственных тканей (**табл. 7.12**). Различают по функциям и маркерам три типа Т-клеток иммунной памяти: 1) эффекторы памяти (T<sub>em</sub>), мигрирующие в зону эпителия, через которую проник патоген; 2) центральная память (T<sub>cm</sub>), сохраняющиеся в регионарных ЛУ; 3) резидентные (T<sub>rm</sub>), сохраняющиеся в тканях, где происходило или происходило воспаление. Фенотип клеток иммунной памяти сохраняют представители всех популяций Т-клеток: Th, цитотоксические Т-киллеры и регуляторные Т-клетки. Их активация с полным возвратом к эффекторному фенотипу индуцируется под влиянием специфического антигена и/или определенных цитокинов. Поэтому хронизация всех патологических иммунозависимых процессов — воспаления, аллергии и аутоиммунитета — происходит под воздействием клеток иммунной памяти. Таким образом, формируется цикличность болезнетворного процесса с неуклонным рецидивированием, приводящим к инвалидизации и смерти.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**Таблица 7.12.** Маркеры субпопуляций Т-клеток иммунной памяти человека

Субпопуляции Т-клеток памяти	Фенотип человека
Т-клетки центральной памяти, Tcm	CD44 <sup>hi</sup> , CD45RO <sup>hi</sup> , CD45RA <sup>low</sup> , CD127 <sup>hi</sup> , экспрессируют высокие уровни IL-2 и промежуточные уровни IFN̄ и TNF
Т-клетки — эффекторы памяти, Tem	CD44 <sup>hi</sup> , CD45RO <sup>hi</sup> , CD45RA <sup>low</sup> , CD127 <sup>hi</sup> , экспрессируют высокие уровни IFN̄ и низкие уровни IL-2
Резидентные Т-клетки памяти, Trm	Популяции CD45RO <sup>hi</sup> , CD45RA <sup>low</sup> , CD69 <sup>hi</sup>
Т-стволовые клетки памяти	CD27 <sup>hi</sup> , CD28 <sup>hi</sup> , CD45RO <sup>low</sup> , CD45RA <sup>hi</sup> , CD95 <sup>hi</sup> , CD122 <sup>hi</sup> , CD127 <sup>hi</sup> , L-селектин <sup>hi</sup> , CCR7 <sup>hi</sup> экспрессируют низкие уровни IFN̄ и промежуточные уровни IL-2
Treg-клетки памяти, Tregm	Экспрессия CD25 <sup>hi</sup> , CD27 <sup>hi</sup> , CD44 <sup>hi</sup> , CD45RO <sup>hi</sup> , CD45RA <sup>low</sup> , CCR7 <sup>low</sup> , FOXP3 <sup>hi</sup> , L-селектина <sup>low</sup> , CTLA4 <sup>hi</sup> , CD127 <sup>low</sup> , ICOS <sup>hi</sup> , BCL-2 <sup>hi</sup> , Ki67 <sup>low</sup> и HLA-DR не определены

В связи с их патогенной ролью обсуждаются возможности воздействия на уникальные молекулы клеточной поверхности, рецепторы цитокинов и хемокинов, факторы транскрипции и метаболические особенности Trm-клеток для терапевтических целей. Избирательная регуляция Trm-клеток может повысить эффективность вакцинации. В основном исследования иммунной памяти были сосредоточены на эффекторных В-клетках и Т-клетках. Недавние работы позволили обнаружить антиген-специфические популяции регуляторных Т-клеток памяти (Tregm). Предполагается, что Tregm-клетки памяти генерируются для регуляции реакций эффекторов памяти и ослабления сопутствующего повреждения тканей при продолжающихся иммунных реакциях.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.5. Иммунопатологические состояния  
Нарушения работы системы иммунитета делят на врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.5.1. Диагностика врожденных ошибок иммунитета  
Врожденные ошибки иммунитета (ВОИ), или первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС), — это большая группа моногенных заболеваний иммунной системы, фенотипическое разнообразие которой определяется функциональным дефектом пораженного звена иммунной системы. Выделяют 10 основных групп ВОИ, включающих около 500 генетических дефектов. ВОИ являются редкими заболеваниями, их распространенность в РФ, по имеющимся в настоящее время данным, составляет 2,09±0,93 на 100 тыс. населения. Во всем мире базы данных являются единственным способом для объективного сбора и накопления информации по различным нозологическим группам пациентов с ВОИ. В 2017 г. по инициативе Национальной Ассоциации экспертов в области ПИДС был создан популяционный регистр пациентов, который успешно функционирует и на настоящий момент насчитывает около 5000 человек. Поздняя диагностика ВОИ, зачастую приводящая к фатальным последствиям, явилась основанием для введения неонатального скрининга на тяжелые формы ПИДС в РФ с января 2023 г. Методом выбора неонатального скрининга ПИДС является мультиплексный анализ TREC (T-cell Receptor Excision Circle) и KREC (Kappa-deleting Recombination Excision Circle) в сухих клетках крови на картах неонатального скрининга, описанный в разделе 9.6.3 «Неонатальный скрининг новорожденных» настоящего руководства. В соответствии с общепринятой классификацией Международного союза иммунологических сообществ (International Union of Immunologic Societies — IUIS) 2019 г. все случаи ВОИ делят на 10 групп (табл. 7.13), которые, в свою очередь, подразделяются на подгруппы и отдельные нозологии.

**Таблица 7.13.** Классификация врожденных ошибок иммунитета человека (первичных иммунодефицитов), Международный союз иммунологических сообществ, 2019 г. с дополнениями

№	Название группы ПИДС	Разнообразие форм и генов ПИДС
1	Комбинированные иммунодефициты с дефектом клеточного и гуморального звена	3 подгруппы, 52 формы иммунодефицитов, 60 генов
2	Комбинированные иммунодефициты с синдромальной патологией	9 подгрупп, 60 форм иммунодефицитов, 64 гена
3	Гуморальные иммунодефициты	4 подгруппы, 49 форм иммунодефицитов, 42 гена
4	Иммунная дисрегуляция	7 подгрупп, 46 форм иммунодефицитов, 47 генов
5	Дефекты фагоцитоза	4 подгруппы, 35 форм иммунодефицитов, 42 гена
6	Дефекты врожденного иммунитета	9 подгрупп, 59 форм иммунодефицитов, 70 генов
7	Аутовоспалительные заболевания	3 подгруппы, 52 формы иммунодефицитов, 49 генов
8	Дефекты системы комплемента	30 форм иммунодефицитов, 36 генов
9	Костномозговая недостаточность	43 формы иммунодефицитов, 43 гена

10	Фенокопии ПИДС	13 форм: соматические мутации — 5 генов, 8 форм иммунодефицитов с аутоантителами к цитокинам
----	----------------	--

Непрерывно пополняется число новых генов, дефекты в которых приводят к зачастую сходной клинико-лабораторной симптоматике. Большое количество ВОИ встречается не только у детей, но и у взрослых. Настораживающими признаками наличия ПИДС являются следующие.

- 1. Семейный анамнез.
- 2. Частые бактериальные инфекции.
- 3. Тяжелое течение бактериальных инфекций.
- 4. Инфекции, вызванные условно-патогенными возбудителями.
- 5. Тяжелые/атипичные кожные проявления и отеки.
- 6. Воспалительные заболевания кишечника с ранним началом или тяжелым течением.
- 7. Снижение показателей ОАК.
- 8. Длительное увеличение ЛУ, печени, селезенки.
- 9. Значительное уменьшение размеров тимуса, ЛУ и миндалин у детей.
- 10. Повторные эпизоды лихорадки, сопровождающиеся изменениями в лабораторных анализах без признаков инфекций.
- 11. Сочетание нескольких аутоиммунных заболеваний, включая эндокринопатии.
- 12. Особенности строения лица.

Для диагностики иммунопатологических состояний используют подробный анамнез и иммунологические исследования, включающие тесты первого и второго уровня (рис. 7.1). Сбор анамнеза включает все иммунопатологические реакции: аллергические, поствакцинальные, постинфекционные, опухолевые, соматические, семейный анамнез, а также особенности микроокружения.

Тесты первого уровня направлены на выявление дефектов иммунной системы, тесты второго уровня — на идентификацию конкретного нарушения в иммунной системе. Особой областью аналитических тестов второго уровня, детально характеризующих причину заболевания при ВОИ, являются генетические исследования, спектр которых быстро пополняется.

Глава 7. Лабораторная иммунология

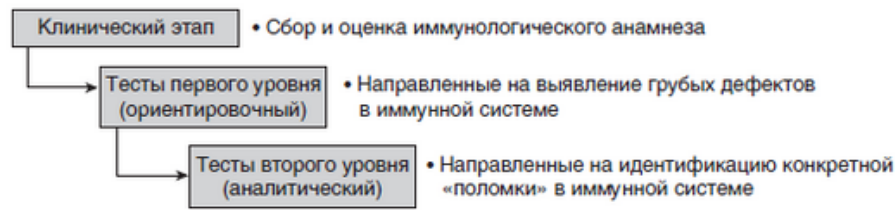


Рис. 7.1. Иммунологическое обследование пациентов с иммунной недостаточностью

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.5.2. Диагностика вторичных иммунодефицитов

Под вторичными иммунодефицитами понимают нарушения работы системы иммунитета, которые развиваются в поздний постнатальный период или у взрослых и не являются результатом какого-либо выявленного генетического дефекта.

В зависимости от причины возникновения выделяют три вида вторичных иммунодефицитов: приобретенный (например СПИД), индуцированный (цитостатики, глюкокортикоиды, травмы, инфекции, интоксикации, СД, нарушения питания и др.) и спонтанный. Большинство индуцированных вторичных иммунодефицитов являются транзиторными и не требуют коррекции иммунологических изменений, поскольку являются «нормой патологии». В зависимости от нарушения в системе иммунитета выделяют вторичные иммунодефициты с преимущественным повреждением клеточного иммунитета, гуморального иммунитета, системы фагоцитоза, системы комплемента или комбинированные дефекты. Для скрининга иммунопатологии, как правило, выполняют комплекс количественных и функциональных показателей, отражающих состояние иммунной системы человека в данный момент времени, который называют иммунным статусом. Примерный перечень лабораторных тестов иммунного статуса — иммунограммы первого уровня — представлен в табл. 7.14.

Таблица 7.14. Показатели иммунограммы первого уровня (взрослые 18–65 лет)

Показатель	Референтный интервал	
	%	×10 <sup>9</sup> /л
Лейкоциты		4–9
Сегментоядерные нейтрофилы	47–72	2–5,5
Лимфоциты (LYMF)	19–37	1,2–3
Моноциты (MON)	3–11	0,09–0,6
Нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение	1,7–1,9	—

Т-лимфоциты зрелые (CD3+)	51–82	0,97–1,64
Лейкоцитарно-Т-лимфоцитарный индекс	4–8	
Th (CD3+CD4+)	35,9–45,7	0,6–0,9
Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+)	20,3–29,0	0,3–0,6
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)	1–2,2	—
В-лимфоциты (CD19+), % ( $\times 10^9/\text{л}$ )	5,2–11,0%	0,10–0,22
NK-клетки (CD3–, CD16+, CD56+)	6,0–12,6%	0,10–0,25
НСТ-тест (спонтанный), %	5–20	—
НСТ-тест (стимулированный), %	20–42	—
Фагоцитарная активность (латекс), %	52–67	—
Фагоцитарное число	3,8–6,4	—
IgA, г/л	0,7–4,0	—
IgG, г/л	7,0–16,0	—
IgM, г/л	0,4–2,3	—
Циркулирующие иммунные комплексы, ед. опт.	29,8 $\pm$ 2,5	—

В некоторых случаях иммунограмму называют расширенной лейкограммой, потому что для базовой характеристики иммунитета всегда используют ОАК, а также часто лейкоцитарные индексы, СОЭ, СРБ, наряду с тестами, перечисленными в **табл. 7.14**. Например, в период COVID-19 использовали нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение как характеристику баланса реакций врожденного и приобретенного иммунитета. Для оценки функции врожденного иммунитета используют показатели фагоцитоза и бактерицидной активности фагоцитов (НСТ-тест, генерация свободных форм кислорода).

Одним из обязательных элементов скрининга нарушений иммунитета является исследование уровня Ig основных классов, циркулирующих иммунных комплексов, поскольку большая часть иммунодефицитных состояний приходится на гуморальное звено иммунитета.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Клеточный иммунитет оценивают по относительному и абсолютному количеству Т-, В-, NK-клеток, составляющих в сумме 100% лимфоцитов. Иммунорегуляторный индекс характеризует соотношение основных субклассов Т-лимфоцитов — CD4+/CD8+, которое показывает баланс регуляторных Т-клеток: индукторов-хелперов и супрессоров-цитотоксических клеток.

Стандартов, регламентирующих выполнение иммунограммы, не существует, а сами тесты не являются унифицированными. В связи с этим в каждой лаборатории могут использоваться собственные референтные интервалы. Подсчет показателей клеточного иммунитета — популяций и субпопуляций клеток с использованием метода проточной цитометрии — относительно дорогостоящее исследование, поэтому набор тестов в каждой лаборатории зависит от имеющихся ресурсов в соответствии с профилем оказания медицинской помощи. В настоящее время от поэтапной оценки иммунитета в большинстве случаев переходят к решению определенной клинической задачи. Например, при наличии лимфоцитоза исследуют наличие признаков клональной лимфопротоперации, сочетая стандартное исследование клеток на гематологическом анализаторе с методами проточной цитометрии. Для характеристики иммунопатологических реакций определяют минорные субпопуляции клеток иммунной системы, которые описаны в разделе 7.4.2 «Механизмы иммунопатологии». Наиболее используемыми также являются:

- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры NK-клеток (Т-NK-клетки) (CD3+CD56+CD45+);
- NK-клетки, экспрессирующие  $\alpha$ -цепь антигена CD8 (CD3-CD8+CD45+);
- активированные В-лимфоциты (CD3-CD25+CD45+);
- активированные Т-лимфоциты (CD3+HLA-DR+CD45+) и активированные цитотоксические лимфоциты (CD8+HLA-DR+CD45+);
- В-лимфоциты и активированные NK-клетки (CD3-HLA-DR+CD45+);
- активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие  $\alpha$ -цепь рецептора IL-2 (CD3+CD25+CD45+);
- регуляторные Th-клетки (CD4+CD25brightCD127negCD45+), выполняющие иммуносупрессорную функцию, и др.

Иммунограмму используют в дифференциальной диагностике первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных, лимфопротоперативных, инфекционных, гематологических заболеваний. При этом используют совокупность общеклинических, биохимических, иммунохимических и иммунологических тестов.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.6. Аллергия

#### 7.6.1. Характеристика аллергических заболеваний

Аллергия и аллергические болезни являются одними из самых распространенных хронических заболеваний человека: частота бронхиальной астмы колеблется от 1 до 20%, аллергического ринита — от 1 до 18%, кожных аллергий — от 2 до 10% в различных популяциях.

Термин «аллергия» был впервые введен Клеменсом фон Пирке в 1906 г. и происходил от греческих слов *allos*, что означает «другой», и *ergon* — «реакция». Аллергия — это неожиданная аномальная или преувеличенная реакция на экзогенный раздражитель, вовлекающая иммунную систему. В 2023 г. Европейской ассоциацией аллергологов и клинических иммунологов предложена номенклатура аллергических реакций. Согласно этому документу, аллергия — это аномальная или преувеличенная реакция на экзогенные раздражители, которая включает различные типы реакций гиперчувствительности с участием антител, клеточных, тканевых или метаболических механизмов, приводящих к развитию респираторных, кожных, глазных, желудочно-кишечных и других симптомов, включая анафилаксию. Согласно клиническим рекомендациям, одобренным в РФ, анафилаксия — это системная реакция гиперчувствительности, характеризуется быстрым развитием потенциально жизнеугрожающих изменений гемодинамики и/или нарушениями со стороны дыхательной системы. Возможно развитие анафилаксии с поражением кожи, слизистых и ЖКТ без гемодинамических и дыхательных нарушений. Выделяют типы реакций: антитело- (I–III) и клеточно-опосредованные (IVa–c) процессы, тканевые механизмы (V–VI), прямой ответ на воздействие химических веществ (VII). Естественно, что в клинической практике могут встречаться комбинации нескольких типов реакций. Знание и понимание процессов, лежащих в основе аллергического воспаления, — путь к персонализированной медицине.

**Тип I, или немедленная реакция.** В ответ на первичное внедрение аллергена у атопиков развивается иммунный ответ, заканчивающийся формированием антител или клеток-эффекторов. IgE-зависимые реакции возникают у пациентов с аллергическим ринитом, аллергическим риноконъюнктивитом, бронхиальной астмой, атопическим дерматитом, острой крапивницей/ангионевротическим отеком, пищевой аллергией, аллергией на яд и лекарственные препараты. Реакция включает две фазы: сенсибилизацию и эффекторную фазу. При первом воздействии на человека аллерген захватывается антигенпрезентирующими клетками, такими как ДК, В-лимфоциты и макрофаги, которые обрабатывают и представляют пептиды аллергена, связанные с молекулами МНС класса II, на своей поверхности. После этого происходит активация наивных Т-клеток, а также их дифференцировка в хелперные и цитотоксические Th2- и Tc2-клетки, активно вырабатывающие цитокины. Одними из ключевых цитокинов в патогенезе аллергических заболеваний считают IL-4 и IL-13, которые способствуют переключению синтеза В-клетками синтеза разных классов Ig на синтез IgE. В эффекторную фазу тучные клетки и базофилы экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (FcεRI) для Fc-области IgE. Специфические IgE необратимо связываются с FcεRI на поверхности тучной клетки и базофила, сенсибилизируя эти клетки к конкретному аллергену. При последующем воздействии аллергена он сшивает два соседних IgE на поверхности клеток, вызывая их дегрануляцию с высвобождением биологически активных веществ (табл. 7.15), развитием цитотоксического повреждения и патохимического воспаления.

**Таблица 7.15.** Медиаторы тучных клеток, участвующие в реализации реакций аллергии немедленного типа

Медиаторы аллергии немедленного типа	Патохимические стадии аллергического воспаления (аллергия немедленного типа)
Гистамин	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры, усиление секреции слизи, раздражение нервных окончаний (зуд)
Гепарин	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры
Серотонин	Расширение и повышение проницаемости сосудов, спазм гладкой мускулатуры
Химаза, триптаза	Протеолиз, усиление секреции слизи, ремоделирование эпителия
Хемотаксический фактор эозинофилов	Хемотаксис эозинофилов
Хемотаксический фактор нейтрофилов	Хемотаксис нейтрофилов

**Реакция клеточной цитотоксичности II типа, или антитело-опосредованная клеточная цитотоксичность.**

Реакции II типа, как правило, являются лекарственными, часто бывают причиной аллергической цитопении. Тем не менее реакции II типа являются важным патогенетическим событием при таких аутоиммунных заболеваниях, как иммунная тромбоцитопения (ИТП), АИГА, аутоиммунная нейтропения, болезнь Бирмера, синдром Гудпасчера, ГБПН (эритробластоз плода), миастения, пузырчатка и трансфузионные реакции с несовпадающими группами крови. Первичными антителами, участвующими в аллергических реакциях II типа, являются IgG и IgM. Механизмы сенсибилизации неясны, потенциально могут быть связаны с молекулярной мимикрией. Препарат или его метаболит сначала связывается с белками на клеточной мембране. Затем антилекарственные антитела и лекарственно-мембранный белковый комплекс связываются и активируют комплемент либо связываются α-рецептором Fc-фрагмента на эффекторной клетке, такой как НК, эозинофил, макрофаг или нейтрофил, в конечном итоге индуцируя цитолиз. Активация системы комплемента и рекрутирование иммунных клеток приводят к высвобождению воспалительных преформированных и вновь генерируемых медиаторов и протеолитических ферментов, способствующих повреждению тканей.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**Реакции III типа, или иммунокомплексные реакции.** Аллергические реакции III типа включают острую фазу гиперчувствительного пневмонита, лекарственно-индуцированный васкулит, сывороточную болезнь и реакцию Артюса. Реакции III типа связаны с несколькими аутоиммунными заболеваниями, включая СКВ, РА

и постстрептококковый гломерулонефрит. Эти реакции опосредованы антителами IgM и IgG, которые связывают растворимые антигены, такие как лекарственные препараты, яды и другие аллергены, образуя комплексы «антиген–антитело». Комплексы откладываются по всему организму в мелких кровеносных сосудах, капиллярах, синовиальной оболочке суставов, клубочках почек, альвеолах легких, вызывая воспаление.

**Реакции IV типа, или клеточно-опосредованные реакции** лежат в основе аллергического контактного дерматита, целиакии, хронической фазы гиперчувствительного пневмонита; могут обуславливать не-T2-эндотипы бронхиальной астмы и атопического дерматита, участвуют в развитии эозинофильного эзофагита, хронического полипозного риносинусита с бронхиальной астмой, а также реакций лекарственной гиперчувствительности. Разные субпопуляции Т-клеток опосредуют ответы IV типа специфическими путями, демонстрируя высокую степень гетерогенности, отражающую разные фенотипические особенности лимфоцитов памяти. Некоторые механизмы заболевания могут быть объяснены только взаимодействием нескольких подтипов гиперчувствительности IV типа. К этому типу реакций относят иммунные реакции с вовлечением T1 (для подтипа IVa), T2 (для подтипа IVb) и T17 (для подтипа IVc).

**Тип V — дефект эпителиального барьера** и микробный дисбактериоз приводят к дисрегуляции иммунного ответа, включая обширную активацию ответов T1, T2 и T17 в сочетании с потерей Т-регуляторных, В-регуляторных и регуляторных врожденных лимфоидных клеток. Кроме того, происходит образование специфических IgE к ингаляционным или пищевым аллергенам, активация макрофагов, тучных клеток и базофилов и высвобождение провоспалительных цитокинов, хемокинов и медиаторов воспаления (гистамин, лейкотриены, АФК). Последовательность событий в конечном итоге приводит к повреждению тканей, которое может наблюдаться при бронхиальной астме, аллергическом рините и риноконъюнктивите, атопическом дерматите, целиакии, эозинофильном эзофагите, энтероколите, вызванном пищевыми белками, хроническом риносинусите.

**Тип VI — метаболически индуцированная иммунная дисрегуляция** характерна для подтипа астмы, связанного с ожирением. Увеличение индекса массы тела связано с повышением уровня циркулирующих медиаторов воспаления и увеличением количества нейтрофилов и эозинофилов в крови.

**Тип VII — прямая клеточная и воспалительная реакция на химические вещества** возникает у пациентов с аллергическим ринитом, риноконъюнктивитом, атопическим дерматитом, острой крапивницей/ангиоотеком и лекарственной аллергией. Идиосинкразические реакции включают перекрестно-реактивную гиперчувствительность к нестероидным противовоспалительным препаратам. Основной механизм этих реакций связан с ингибированием циклооксигеназы-1 и высвобождением эйкозаноидных медиаторов у восприимчивых лиц. Многие лекарственные препараты (например, миорелаксанты, противогрибковые препараты, фторхинолоны, аминогликозиды, сульфаниламиды) продемонстрировали способность вызывать дегрануляцию тучных клеток за счет непосредственной связи с лигандом рецептора на поверхности клетки у восприимчивых лиц.

Клинические проявления атопии многообразны, могут проявляться атопическим дерматитом, астмой, сенной лихорадкой, атопическим ринитом, мигренью, гастродуоденитом или их сочетанием. Обсуждается вопрос о едином системном заболевании, объединяющем заболевания «атопического марша» — атопический дерматит, атопический ринит, бронхиальную астму.

Внешние признаки атопии характеризуются минимальным персистирующим воспалением (атопический тип).

При атопии часто регистрируются симптомы гиперреактивности железистой ткани (аденоидиты), сухость кожи (атопический дерматит). Пациенты с атопией часто болеют инфекционными заболеваниями, имеют склонность к затяжному течению заболеваний, развитию осложнений. Течение атопического дерматита зачастую осложняется присоединением бактериальных, вирусных или грибковых инфекций. Можно считать, что при аллергических (атопических) заболеваниях формируется патологический круг: аллергические заболевания способствуют повышенной восприимчивости к инфекциям, а инфекции способствуют сенсибилизации организма и обострению аллергического заболевания. Также известно, что для больных атопией характерны повышенная эмоциональность, лабильность вегетативной нервной системы, психоневрологические расстройства.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.6.2. Роль специфических иммуноглобулинов E

Атопия является полигенным мультифакториальным заболеванием со сложным типом наследования. Известно несколько причин возникновения атопических аллергических реакций. Одна из них — особенность строения эпидермиса. В эпидермальном дифференцировочном локусе около 30 генов, определяющих защитную и регулируемую функции этого покровного слоя. Главным из них является ген филагтрина — ключевого белка, определяющего конечную дифференцировку эпидермиса и его барьерные свойства.

У атопиков поступление аллергена создает разрешающий фактор Th2-ответа (IgE-ответа), что облегчает его воспроизведение подготовленным к восприятию аллергена клеткам с помощью образующихся медиаторов. Такую роль в продукции IgE играет тимический стромальный лимфопоэтин, который способен наделять ДК свойством индуцировать Th2-тип ответа и одновременно снижать продукцию цитокинов, стимулирующих Th1-ответ. Тимический стромальный лимфопоэтин известен быстрым повышением количества на клеточной поверхности таких коstimуляторных молекул, как MHC II класса, CD40, CD80, CD86, и маркера активации ДК, при этом тимический стромальный лимфопоэтин не индуцирует Th1-ответ. В миелоидных ДК тимический стромальный лимфопоэтин вызывает образование цитокинов эотаксина 2 и IL-8, включающих положительный хемотаксис Th2-клеток к месту воспаления.

Активированные Th2 экспрессируют OX40L, который запускает дифференцировку аллерген-специфических наивных CD4+ Т-клеток, начинающих продукцию IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , что приводит к образованию антител изотипа IgE, продукции слизи, эозинофилии.

Молекула IgE имеет особенность строения, способствующую высокоаффинному взаимодействию IgE с рецептором FcRI. Ригидность молекулы IgE и конформационные изменения соседних доменов препятствуют диссоциации IgE и рецептора. Вне периода аллергенных провокаций в легочной ткани сенсibilизированного организма сохраняются клетки, соответствующие Th2-клеткам памяти. Эти клетки превращаются в активированные эффекторы при экспозиции аллергена. Поддержание и активация Th2-клеток памяти осуществляются также при участии ДК, активированных тимическим стромальным лимфопоэтином.

Большое значение в развитии аллергического иммунного ответа имеют ILC. ILC2 — тканерезидентные иммунные клетки, участвующие во врожденной защите от паразитов, в частности гельминтов, за счет восстановления поврежденной ткани. ILC2 многочисленны в коже, легких, печени и пищеварительном тракте. Эти клетки характеризуются продукцией амфирегулина и характерного спектра цитокинов, в числе которых IL-4, IL-5 и IL-13. Их продукция запускается под действием цитокинов IL-25, тимического стромального лимфопоэтина и IL-33.

По спектру выделяемых цитокинов ILC2 считают аналогами Т-хелперов группы Th2.

В практике врача-аллерголога лабораторная диагностика до последнего времени занимала вспомогательное место в подтверждении IgE-зависимых механизмов, поскольку основным ориентиром сенсibilизации всегда служили кожные пробы с аллергенами. Развитие молекулярной алергодиагностики, появление возможности определения специфических IgE к единичным эпитопам антигенных детерминант — алергокомпонентам аллергена, выделение из их числа мажорных и минорных алергокомпонентов привело к пониманию прогностической роли лабораторных исследований. Более точный отбор пациентов по продукции антител к мажорным алергокомпонентам позволяет улучшить результаты лечения и избежать осложнений. На основании лабораторной информации о наличии специфических IgE к минорным алергокомпонентам даются точные рекомендации по элиминационной диете: пищевых продуктах, содержащих молекулы перекрестно реагирующих белков.

Высокую эффективность алерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) можно ожидать у пациентов, имеющих IgE-антитела к мажорным (основным) аллергенам. Если какой-либо пылевой алерген содержит несколько мажорных алергенных компонентов, экстракт для АСИТ должен включать все эти компоненты, чтобы обеспечить достаточную эффективность.

АСИТ, вероятно, будет умеренно эффективной, если у пациента обнаруживаются специфические IgE как к мажорным, так и к минорным (второстепенным) аллергенам. Между тем отсутствие IgE к мажорным аллергенам позволяет предположить низкую реакцию на АСИТ. Алергочип ALEX2 позволяет получить наиболее полный спектр сенсibilизации пациента и избежать ошибок в диагностике «истинной» сенсibilизации. Назначение АСИТ на основе информации об алергенных молекулах, ответственных за сенсibilизацию, значительно повышает эффективность и безопасность АСИТ.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.6.3. Антигены, алергены и алергокомпоненты

Аллергенами называют антигены, вызывающие гиперчувствительность системы иммунитета, выражающуюся гуморальными и клеточными реакциями. Антигены, которые самостоятельно не вызывают иммунный ответ, но при соединении с белками становятся полноценными антигенами, называют гаптенами. Многие ЛС имеют низкий молекулярный вес и являются гаптенами, соединяясь с белками организма, становятся причиной лекарственной аллергии.

Обычно алергены являются полипептидами или белками с низкой молекулярной массой — от 5–90 кДа. Алергены проникают через слизистые оболочки и кожу. Проявлению свойств алергенности благоприятствует наличие у белка протеазной активности (клещевые алергены домашней пыли), способности взаимодействовать с липидами (пищевые антигены растительного и животного происхождения), а также с различными белками организма (лекарственные вещества). По источнику алергены разделяют на животного, растительного происхождения, микробные и синтетические, а по путям поступления в организм — на ингаляционные (аэроалергены), пищевые, инъекционные.

Удалось охарактеризовать и клонировать молекулы ДНК, кодирующие отдельные эпитопы молекулы алергенов — алергокомпоненты. Благодаря алергокомпонентам, общим у многих алергенов, стал понятен феномен перекрестной реактивности. Охарактеризованы основные белковые семейства молекул, обуславливающие перекрестную реактивность, которые обладают определенными структурно-функциональными свойствами. Имеется справочная база известных алергенных белков ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)). Практическим результатом открытий алергокомпонентов явилось получение молекул-алергенов биотехнологически (r-рекомбинантные алергены). На их основе разрабатываются тест-системы и чипы для выявления специфических IgE-антител к отдельным белкам — компонентам алергенов. ВОЗ создала классификацию молекулярных компонентов алергенов и их свойств. По этой классификации в обозначении названия алергена участвуют первые три буквы рода, первая буква вида, арабская цифра обозначает порядок открытия молекулярного компонента алергена. Например, береза бородавчатая: *Betula verrucosa* — Bet v 1 (Bet — род, v — вид, 1 — порядок алергена). В зависимости от метода получения молекулярного компонента перед его названием ставится буква n, если он натуральный, или буква r, если белок рекомбинантный. Например, nBet v 1 (выделен из экстракта пыльцы березы). Важную роль в структуре сенсibilизации играют антигенные детерминанты, составляющие молекулу алергена, на которые вырабатываются специфические антитела. Примером алергенного продукта может служить коровье молоко, включающее множество алергенных компонентов, таких как белки сыворотки Bos d4, Bos d5, Bos d6 или казеины Bos d8.

Каждый вид алергенов имеет как главные первичные видоспецифические антигенные детерминанты-алергокомпоненты, так и дополнительные детерминанты. Главные (мажорные) алергокомпоненты — это первичные сенсibilизирующие молекулы, на которые вырабатываются специфические IgE-антитела и развивается истинная

аллергия. Такие аллерген-специфичные IgE-антитела к первичным аллергенам выявляются более чем у 50% больных. В случае если IgE-антитела к аллергену вырабатываются у малого числа пациентов, такие детерминанты-аллергокомпоненты называют минорными. За перекрестную реактивность в большинстве случаев отвечают минорные аллергокомпоненты, в редких случаях могут отвечать главные аллергокомпоненты.

Минорные аллергокомпоненты обладают высоким структурным сходством с белками близкородственных видов (например, в разных видах трав), а также в филогенетически далеких группах растений и животных, представленных высококонсервативными белками одного семейства со сходными функциями, их часто называют вторичными, или паналлергенами. Сенсибилизация вторичными аллергокомпонентами связана с перекрестной реактивностью IgE-антител к первичным аллергокомпонентам и не всегда проявляется клинически. Термин «косенсибилизация» обозначает истинную сенсибилизацию к нескольким источникам аллергенов, не связанную с перекрестной реактивностью. В табл. 7.16 охарактеризованы основные белковые семейства аллергокомпонентов и их свойства, в частности являются ли они главными первичными или минорными вторичными аллергенами.

**Таблица 7.16.** Белковые семейства аллергокомпонентов

Белковое семейство	Аллергокомпоненты	Свойства
PR-10 — патогенетически значимые белки	Bet v 1 (береза), Ara h 8 (арахис), Gly m 4 (соя), Cor a 1 (фундук), Pru p 1 (персик), Api g 1 (сельдерей), Mal d 1 (яблоко), Dau c 1 (морковь), rPhl 1, rPhl 2, rPhl 4, rPhl 5b (timoфеевка, группа трав)	Главные аллергены. Термолабильные белки, аллергенные свойства которых снижаются после термической обработки, а также при распаде в пищеварительном тракте, имеют высокую перекрестную реактивность «пыльца–пыльца» и «пыльца — растительная пища»
Клинически значимые аллергены клещей домашней пыли	Der p1, Der f1, Der p2, Der f2, Der 23	Главные аллергены. Белки с протеазной активностью
Профилины Profilins	rBet v 2 (береза), nOle e 2 (олива), rHev b 8 (латекс), Mer a1 (пролесник), rPhl p 12 (timoфеевка)	Минорные вторичные аллергены. Профилин — один из наиболее распространенных белков, связывающих актиновые мономеры, стабилизирующий и реструктурирующий актиновый цитоскелет клетки
Белки — переносчики липидов nsLTP	Ara h 9 (арахис), Cor a 8 (фундук), Pru p 3 (персик), Par j 2 (постенница), Art v 3 (полынь)	Главные аллергены. Мелкие полипептиды, устойчивые к воздействию температуры, кислот, протеолитических ферментов. Играют роль в защите растений от грибов и бактерий. nsLTPs обнаруживаются в высоких концентрациях во фруктах семейства розоцветных
Белки запаса, проламины (Storage protein)	Ara h1, Ara h 2, Ara h3, Ara h6, Ara h7 (арахис), Ber e1 (бразильский орех), Glym 5, Glym 6 (соя), Cor a 9 (фундук), Tri a 19 (пшеница)	Главные аллергены. Белки запаса — это аминокислоты, кислоты, соли, используемые в качестве источника питательных веществ во время прорастания семян, в яйцах животных. Устойчивы к действию высоких температур и пищеварительных ферментов
Полкальцины — Са-связывающие протеины	rPhlp7 (timoфеевка), rBet v 4 (береза)	Минорные вторичные аллергены. Широкий спектр кальцийсвязывающих белков
Перекрестно-реактивные карбонатные детерминанты (CCD)	CCD MuFx3, Ana c 2 (ананас, бромелайн)	Минорные вторичные аллергены. Молекулы углеводов, связанные с белками, вызывают перекрестные реакции (клинически не значимые). Представлены в растениях, пыльце, ядах насекомых
Тропомиозины	rPen a1 (коричневая креветка), nPen i 1 (креветка индийская), nPenm1 (креветка тигровая), nBlag 7 (таракан)	Фибриллярные белки, участвующие в регуляции взаимодействия актина и миозина
Сывороточные альбумины	rFel d2 (кошка), nCan f3 (собака), Bosd6 (молоко, говядина), nEdu c3 (лошадь), nGal d 5 (яйца, куриное мясо)	Главные аллергены. Отвечают за синдром «свинина–кошка», IgE-антитела к галактоза-α1,3-галактозному углеводному остатку, обнаруженному у гельминтов, млекопитающих, ассоциированы с пищевой аллергией на красное мясо
Липокалины	nBos d 5 (молоко), rFeld 4 (кошка), rCan f 6, rCan f 2 (собака), nMus m1 (мышь), Ecu c1 (лошадь)	Главные аллергены животных. Группа транспортных белков с характерной вторичной структурой, перекрестно реагирующие аллергены «кошка–собака–лошадь–крыса»
Парвальбумины	rCyp c 1 (карп), rGad c 1 (треска)	Главные аллергены рыбы. Небольшие мышечные белки с суперустойчивостью к обработке. Во время



## Глава 7. Лабораторная иммунология

Определением спектра специфичных IgE возможно провести дифференциальную диагностику истинной аллергии и аллергических реакций, обусловленных перекрестной реактивностью с другими аллергенами. Выявление сенсibilизации к главным аллергенам у пациентов с поллинозом и/или поливалентной сенсibilизацией к пыльце растений может помочь в решении вопроса о целесообразности проведения и прогнозирования эффективности АСИТ, дать рекомендации по особенностям элиминационной диеты.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7. Лабораторные методы оценки иммунитета

#### 7.7.1. Оценка фагоцитоза: фагоцитарный индекс и фагоцитарное число

Процесс фагоцитоза инициируется рецепторами врожденного иммунитета на поверхности клеток: на макрофагах, нейтрофилах и ДК при попадании в организм патогенов (раздел 7.1.3).

**Микроскопия мазка крови.** Фагоцитарную способность нейтрофилов и моноцитов оценивают в световом микроскопе по фагоцитарной активности — проценту нейтрофилов/моноцитов, фагоцитировавших тест-частицы (латекс, микробная взвесь) в процессе кратковременной (30 мин) инкубации при 37 °С. Среднее число микробов, поглощенное одним активным фагоцитом, является фагоцитарным индексом.

**Phagotest.** Выполняется с использованием проточной цитометрии. Принцип теста: определяются процент фагоцитов, которые поглощают меченные флюоресцеин-изотиоцианатом опсонизированные бактерии *E. coli*, и их активность (количество бактерий на клетку). Снижение фагоцитоза наблюдается у пациентов с сепсисом, почечной недостаточностью и рецидивирующими бактериальными инфекциями. На проточном цитометре подсчитывают клетки, генерирующие зеленый флюоресцентный сигнал. Снижение фагоцитоза наблюдается у больных сепсисом, почечной недостаточностью и рецидивирующими бактериальными инфекциями. У новорожденных сниженный уровень нейтрофилов, обладающих способностью фагоцитировать *E. coli*, носит временный характер и достигает уровня здоровых взрослых через 3 дня после рождения.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.2. Оценка генерации активных форм кислорода

АФК — необходимый компонент врожденного иммунитета, описанный в разделе 7.1.3. Лабораторные методы оценки генерации АФК являются дополнением к показателям поглотительной способности фагоцитов — фагоцитозу — и важным инструментом обнаружения дефектов окислительного взрыва, следующего за фагоцитозом патогенов.

**НСТ-тест (Nitroblue Tetrazolium Test)** — цитохимический тест восстановления красителя нитросинего тетразолия в гранулы диформаза черного цвета под действием АФК. Характеризует бактерицидную активность нейтрофилов. Тест основан на захвате фагоцитами нитросинего тетразолия желтого цвета с последующим его восстановлением в гранулы сине-черного цвета с участием АФК, генерируемых в ходе респираторного взрыва. Используют показатели спонтанной продукции АФК и стимулированной зимозаном, микробной взвесью и др. Генерация фагоцитами АФК является одним из звеньев фагоцитоза, необходимого для обеспечения «переваривающей» патогены способности клеток.

НСТ-тест используют прежде всего для диагностики хронической гранулематозной болезни или для других нарушений фагоцитоза.

**Bursttest** позволяет количественно определить лейкоцитарный окислительный взрыв методом проточной цитофлюориметрии. Он определяет процент лейкоцитов, которые окисляют флюорогенный субстрат дигидрородамин (DHR) 123, и их ферментативную активность (количество родамина 123). Снижение активности взрыва наблюдается у пациентов с хронической гранулематозной болезнью.

**Метод клеточной хемилюминесценции** применяется в основном для приборной оценки функционального состояния фагоцитирующих клеток крови (нейтрофилов, моноцитов и др.) и заключается в том, что специфическим ответом этих клеток на стимул или раздражитель является увеличение продукции свободных радикалов и АФК — кислородный взрыв. На хемилюминометре измеряют спонтанную и индуцированную различными веществами хемилюминесценцию. В качестве клеточных стимулов и раздражителей в различных методиках клеточной хемилюминесценции используется широкий круг веществ и физических факторов: опсонизированный зимозан, форболовый эфир миристиновой и уксусной кислот, формил-метионил-лейцил-фенилаланин, диацилглицерол, агрегированные Ig, ненасыщенные жирные кислоты и лизофосфолипиды, ионофоры кальция, кристаллы сульфата бария, гидрооксипатиты, ураты, частицы полистиролового латекса.

**Оценка АФК альтернативными методами высокoeffективной жидкостной хроматографии.** В качестве альтернативы продукции АФК можно оценить по наличию промежуточных продуктов окисления: малонового диальдегида и гидропероксида фосфатидилхолина, образующихся при повреждении липидов, или дезоксигуанозина, образующегося при повреждении ДНК. Методы детекции — высокoeffективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, ИФА.

Окислительные повреждения активными радикалами связаны с ССЗ, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями. ЦНС чрезвычайно чувствительна к повреждению свободными радикалами из-за относительно

небольшой общей антиоксидантной способности. Окислительная модификация белков меняет их антигенный профиль и приводит к аутоиммунным заболеваниям (СКВ, СД, диффузная склеродермия). Окислительный стресс, вызванный неразрешенным и стойким воспалением, может быть основным фактором, влияющим на изменение динамики иммунных реакций.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.3. Оценка лимфопоэза: TREC и KREC

В диагностике иммунодефицитных состояний применяется метод ПЦР. В процессе созревания Т- и В-лимфоцитов в тимусе и костном мозге происходит формирование клеточных рецепторов посредством рекомбинации генов в цепи эписомальной ДНК, что необходимо для создания уникального участка, распознающего антиген. В каждой такой рекомбинации из цепи вырезается небольшой фрагмент, образующий эксцизионное кольцо. Эти кольца получили названия TREC и KREC. TREC сопровождают созревание практически всех Т-лимфоцитов, а KREC — всех В-лимфоцитов.

На основе ПЦР создана методика измерения уровней TREC и KREC — побочных продуктов рекомбинации генов Т- и В-клеточных рецепторов. Снижение количества TREC и/или KREC в крови свидетельствует о наличии иммунодефицитных состояний. TREC является дополнительным инструментом, помогающим дифференцировать комбинированный иммунодефицит и дефицит антител. Метод востребован в системе неонатального скрининга, у взрослых — при контроле клеточного иммунитета у пациентов с онкологическими, гематологическими заболеваниями, ВИЧ, туберкулезом, сепсисом.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

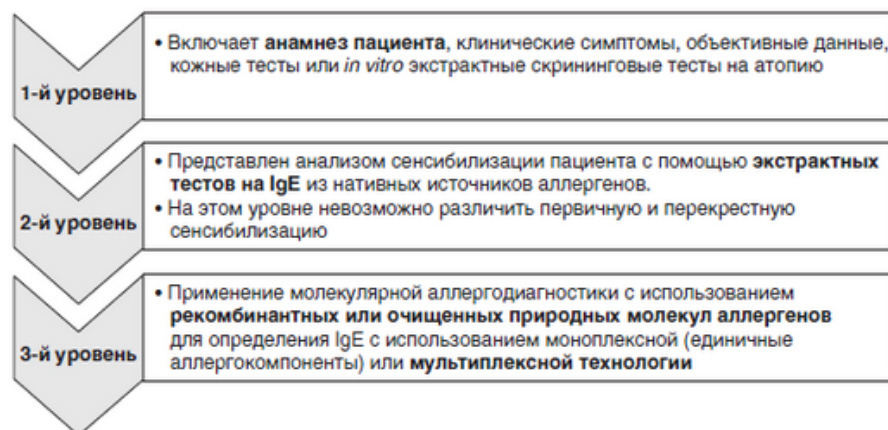
### 7.7.4. Оценка аллергических заболеваний

Лабораторная диагностика аллергических заболеваний проводится для каждого аллергического заболевания в соответствии с клиническими рекомендациями, которые рассматриваются коллективами экспертов (аллергологов, пульмонологов, педиатров, дерматологов), утверждаются МЗ РФ и подлежат пересмотру каждые 3 года. Основные этапы диагностики аллергии включают неспецифические и специфические методы обследования. **Неспецифические методы диагностики аллергических заболеваний** включают ОАК, общий анализ мочи, копрограмму, исследование кала на яйца гельминтов, цитологические исследования (отделяемое носа, глаз, мокрота, жидкость БАЛ и др.), биохимический анализ крови, определение белковых фракций в сыворотке крови, определение маркеров воспаления (СРБ, прокальцитонин, пресепсин), анализ крови на ВИЧ, микробиологические исследования (посевы из очагов инфекции с определением чувствительности к антибиотикам).

**Специфические методы аллергодиагностики** проводят в зависимости от предполагаемой аллергической реакции. Тестирование, проводимое врачом-аллергологом, является «золотым стандартом» диагностики аллергии, поскольку позволяет *in vivo* с помощью кожных и провокационных тестов выявить степень сенсибилизации к предполагаемому причинному аллергену.

Ключевой вопрос аллерголога — есть ли у пациента IgE-зависимые реакции? Лабораторные методы поиска продукции IgE на этиологически значимые аллергены, а также связь между причиной (аллергеном) и следствием (аллергическим заболеванием) чаще проводится при несовпадении данных аллергологического анамнеза и результатов аллергологического обследования (кожные пробы, провокационные тесты), при невозможности проведения аллергопроб в острой фазе заболевания.

Для ведения пациента с аллергическим заболеванием необходимо выявление источника и определение сенсибилизирующего, клинически значимого аллергена. В современный алгоритм включены подробный аллергоанамнез и стандартное IgE-тестирование на основе экстрактов. Однако в случае полисенсибилизации эти традиционные диагностические «экстрактные» тесты могут оказаться недостаточны. Диагностический алгоритм, используемый аллергологом для пациента с IgE-зависимым аллергическим заболеванием, включает три этапа (рис. 7.2).



**Рис. 7.2.** Диагностический алгоритм для подтверждения сенсибилизации и идентификации клинически значимого аллергена (аллергенов)

**1-й этап.** Данные анамнеза и оценка клинических симптомов — основа диагностики, особенно в случае респираторной аллергии, для выбора предполагаемого причинно-значимого аллергена (аллергенов) для проведения следующего этапа специфического аллергообследования. Проводят кожное тестирование с группой аэроаллергенов или определяют аллерген-специфические иммуноглобулины E (sIgE) с экстрактами отдельных аллергенов или группой аллергенов. Кожные тесты должны включать соответствующие данному географическому району аллергены, выполняться только со стандартизированными экстрактами с оценкой положительного и отрицательного контроля (реакция на гистамин и контрольную жидкость) и, несмотря на низкий риск системных реакций у клинически стабильных пациентов, под наблюдением врача с доступом к оборудованию для оказания неотложной помощи при анафилаксии.

**2-й этап.** При наличии противопоказаний к кожным тестам или полученном нечетком результате проводят тесты *in vitro* — определение sIgE-антител с экстрактами смесей аллергенов или отдельными аллергенами. Основные показания для назначения лабораторных методов аллергодиагностики: ранний детский возраст; пожилые; пациенты с высокой степенью сенсибилизации; непрерывно рецидивирующее течение заболевания без периодов ремиссии; невозможность отмены принимаемых антигистаминных препаратов; поливалентная сенсибилизация, когда нет возможности провести тестирование *in vivo* сразу со всеми предполагаемыми аллергенами в ограниченные сроки обследования; измененная реактивность кожи (например, у пожилых); ложноположительный или ложноотрицательный результат при кожном тестировании. Для оценки клинической значимости результатов кожных проб и/или положительных уровней sIgE антител с экстрактами аллергенов эти данные сопоставляют с анамнезом и клиническими симптомами. При их расхождении применяют дополнительные тесты *in vitro*: определение sIgE к аллергенным молекулам, методы молекулярной аллергодиагностики (PAMD — точная молекулярная диагностика аллергии) и провокационные тесты по показаниям.

**3-й этап.** В клинических ситуациях, когда традиционными (экстрактными) тестами не удается достоверно идентифицировать аллерген (аллергены), необходимый для проведения АСИТ, и важен прогноз эффективности АСИТ, используют методы молекулярной аллергодиагностики. У пациентов с положительными результатами кожных тестов на аллергены разных групп необходимо определить, имеет ли место полисенсибилизация или «замаскированная» моносенсибилизация, разделить истинную и перекрестную сенсибилизацию.

**Общий IgE, sIgE** определяют ИФА и его модификациями для количественного определения. Для выявления аллергических реакций необходимо использовать методы ИФА III поколения с точностью от 0,15 кЕд/л. Согласно требованию ВОЗ, 1 МЕ/мл соответствует 2,4 нг/мл IgE. Калибровка тест-систем должна соответствовать IgE-референс-стандартам (IRP 75/502, IRP 11/234), содержащим 13 500 МЕ/мл после разведения. Для IgG используют стандарт IRP 67/86.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Для проведения АСИТ необходимо наличие sIgE к главным (мажорным) аллергенным молекулам в корреляции с клиническими проявлениями аллергического заболевания.

Сопоставление данных анамнеза, более чем на 70% определяющего клинический диагноз, с результатами, полученными с помощью лабораторных методов специфической диагностики, выявило достаточно большой процент несовпадений. Причины несовпадений:

- несоответствие экстрактов аллергенов, используемых для диагностики *in vitro*, экстрактам аллергенов, используемых для диагностики *in vivo*;
- специфический IgE отражает реализацию лишь одного типа аллергической реакции из возможных четырех механизмов развития;
- по уровню специфического IgE к аллергену невозможно утверждать, что этот аллерген является основной причиной аллергической реакции;
- низкий уровень общего IgE не отражает отсутствия сенсибилизации к аллергену, поскольку повышенным может быть только специфический IgE;
- низкий уровень специфического IgE в периферической крови может быть связан с локальной аллергической реакцией (например, локальный аллергический ринит).

Сенсибилизация к аллергену не всегда свидетельствует об активности и тяжести аллергии, поэтому для выяснения причинного аллергена используется молекулярная аллергодиагностика, которая помогает идентифицировать мажорные и минорные аллергены (табл. 7.17). При выявлении значительной сенсибилизации к мажорным аллергенам можно сделать вывод о значимости этого аллергена и тяжести аллергии.

**Таблица 7.17.** Основные аллергокомпоненты, обнаруженные в наиболее важных источниках аллергенов

Источник	Мажорный аллерген	Минорный аллерген
Тимофеевка	Phl p 1, Phl p 5	Phl p 2, Phl p 4, Phl p 6, Phl p 11
Береза	Bet v 1	Bet v 6
Олива	Ole e 1	Ole e 7, Ole e 9, Ole 5, Ole 6, Ole 10, Ole 11
Полынь	Art v 1	Art v 3, Art v 6
Клещ домашней пыли	Der p 1, Der p 2, Der p 23	Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 11, Der p 14, Der p 15, Der p 18, Der p 21, Der p 24
Кошка	Fel d 1	Fel d 3, Fel d 5, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8

Собака	Can f 1	Can f 5
Яблоко	Mal d 3	—
Лесной орех	Cor a 14, Cor a 8, Cor a 9	Cor a 6, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13
Молоко коровье	Bos d 4 (α-lactalbumin), Bos d 5 (α-lactoglobulin), Bos d 8 (casein)	Bos d 2, Bos d 3, Bos d, Bos d 7, Bos d Lactoferrin
Пшеница	Tri a 14, Tri a 19 (ω-5 gliadin)	Tri a 18, Tri a 20, Tri a 25, Tri a 26, Tri a 37, Tri a 30, Tri a 41, 42, 43, 44, 45

Использование молекулярной аллергодиагностики влияет на выбор аллергенов для АСИТ как минимум у 50% пациентов, что имеет большое значение для пациентов с полисенситизацией, поскольку точный подбор аллергенов для АСИТ обеспечивает не только клиническую, но и экономическую выгоду. Молекулярная аллергодиагностика позволяет выявлять перекрестно-реактивные компоненты аллергена. Как правило, это минорные аллергенные компоненты, которые не используются в АСИТ.

Показания для проведения молекулярной аллергодиагностики:

- определение причинно-значимого аллергена перед АСИТ;
- при расхождении данных анамнеза и результатов кожного тестирования;
- полисенситизированным пациентам с круглогодичными клиническими проявлениями и отсутствием четко очерченной сезонности для определения основной и перекрестной реактивности и решения вопроса о целесообразности назначения АСИТ;
- пациентам без эффекта от предыдущей АСИТ для уточнения профиля сенситизации в отсутствие положительного ответа на проводимую АСИТ.

**Преимущества и недостатки *in vitro*-методов аллергодиагностики.** Методы *in vitro* отличаются полной безопасностью для пациента, объективностью, количественным характером и быстротой получения результатов исследований (табл. 7.18). При неэффективности схемы лечения, назначенной по результатам кожных проб, дополнительное проведение компонентной аллергодиагностики заставляет сменить АСИТ в половине случаев.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**Таблица 7.18.** Лабораторные методы диагностики аллергических заболеваний

Цель выявления	Методы определения	Лабораторные показатели (тесты)
Наличие сенситизации к специфическому аллергену (IgE)	ИФА — количественный метод, иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite), иммунофлюоресцентный анализ (ImmunoCap), иммуноблот (RIDA-панели, PROTIA Allergy-панели), аллергочипы (ISAC, ALEX)	Общий IgE
		Специфический IgE — аллерген, аллергокомпонент
		Специфический IgE — смесь аллергенов
		Специфический IgE — панель аллергенов
		Специфический IgE — аллергочип
		Аллергокомпоненты — панель
Медиаторы аллергических реакций	ИФА — количественный метод, иммунофлюоресцентный анализ, ионообменная хроматография*, высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией*, D-НIT (метод деградации гистамина)*, проточная цитофлюориметрия*	Гистамин, триптаза
		Эозинофильный катионный белок (ECP), диаминооксидаза (DAO)
		Цитокины
		Продукты распада арахидоновой кислоты: лейкотриены E4, B4, ПГ F
		Определение в сыворотке крови концентрации sCD23
		Хемокины CCL17/TARC
Активация базофилов	Проточная цитофлюориметрия (тест дегрануляции базофилов), ИФА (определение количества лейкотриенов)	CAST (Cellular Antigen Stimulation) CD63, CCR
		Аллергофлоу (CD294, CD3, CD203c)

\* Методы, не имеющие стандартных протоколов исследования, не рекомендованные в клинических рекомендациях, используются для научных целей.

Основным недостатком лабораторной диагностики является невозможность полностью заменить методы диагностики *in vivo*, которые проводит аллерголог. Есть объективные трудности широкого внедрения данных методов в медицинскую практику. Они связаны с необходимостью использования высокотехнологичного современного оборудования, а также соответствующих реактивов и тест-систем.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.5. Циркулирующие иммунные комплексы

Циркулирующие иммунные комплексы образуются в результате связывания антигенов с антителами в кровеносном русле или вне сосудов (иммунные комплексы *in situ*). Циркулирующие иммунные комплексы вызывают повреждение при попадании в стенку кровеносных сосудов или в фильтрующие структуры (гломерулярный фильтр в почках). Заболевания, обусловленные иммунными комплексами, могут быть генерализованными, если иммунные комплексы образуются в крови и оседают во многих органах, или связанными с отдельными органами, такими как почки (гломерулонефрит), суставы (артрит) или мелкие кровеносные сосуды кожи (местная реакция Артюса). Повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов возможно обнаружить при острых инфекционных заболеваниях, персистирующих инфекциях, аутоиммунных заболеваниях (острая ревматическая лихорадка, СКВ, РА, ПМ, склеродермия, болезнь Шегрена (БШ), васкулит, криоглобулинемия, реактивный артрит), остром гломерулонефрите, феномене Артюса (местная реакция на введение антигена), сывороточной болезни, новообразованиях. Исследование циркулирующих иммунных комплексов проводится методом ИФА. Клиническое значение имеет только кратное (в 2, 3 раза и более) повышение содержания циркулирующих иммунных комплексов. Референсные значения: в сыворотке, плазме крови — 0–120 у.е. Интерферирующее влияние могут оказать криоглобулины и анти-C1q-антитела.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.6. Оценка системы цитокинов: цитокиновый статус, интерфероновый статус

**Цитокиновый статус** — понятие, объединяющее показатели активности цитокинов, систем IFN, маркеров клеточной пролиферации, обеспечивающие физиологические реакции организма в ответ на вирусные и бактериальные инфекции, а также внешние воздействия разной природы, включая лекарственную терапию.

Для количественного определения цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, 23, ФНО- $\alpha$ ; IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; TGF $\beta$ , VEGF, TGF, FGF) широко применяются ИФА, определение матричных РНК (мРНК) цитокинов методом ПЦР-РВ. В качестве дополнительных используют подходы:

- генетический анализ мутаций генов цитокинов, их рецепторов, внутриклеточных систем синтеза и передачи сигнала;
- анализ полиморфизма генов цитокинов;
- изучение уровня продукции цитокинов в культуре клеток;
- определение концентрации цитокинов в ткани;
- изучение синтеза цитокинов в отдельных клетках или тканях.

На практике точное определение цитокинов является сложной задачей из-за их низкого уровня в организме (в пмоль-диапазоне), динамических процессов их секреции и короткого периода полураспада. Цитокины образуют сложные сети, служащие для модуляции иммунных процессов; различные цитокины могут оказывать антагонистическое, аддитивное или синергетическое влияние на один и тот же биологический процесс. Из-за чрезвычайной сложности сети измерение цитокинов в режиме реального времени во время их реакции на окружающую микроэлементную среду остается сложной задачей.

**Интерфероновый статус** позволяет определить количественные параметры физиологического интерферонового ответа у здоровых людей и выявить интерферодефицитные синдромы при острых, хронических, рецидивирующих инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, первичных и вторичных иммунодефицитах.

*Биологический метод* оценивает уровень IFN по задержке деструкции монослоя диплоидной культуры фибробластов после внесения тест-вируса (вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита мышей). Для оценки индуцированного синтеза IFN *in vitro* в качестве индуктора синтеза IFN $\alpha$  применяется вирус болезни Ньюкасла, в качестве индуктора синтеза IFN $\beta$  — фитогемагглютинин. Индивидуальная чувствительность пациента к препаратам IFN, индукторам IFN и иммуномодуляторам оценивается по степени изменения IFN-продуцирующей способности его клеток под действием данных препаратов.

Лабораторные методы оценки интерферонового статуса.

- Уровень циркулирующего IFN (сывороточный IFN).
- Спонтанная продукция IFN *in vitro*.
- Индуцированный синтез IFN $\alpha$  *in vitro*.
- Индуцированный синтез IFN $\beta$  *in vitro*.
- Определение чувствительности к препаратам IFN [интерферон гамма человеческий рекомбинантный (Ингарон $\Delta$ ), интерферон альфа-2b (Интрон А $\Delta$ ), интерферон альфа-2b (Реаферон-ЕС $\Delta$ ), интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (Реальдирон $\Delta$ ), интерферон альфа-2a (Роферон-А $\Delta$ )].

- Определение чувствительности к индукторам IFN [*тилорон (Амиксин<sup>®</sup>)*, *Кагоцел<sup>®</sup>*, *оксодингидроакридинилацетат натрия (Неовир<sup>®</sup>)*, *мегломина акридоацетат (Циклоферон<sup>®</sup>)*].
- Определение чувствительности к иммуномодуляторам [*аминодигидрофалазиндион натрия (Галавит<sup>®</sup>)*, *треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (Гепон<sup>®</sup>)*, *эхинацеи пурпурной травы сок (Иммунал<sup>®</sup>)*, *аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (Имунофан<sup>®</sup>)*, *пептидогликан кислый из ростков картофеля (Иммуномакс<sup>®</sup>)*, *глюкозаминилмурамилдипептид (Ликопид<sup>®</sup>)*, *азоксимера бромид (Полиоксидоний<sup>®</sup>)*, *тимуса экстракт (Тактивин<sup>®</sup>)*, *альфа-глутамил-триптофан (Тимоген<sup>®</sup>)*, *пидотимод (Имунорикс<sup>®</sup>)*, *картофеля побегов сумма полисахаридов (Панавир<sup>®</sup>)*, *инозин пранобекс (Изопринозин<sup>®</sup>)*].

**Особенности оценки цитокинов.** Оценить диагностическую значимость цитокинов сложно из-за отсутствия референсных интервалов цитокинов. Цитокины существенно различаются у разных людей, их высвобождение и последующие эффекты могут различаться в зависимости от активирующих сигналов, конкретных клеточных мишеней и физиологических факторов, включая стресс, уровень физической подготовки и режим питания. Цитокины могут различаться в разных физиологических локализациях и средах. Поэтому результаты исследования цитокинов должны сравниваться с результатами других исследований той же биологической жидкости, полученными в схожих условиях. Из-за отсутствия однозначности нормальных и аномальных уровней цитокинов конкретные клинические предельные уровни цитокинов для болезненных состояний установить сложно. Тем не менее для ориентировки приводим данные по содержанию цитокинов в разных биологических средах (**табл. 7.19**).

**Таблица 7.19.** Концентрации цитокинов в различных жидкостях организма, пг/мл

Цитокины	Период полураспада	Сыворотка	Плазма	Слюна	Слезы	Кал
IL-1 â	21 мин	0–78	1,5±1,2	1,5–5,3×10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> ±2,8	—
IL-6	15,5 ч	0–70	22±8,6	0–27	1,3×10 <sup>2</sup> ±12	0,3±0,1
IL-8	24 мин	24–36	9,4±3,7	0,4–3,2×10 <sup>2</sup>	—	—
IL-12	—	20–56	1,2×10 <sup>2</sup> ±8,6	0–7,6	47	—
ФНО-â	18 мин	0–12	5,9±0,4	0–5,8	48±3,3	1,8±0,3
IFNâ	—	(1,2–1,6)×10 <sup>2</sup>	7±2,5	0–7	42±3,6	0,4±0,2
IL-1PA	4–6 ч	(1–1,7)×10 <sup>2</sup>	50±21	—	(3,9±0,9)×10 <sup>3</sup>	—
IL-4	20 мин	6,9–8,1	(2,3±0,5)×10 <sup>2</sup>	—	21±1,6	—
IL-10	—	8,5–17	38±2,1	0–10	37±0,9	—

## Глава 7. Лабораторная иммунология

Распространенным способом оценки диагностической точности отдельных биомаркеров является использование ROC-анализа, отображающего истинную положительную частоту («преимущества») по сравнению с ложноположительной частотой («издержки») конкретного заболевания при разных предельных значениях соответствующего биомаркера. Оптимальное предельное значение может быть установлено путем идентификации точки на ROC-кривой с наивысшей чувствительностью и специфичностью для максимальной диагностической возможности обнаружения различий между исследуемой и контрольной группами пациентов.

Большинство состояний, для которых были изучены ассоциации цитокинов и их клинические предельные уровни, можно разделить на три категории: инфекции и послеоперационные инфекции, наследственные и хронические заболевания, а также акушерские и гинекологические состояния (**табл. 7.20**).

**Таблица 7.20.** Заболевания и цитокины, имеющие диагностическое значение

Болезни	Цитокины
Аутоиммунные заболевания	IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-23, TNF-â, IFNâ, IFNâ
Аллергия	IL-1, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13
Болезнь Альцхаймера	TNF-â, TGFâ, IL-1, IL-4, IL-6, IL-10
Атеросклероз	TNF-â, IFNâ, TGFâ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IL-20, IL-33, IL-37
ССЗ	TNF-â, TGFâ, IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18
Рак	TNF-â, TRAIL, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23
Депрессия	TNF-â, IFNâ, IL-1, IL-2, IL-6
Желудочно-кишечные заболевания	TNF-â, IFNâ, TGFâ, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10
Сепсис	TNF-â, IFNâ, TGFâ, MIF, IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, IL-12
Старение	IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-â, IFNâ

У пациентов с острой вирусной инфекцией, проявлениями аллергии, в состоянии стресса отмечаются повышенное содержание базового сывороточного IFN и низкие показатели индуцируемой выработки IFN $\alpha$ ,  $\beta$ . Для хронических инфекционных заболеваний вирусного происхождения характерно целостное подавление всех параметров интерферонового статуса. В случае аутоиммунных патологий наблюдается угнетение индуцируемой выработки иммунной системой IFN $\alpha$ . Для состояний лепры, острого лимфолейкоза, онкологии характерно угнетение индуцируемого производства IFN $\alpha$ . У больных крапивницей, бронхиальной астмой степень сывороточного IFN соответствует степени тяжести заболевания. Низкий уровень выработки IFN служит критерием для назначения IFN-стимулирующего лечения. Количественное определение цитокинов дает ценную информацию для мониторинга иммунного статуса пациентов и корректировки методов лечения таких заболеваний, как бронхиальная астма, депрессия, болезни сердца, СПИД, повреждение почек, сепсис, РА и другие хронические заболевания.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.7. Иммуноглобулины

**IgA** представлен двумя формами — сывороточной и секреторной. По количеству синтезируемых Ig IgA — наибольшая фракция. Однако в сыворотке IgA составляет 10–15% общего количества Ig, так как основное количество IgA сосредоточено в секретах (слезной жидкости, слюне, поте, желчи, слизи бронхиального и кишечного эпителия, влагалище, сперме), обеспечивая антибактериальную и противовирусную защиту поверхностей. Сывороточные IgA вызывают активацию комплемента по альтернативному пути, а также обеспечивают специфическое связывание некоторых антигенов. Секреторные IgA, продуцируемые В-клетками, внутри слизистого слоя связываются с бактериями и предупреждают их адгезию к стенке, что обеспечивает защиту организма от проникновения внутрь бактерий. Присутствие IgA в грудном молоке защищает новорожденных от кишечной инфекции.

*Референсные значения:* IgA у взрослых в сыворотке/плазме крови — 0,7–4,0 г/л. *Причины повышения* уровня IgA: хронические заболевания печени (поздняя стадия гепатита, цирроз), хронические инфекции, саркоидоз, аутоиммунные заболевания (РА, СКВ), IgA-миелома, синдром Вискотта–Олдрича, муковисцидоз, болезни органов дыхания.

*Причины снижения* уровня IgA: врожденные и приобретенные иммунодефициты, телеангиэктазия, не-IgA-миелома, гастроэнтеропатии с потерей белка, потеря белка через кожу при ожогах.

*Влияющие факторы.* Увеличение содержания: возраст, мужской пол, уровень билирубина, прием лекарственных препаратов (метилдопа, оксифенизатин).

Снижение содержания: курение, прием лекарственных препаратов (каптоприл, декстран, карбамазепин, циклоспорин, глюкокортикоиды, левотироксин натрия, ловастатин, оральные контрацептивы, эстрогены).

**IgD** присутствует в плазме крови в низких концентрациях (около 1% всех Ig). IgD образуется в В-лимфоцитах и остается прикрепленным к их поверхности. Это преобладающий Ig на поверхности развивающихся В-клеток.

*Референсные значения:* IgD — менее 0,15 г/л сыворотки/плазмы крови.

*Причины повышения* уровня IgD: аутоиммунные заболевания, аутовоспалительные заболевания, синдром гиперпродукции IgD вследствие дефицита мевалонат-киназы, хронические инфекции, некоторые заболевания печени, IgD-миелома.

*Причины снижения* уровня IgD: наследственные и приобретенные иммунодефицитные состояния, не-IgD-миелома, злокачественная меланома.

**IgE** — минорный класс Ig (около 0,2% всех сывороточных Ig). Накапливается преимущественно в коже и слизистых оболочках, где сорбируется за счет Fc-рецепторов на поверхности тучных клеток, базофилов и эозинофилов.

В результате присоединения специфического антигена происходят дегрануляция этих клеток и выброс биологически активных веществ (медиаторов воспаления), что приводит к клиническим проявлениям аллергии.

*Референсные значения* в сыворотке/плазме крови: <0,3 мг/л (<100 МЕ/мл).

*Причины повышения* уровня IgE: атопические аллергические заболевания (бронхиальная астма, ринит, крапивница, экзематозный дерматит, атопический дерматит), паразитарные инвазии (аскариды, токсоплазма, нематоды, шистосомы, анкилостомы, эхинококки, трихинеллы), болезнь Ходжкина (лимфогранулематоз), системные лейкозы, IgE-миелома.

*Причины снижения* уровня IgE: наследственные и приобретенные иммунодефициты, первичный билиарный цирроз, язвенный колит, атаксия, телеангиэктазия, не-IgE-миелома.

**IgG** составляет около 75% Ig сыворотки крови человека. IgG — единственный Ig, проникающий через плацентарный барьер из крови матери в кровь плода (активный транспорт), обеспечивающий защиту новорожденных от инфекции. Из общего количества IgG примерно 65% составляет IgG1, 25% — IgG2, 6% — IgG3 и 4% — IgG4. Несмотря на более чем 90% гомологии аминокислотной последовательности, молекулы разных подклассов IgG характеризуются разными биологическими свойствами относительно связывания с антигеном, образования иммунных комплексов, активации комплемента, связывания с эффекторными клетками, периода полужизни, транспорта через плаценту. Различия определяются структурными различиями в тяжелых  $\gamma$ -цепях. IgG1, IgG2 и IgG4 осуществляют активацию комплемента по классическому пути, что обуславливает их важнейшую роль в образовании иммунных комплексов и нейтритализации токсинов. Дефицит субклассов IgG может быть бессимптомным или ассоциированным с гетерогенной группой связанных заболеваний (инфекционных, аллергических, аутоиммунных). Дефицит подклассов IgG является общей чертой синдрома первичного иммунодефицита, часто бывает при вторичном иммунодефиците, что определяется дефектами иммунной системы. Первичный иммунодефицит может привести к рецидивирующим протозойным, бактериальным, грибковым и вирусным инфекциям разной степени тяжести. Вторичный иммунодефицит может быть вызван патологическими состояниями, включая злокачественные новообразования, нарушения обмена веществ. Избирательный дефицит одного или нескольких подклассов IgG может быть ассоциирован как с первичным, так и с вторичным иммунодефицитом.

*Референсные значения:* IgG у взрослых в сыворотке/плазме крови — 6–14 г/л. *Причины повышения уровня IgG:* хронические инфекции (туберкулез, инфекционный мононуклеоз, бактериальный эндокардит, лепра), аутоиммунные заболевания (СКВ, РА, синдром Шегрена), саркоидоз, IgG-миелома, коллагенозы, хронические заболевания печени, в том числе цирроз, паразитарные болезни.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

*Причины снижения уровня IgG:* наследственный и приобретенный дефицит, синдромы с потерей белка, не-IgG-миелома, МВ.

*Влияющие факторы.* Увеличение содержания: возраст, физическая нагрузка (мышечная работа), гипербилирубинемия, прием лекарственных препаратов (метилдопа, оксифенизатин, наркотические препараты). Снижение содержания: беременность, хирургические операции, курение, лекарственные препараты (циклоsporин, декстран, ловаcтатин, глюкокортикоиды).

**IgM** составляет 5–10% Ig сыворотки крови, синтезируется при первичном иммунном ответе, способен к активации комплемента, в связи с чем служит посредником в цитотоксических реакциях. К IgM принадлежат антимикробные антитела, антитела к системе групп крови АВ0, холодовые аутоиммунные противояритроцитарные антитела, РФ. IgM имеет большое значение в возникновении и поддержании аутоиммунных заболеваний.

*Референсные значения:* IgM у взрослых в сыворотке/плазме крови — 0,4–2,3 г/л.

*Причины повышения уровня IgM:* острые и хронические инфекции (особенно вирусные), паразитарные инвазии (трипаносомия, токсоплазмоз), болезни печени, нефротический синдром, аутоиммунные заболевания, МВ, гипер-IgM-дисгаммаглобулинемия.

*Причины снижения уровня IgM:* наследственный и приобретенный дефицит, синдромы с потерей белка у детей, не-IgM-миелома.

*Влияющие факторы.* Увеличение содержания: физическая нагрузка (мышечная работа), беременность, эстрогены, гипербилирубинемия. Снижение содержания: менопауза, курение, прием лекарственных препаратов (декстран, глюкокортикоиды, ловаcтатин, оральные контрацептивы, метилдопа, наркотические препараты).

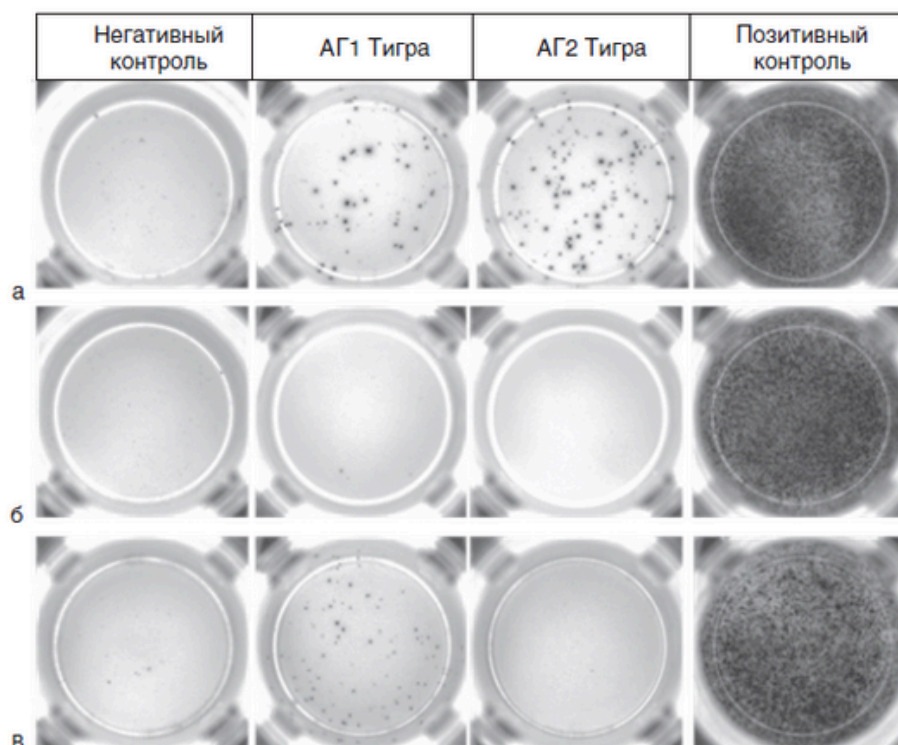
## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.7.8. Технология ELISpot

Технология ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot) представляет собой анализ количества клеток, секретирующих цитокин, является одним из вариантов анализа высвобождения  $\gamma$ -интерферона (interferon-gamma release assays — IGRA), основана на способности Т-лимфоцитов вырабатывать этот цитокин при воздействии специфических антигенов. ELISpot может быть использован для разработки вакцин, диагностики туберкулеза, при изучении онкологических и аллергических заболеваний, для характеристики моноцитов-макрофагов-ДК. ELISpot Т-клеток используется для характеристики подмножеств Т-лимфоцитов, в зависимости от вырабатываемых ими цитокинов. Измерение реакции Т-клеток посредством продукции цитокинов позволяет изучать эффективность вакцин. Наиболее известным типом анализа ELISpot является T-SPOT, используемый для диагностики туберкулеза, особенно его латентных форм. Рассматривается возможность исследования Т-клеточного иммунитета при некоторых вирусных заболеваниях, в том числе при COVID-19.

Технология ELISpot включает нанесение цитокин-специфических моноклональных антител на дно лунки планшета. Затем в лунки вносят анализируемые клетки, например выделенные на градиенте плотности лимфоциты, а также антигены, стимулирующие секрецию цитокинов. Поскольку клетки окружены цитокин-специфичными моноклональными антителами, которые покрывают стенки лунок, цитокин, секретируемый инкубированными клетками, начнет прикрепляться к антителам в определенном эпитопе. После окончания инкубации клетки удаляют, а лунки промывают. Затем в лунки вносят биотинилированные антитела, специфичные для обнаружения цитокинов. Выделенный клетками цитокин остается фиксированным к антителам, прикрепленным на дне лунки, и связывается с биотинилированными антителами. Внесение в лунки конъюгата стрептоavidина необходимо для связывания детектирующих антител. Добавление субстрата катализирует конъюгат, в результате выделяется нерастворимый осадок, образующий в лунках пятна. Образовавшиеся пятна можно прочесть на автоматическом считывателе ELISpot или подсчитать под диссекционным микроскопом. Пример результатов теста представлен на **рис. 7.3**.





**Рис. 7.3.** Пример использования теста ELISpot для оценки иммунитета при COVID-19: а — пациент, переболевший COVID-19; б — неболевающий человек; в — человек после вакцинации «Спутником V»

**ТВ-фероновый тест (диагностика туберкулеза, ТВ-Feron IGRA)** основан на измерении  $IFN\gamma$  (IGRA-тест), вырабатываемого сенсибилизированными Т-лимфоцитами в ответ на специфические антигены *M. tuberculosis* (невакцинные ESAT-6 и CFP-10) методом ИФА. Тест важен для диагностики латентной туберкулезной инфекции и активного туберкулеза у тех пациентов, которым нежелательно делать «Диаскинтест» (острые инфекции, в том числе ВИЧ, аллергические реакции).

**Гены иммунного ответа. Молекулярно-генетическое исследование.** Одним из наиболее перспективных направлений современной иммунологии и медико-биологической науки в целом является иммуногенетика. Яркий пример проявления полиморфизма генов — МНС, контролирующей распознавание антигена и запуск наиболее эффективного из всего многообразия защитных механизмов варианта иммунного ответа. На сегодняшний день эта система генов насчитывает более 10 000 аллельных вариантов. Эти гены объединены сходной функцией — обеспечение неспецифической защиты организма от чужеродных агентов без стадии распознавания генетически чужеродных агентов. С развитием представлений о структуре генома расширился спектр генов, рассматриваемых в контексте установления индивидуальных и популяционных различий в иммуногенетическом статусе человека. Важным достижением биомедицинской науки стало установление роли генетического полиморфизма на уровне одиночных нуклеотидных замен, причем под одиночными заменами понимаются как SNP — достаточно распространенный и стабильный с эволюционной точки зрения тип генетического полиморфизма, так и высокочастотные мутации, представляющие собой тот же тип генетических вариаций. В настоящий момент в геноме человека насчитывается более 50 млн уникальных вариантов последовательностей генов, представленных SNP (по данным сайта [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Многие из них расположены в не-HLA-генах иммунного ответа, играющих ключевую роль в распознавании сигналов, дифференцировке и регуляции компонентов клеточного и гуморального иммунитета и, как следствие, в защите человека от огромного числа внешних и измененных собственных антигенов. Комбинации аллелей, закрепившиеся в силу биологической целесообразности среди представителей тех или иных этнических групп, определяют адаптационный потенциал человека и наилучшим образом обеспечивают его биобезопасность. В связи с этим установление меж- и внутрипопуляционного полиморфизма генов иммунного ответа имеет глубокую фундаментальную и практическую значимость для биомедицинской науки. Переходя с уровня генетического контроля защитных механизмов на фенотипический уровень, следует признать, что глубокое понимание причин развития патологических процессов требует комплексного, системного подхода к анализу наследуемых и функциональных факторов, а также факторов окружающей среды, которые вместе формируют уникальный для данного организма иммунофизиологический статус. В настоящее время диагностика функциональных и клинических признаков ведется, как правило, средствами прямого измерения активности (концентрации) маркера патологического процесса (маркеры апоптоза, воспаления, метаболиты органических и неорганических веществ) или оценки текущего физиологического состояния человека. Эти методы часто не дают объяснения причин развития патологий и не оставляют возможности для своевременного назначения терапии или ее коррекции. Комплексная оценка иммуногенетических и иммунофизиологических параметров организма позволяет решить эти вопросы, а также открывает новые возможности в области профилактики и прогнозирования риска развития патологий.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8. Методы иммунодиагностики

Иммунодиагностика — вид лабораторных исследований, основанных на способности антител специфически связываться с антигеном. Иммуноанализы используют преимущества высокоселективных взаимодействий между специфическими Ig и антигенами-мишенями, являясь одними из наиболее клинически значимых методов. Химический состав белков позволяет использовать различные стратегии модификации их структуры с ограниченным нарушением их антигенсвязывающей активности. Эта функция позволяет сочетать иммуноанализы с рядом различных методов детекции, включая визуальную (иммуногематология), радиометрическую, флюоресцентную, колориметрическую, хемилюминесцентную, светорассеивающую, электрохимическую детекцию. Обнаружение может быть дополнительно улучшено с помощью ферментативной реакции, ПЦР, различных стратегий усиления сигнала на основе липосом и наноматериалов. Во многих случаях абсолютных уровней биомаркеров в биологических жидкостях или биопсийном материале из тканей недостаточно для постановки надежного диагноза, особенно при заболеваниях, характеризующихся сложными изменениями морфологии тканей и локализованными изменениями экспрессии белка. Более релевантную информацию можно получить, сравнивая пространственное распределение биомаркеров в нормальных и пораженных образцах.

Термин «иммунохимические методы клинико-лабораторного анализа» наиболее полно отражает совокупность современных методик, применяемых в КДЛ. Ключевым принципом иммунохимических методов является участие на разных стадиях проведения лабораторного анализа Ig (моно- и поликлональных антител) и антигенов, входящих в состав тест-систем для лабораторных исследований. В данном случае один из компонентов реакционной смеси является определяемым веществом (образец), другой (компонент иммунной системы находящийся в составе реагентов) обладает специфичностью по отношению к определяемому веществу и является узнающим. Современные иммунохимические методы способны в процессе анализа выявлять как один аналит (определять один показатель), так и несколько диагностических показателей (мультиплексный анализ).

В зависимости от типа применяемой метки, механизма проведения и учета результатов реакции образования иммунных комплексов иммунохимические методы исследования подразделяют на:

- методы без использования специальных меток для выявления результата: к ним относят реакции агглютинации, преципитации, связывания комплемента, лизиса;
- иммунохимические методы с применением специальных меток для выявления результата: принцип данных методов основан на использовании различного рода меток для индикации иммунного комплекса «антиген–антитело» с последующей детекцией физико-химическими методами.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.1. Иммунохимические методы без использования специальных меток

**Преципитация** — формирование и осаждение растворимого молекулярного комплекса антигена с антителами в виде помутнения. Данный комплекс называется преципитатом, образуется при смешивании антигенов и антител в строго эквивалентных количествах, избыток одного из них влияет на уровень образования иммунного комплекса и может искажать результаты реакции. Постановку реакции преципитации можно осуществлять для выявления антигенов по контрольной сыворотке или антител с использованием стандартных антигенов, как в жидких средах в пробирках (реакция кольцепреципитации), так и в геле (агаре), питательных микробиологических средах. Иммунопреципитация лежит в основе методов турбидиметрии и нефелометрии и позволяет оценить количество антител или антигена, присутствующих в изучаемом образце. В качестве реагентов используют преципитирующие сыворотки с высокими титрами антител к гомологичным антигенам. Описано множество вариантов постановок реакции преципитации, но чаще всего для определения антигенов бактерий, наличия и установления количества (титра) антител, активности специфических сывороток используют следующие модифицированные методики: реакцию преципитации в геле, радиальную иммунодиффузию, реакцию иммуноэлектрофореза, реакцию флоккуляции, реакцию кольцепреципитации.

**Агглютинация** — связывание антигенов с антителами в растворе. В ходе этой реакции антигены (микробные клетки, эритроциты, лейкоциты и т.д.) склеиваются антителами и выпадают в осадок в виде иммунных комплексов в форме хлопьев, видимых невооруженным глазом. Связывание антителами антигенных участков приводит к потере определенных функций молекулы или клетки, на этом основан защитный механизм действия антител. Если молекула антигена имеет несколько специфических участков связывания, то антитела могут сшивать их в обширную сеть. Достигнув определенных размеров, такая сеть может выпасть из раствора в осадок. На этом основано определение групп крови, когда эритроциты связываются со специфическими антителами. Реакцию агглютинации обычно используют для определения специфических антител в сыворотке крови больных; определения антигенов возбудителя, выделенного от больного; определения групп крови с использованием моноклональных антител против антигенов эритроцитов. Различают прямую и непрямую реакцию агглютинации.

*Реакция прямой агглютинации.* В этой реакции антитела непосредственно агглютинируют корпускулярные антигены. По характеру образующегося агглютината различают типы агглютинатов (зернистый, хлопьевидный и т.д.).

*Реакция непрямой (пассивной) агглютинации.* Для получения феномена агглютинации антиген предварительно адсорбируют на частицах. В классических серологических тестах в качестве частиц-носителей использовались клетки [эритроциты барана, I(0)-группы крови человека], в этом случае метод называется «гемагглютинация». Более стабильные суспензии образуют инертные частицы (латекс, целлюлоза, полистирол), что позволяет добиться большей стандартизации агглютинационных тестов. Нагруженные антигеном специфические частицы склеиваются в присутствии специфических антител к определяемому антигену и выпадают в осадок. Агглютинация под действием антител класса IgM более эффективна по сравнению с агглютинацией, опосредованной IgG, что обусловлено большей валентностью молекул IgM, содержащей 10 антигенсвязывающих участков. В случае наличия специфических антител

в образце, направленных против антигенов, латексные частицы, сорбированные антигеном, будут агглютинировать в течение 3–4 мин. Реакцию можно оценивать визуально и с использованием микроскопа.

Применяются тесты, основанные на объединении агглютинации и преципитации. В этом случае антиген нанесен на поверхность латексных частиц, но процесс агглютинации учитывается по изменению светопропускания раствора. Такая комбинация значительно увеличивает чувствительность метода, что делает возможным использование этого метода в целях выявления большего числа аутоантител.

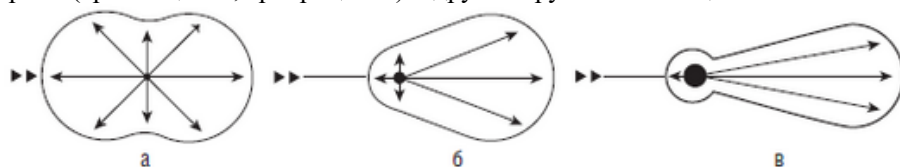
**Нефелометрия и турбидиметрия** — методы количественного иммунохимического анализа, основанные на измерении интенсивности света, рассеянного исследуемой дисперсной системой (нефелометрия) или прошедшего через нее (турбидиметрия).

При *турбидиметрии* проводится измерение прошедшего светового пучка, так же как измеряется и абсорбция при фотометрии. Поэтому в качестве турбидиметра можно использовать большинство фотометров и биохимических анализаторов, так как этот способ не требует особой конструкции прибора. Обычно при турбидиметрических исследованиях используются короткие длины волн. Это связано с тем, что доля рассеянного света увеличивается обратно пропорционально 4-й степени длины волны, соответственно, при меньшей длине волны прошедший свет будет составлять большую часть от падающего, то есть будет более интенсивным.

Турбидиметрия применяется для анализа взвесей, суспензий и других мутных сред. В КДЛ используют иммунотурбидиметрические исследования, основанные на регистрации образования иммунных комплексов «антиген–антитело», сопровождающихся образованием соответствующего преципитата, для повышения мутности применяют латексные частицы, на которые сорбируют антитела. Метод иммунотурбидиметрического исследования позволяет с высокой точностью определять специфические белки, имеющие высокую диагностическую ценность, в том числе Ig.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

При *нефелометрических* определениях измеряют интенсивность рассеянного света под углом к направлению первичного пучка света. Чем больше комплексов «антиген–антитело» находится в растворе, тем больше света будет рассеяно. Характер (тип) рассеивания зависит от соотношения длины волны света ( $\lambda$ ) и диаметра частицы, на которой происходит рассеивание (рис. 7.4). Если размер частиц рассеивающей реакционной смеси значительно меньше длины волны светового потока, проходящего через кювету (диаметр частиц  $< \lambda/10$ ), такой вид рассеивания называют упругим. В основе такого рассеивания лежит явление дифракции. Рассеивание света каждой частицей не зависит друг от друга, рассеянный свет распространяется во всех направлениях. Однако при длине волны 400 нм для частиц диаметром менее 40 нм максимальное количество света рассеивается под углом 0 и 180 к лучу, падающему на частицу. Такой тип рассеивания будет характерен для многих плазменных белков, в том числе Ig,  $\alpha$ -липопротеидов, альбуминов и т.д. При увеличении размеров частиц (для плазменных белков размер в диапазоне от ~40 до 400 нм) рассеивание становится несимметричным, и максимальное количество света рассеивается в направлении падающего луча. Такой тип рассеивания будет характерен при  $\lambda$  400 нм для IgM, хиломикронов и формирующихся комплексов антигенов с Ig. Когда размер частиц превышает длину волны света (в нашем примере диаметр больше 400 нм), несимметричность светорассеивания еще больше увеличивается. Такой тип рассеивания будет характерен для взвеси бактерий, для клеток крови (тромбоцитов, эритроцитов) и других крупных частиц.



**Рис. 7.4.** Характер рассеивания в зависимости от соотношения диаметра частиц ( $d$ ) и длины волны падающего света ( $\lambda$ ): а — характер рассеивания света на частицах, диаметр которых меньше, чем в 10 раз длины волны света ( $d < \lambda/10$ ); б — характер рассеивания при  $d \sim \lambda$ ; в — характер рассеивания при  $d > \lambda$

Если известны размеры частиц рассеивающего вещества, то возможно по интенсивности рассеянного света при фиксированном угле измерения определить концентрацию вещества. Методы, основанные на взаимодействии «антиген–антитело», высокоспецифичны, поэтому практически во всех случаях известно, что измеряется. Исходя из этого, приборы для нефелометрии, как правило, программируются под измерение определенных специфических компонентов биологической жидкости, чаще всего индивидуальных белков. В настоящее время нефелометрия проводится с использованием лазерных высокочувствительных нефелометров, дающих монохроматический поток света.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.2. Иммунохимические методы с использованием специальных меток

Иммунологические методы с использованием специфических меток благодаря высокой ДЧ и ДС широко применяются в КЛД. Принцип этих методов основан на использовании различного рода меток для индикации иммунного комплекса «антиген–антитело» с последующей детекцией. В зависимости от типа метки — радиоизотопная, ферментная, флюоресцентная, хемилюминесцентная — выделяют радиоиммунный анализ (РИА), ИФА, иммунофлюоресценцию, иммунохемилюминесценцию.

**РИА** — высокочувствительный метод количественного определения аналитов в биологических жидкостях, основанный на реакции «антиген–антитело» с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом. Интенсивность радиоактивного излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена

и антител, детекция осуществляется в зависимости от метки на  $\alpha$ - или  $\beta$ -счетчиках. РИА позволяет определять биологически активные вещества, гормоны, белки с очень высокой чувствительностью и высокой точностью. Однако РИА достаточно трудоемко, помещения лаборатории и персонал должны иметь специальную подготовку к работе, хранению и утилизации радиоактивных веществ. Самое сложное для российских клиник лабораторий — это логистика. Генераторы на основе широко распространенной метки  $J^{125}$  имеют период полураспада около 60 дней, поэтому новые генераторы необходимо поставлять в лабораторию с частотой раз в 2 мес. Это обстоятельство и развитие тест-систем для иммунохемилюминесценции и других методик с примерно такой же чувствительностью, как РИА, практически вытеснили РИА из КДЛ.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.3. Иммуноферментный анализ

ИФА — один из наиболее надежных видов иммунохимического анализа, высокочувствительный, экономически выгодный метод, применяемый для качественного и количественного анализа разнообразных антител и антигенов. Для выявления образующегося комплекса антигена и антител используют в качестве метки фермент или фермент-зависимое вещество. Данный метод характеризуется относительной простотой проведения реакции, возможностью приборного учета результатов реакции и автоматизации всех этапов анализа. Внедрение в лабораторную практику ИФА позволило значительно расширить возможности диагностики заболеваний человека. Существует несколько модификаций метода ИФА.

**Гетерогенный (твердофазный) ИФА в микропланшетном формате** получил наибольшее распространение в тест-системах для клинических лабораторных исследований. В качестве твердой фазы используется поверхность лунок полистиролового микроплшета, на которую адсорбированы входящие в состав тест-системы известные антигены или антитела. Антиген или антитело, иммобилизованное на поверхности твердого носителя, принято называть *иммуносорбентом*. В ходе специфической реакции иммуносорбента с определяемыми в исследуемом образце антителами или антигенами образуются иммунные комплексы, которые оказываются фиксированными на твердой фазе. Субстанции, не участвующие в реакции, и избыточное количество реагентов удаляются при многократной промывке. Такая схема позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции. По механизму реакции среди гетерогенных методов различают конкурентный и неконкурентный.

**Непрямой неконкурентный гетерогенный ИФА.** На твердой поверхности пластиковой лунки сорбирован антиген. В лунку вносится исследуемый биологический материал, чаще всего сыворотка или плазма крови пациента. Исследуемые антитела во время инкубации связываются с антигеном, сорбированным на планшете. Несвязавшиеся белки удаляют отмыванием. В лунку вносят конъюгат — то есть антитело с заранее прикреплённым к ним ферментом, например пероксидазой, способной связаться с антителом, закрепившимися на иммуносорбенте. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии процесса иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с определяемыми антителами во время второй инкубации. Несвязавшийся конъюгат остается в жидкой фазе и удаляется отмыванием. В лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который под влиянием фермента конъюгата, связавшегося с иммунными комплексами, превращается в окрашенный продукт реакции.

**«Сэндвич»** — разновидность неконкурентного гетерогенного ИФА, широко используется в КДЛ. На твердой поверхности пластиковой лунки сорбированы антитела. В лунку вносится исследуемый биологический материал, чаще всего сыворотка или плазма крови больного. Исследуемые антигены связываются при инкубации с антителами, сорбированными на планшете. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием. В лунку вносят конъюгат, который представляет собой антитело, меченные ферментом. Если в ячейке имеются образовавшиеся на первой стадии процесса иммунные комплексы, то конъюгат соединяется с определяемыми антигенами, и образуется тройной комплекс — «сэндвич». Несвязавшаяся часть конъюгата остается в жидкой фазе и удаляется отмыванием. В лунку добавляется субстратно-хромогенный реагент, который под влиянием фермента конъюгата превращается в окрашенный продукт реакции. Количество тестируемых антигенов оценивают по содержанию окрашенного продукта реакции по измерению оптической плотности. Строят калибровочную зависимость и проводят определение концентрации тестируемых антигенов в образцах пациентов. В данном случае концентрация определяемого вещества *прямо пропорциональна* интенсивности окраски пробы и, следовательно, оптической плотности. По аналогичной схеме работают тест-системы для определения антител, но в качестве иммуносорбента в них используются антигены, а конъюгат содержит раствор антигенов, меченных ферментом.

Получили распространение тест-системы с использованием *стрептавидина* и *биотинилированных моноклональных антител*. В этом случае стандарты, контроль и пробы пациентов сначала добавляются в микроячейки, покрытые стрептавидином. Затем добавляют биотинилированные антитела (это смесь высокоочищенных специфичных моноклональных антител к различным эпитопам), фермент-меченные антитела (конъюгат), и реагенты перемешиваются. Результатом реакции между различными антителами и определяемым антигеном становится образование «сэндвич»-комплекса, который связывается со стрептавидином в ячейках. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Особенностью таких систем является отдаление ферментной реакции от стенки планшета, поэтому окраска развивается в объеме и тест-система аналитически становится более чувствительной.

**Конкурентный гетерогенный ИФА** основан на конкуренции меченых и немеченых антигенов или антител конъюгата за места связывания с иммуносорбентом. На поверхности планшета (твердой фазе) сорбирован антиген. В лунку планшета вносят исследуемую сыворотку или плазму пациента и конъюгат, который представляет собой антитела, меченные ферментом. В ходе инкубации антитела пациента конкурируют с мечеными антителами конъюгата за места связывания с иммуносорбентом, в результате чего образуются иммунные комплексы двух видов: содержащие ферментную метку (меченые) и без нее (немеченые). Чем больше определяемых антител содержит образец пациента, тем меньше образуется меченых иммунных комплексов. Несвязавшийся конъюгат остается в жидкой фазе и удаляется

отмыванием. При конкурентном варианте концентрация определяемого вещества обратно пропорциональна оптической плотности. Анализ этого типа часто используют для определения антигенов, присутствующих в высоких концентрациях, или гормонов, которые имеют только один антигенсвязывающий центр.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

**Особенности качественного анализа.** Качественная оценка предполагает выдачу двух вариантов ответа: результат положительный или отрицательный, то есть искомое вещество обнаружено либо нет. В тест-системах, исследования при помощи которых предполагают качественную оценку, предусмотрена постановка контрольных проб одновременно с опытными образцами. Качественную оценку результатов исследования проводят относительно порогового значения оптической плотности (cut-off). Если величина оптической плотности каждого из контрольных значений и среднего попадает в допустимый диапазон, указанный в инструкции, это говорит об удовлетворительной работоспособности тест-системы. Cut-off соответствует диагностически значимой концентрации определяемого вещества. Если оптическая плотность опытной пробы меньше порогового значения, значит, определяемого вещества в образце нет либо его содержание находится в пределах нормальных значений.

Полуколичественная оценка результатов исследования предполагает выдачу трех вариантов ответа: определяемое вещество содержится в большом, равном либо меньшем количестве, чем в стандартном образце. Оценка результатов исследования проводят относительно оптической плотности стандартного образца с диагностически значимой известной концентрацией искомого вещества.

Количественный учет результатов при определении антигенов и антител различается. Для количественной оценки содержания антигена тест-система содержит ряд стандартных растворов определяемого вещества с известными концентрациями. По результатам анализа стандартных растворов строят калибровочную кривую, отражающую зависимость оптической плотности от концентрации антигена. По калибровочной кривой, зная оптическую плотность опытной пробы, можно рассчитать концентрацию определяемого антигена. Количественная оценка содержания в сыворотке крови специфических антител при выполнении рутинных серологических исследований методом ИФА может быть проведена двумя основными способами: титрованием различных разведений сыворотки или сравнением опытных результатов с калибровочной кривой, полученной посредством стандартных сывороток. Количественная оценка в единицах концентрации МЕ/мл возможна только в том случае, когда в составе тест-системы имеется международный стандарт.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.4. Иммуный блоттинг

Иммуноблот (Western-blot) — один из методов анализа антигенной специфичности антител сыворотки больного. Он позволяет установить антитела методом распознавания ими отдельных специфических компонентов анализируемого образца. В основе метода лежит электрофорез антигенов в полиакриламидном геле с последующим перенесением (блоттингом) белкового материала, фракционированного в соответствии с зарядом и массой антиген-содержащего компонента, на нитроцеллюлозную мембрану. После этого мембрана блокируется индифферентным белком для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее мембрана с нанесенными на нее белками инкубируется с сывороткой, содержащей антитела, и с контрольными сыворотками, входящими в состав набора. После связывания антител с соответствующими мишенями комплексы «антиген–антитело» выявляются с помощью антисыворотки, меченой ферментной меткой. На последнем этапе ферментсодержащие комплексы визуализируют с помощью ферментного субстрата, окисление которого приводит к образованию нерастворимых, окрашенных продуктов ферментативной реакции в месте расположения комплексов. В результате на подложках образуются окрашенные полосы, соответствующие сорбированным антигенам. Учет результатов, как правило, проводят визуально, хотя возможно использование процедуры документирования. Интенсивность окрашивания каждой полосы антигена на всех подложках определяют сравнением с контрольными полосами на подложке, которые инкубировали с положительным образцом. После сравнения интенсивности окрашивания полос анализируемые образцы оцениваются как положительные, отрицательные или сомнительные в отношении содержания специфических антител к представленным антигенам.

Этот метод позволяет обнаружить сывороточные антитела и описать соответствующие им антигены в зависимости от их молекулярной массы. Идентификация мишени аутоантител основана на молекулярном весе белка, с которым реагируют аутоантитела из сыворотки пациента. В одной реакции может быть обнаружено связывание антител с несколькими антигенами, каждый из которых может быть точно охарактеризован. По чувствительности метод сравним с ИФА, однако в классическом варианте требует значительного опыта и весьма трудоемок.

Для диагностики инфекционных заболеваний этот метод широко используется в качестве подтверждающих тестов. Метод иммуноблота дает возможность прояснить пограничные результаты и подтвердить положительные результаты, полученные методом ИФА. Иммуноблоты прекрасно дополняют ИФА и иммунофлюоресцентный метод анализа в диагностике аутоиммунных заболеваний, воспалительных ревматоидных заболеваний, васкулитов, гастроэнтерологических заболеваний.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.5. Иммунохемилюминесценция

**Люминесценция** — излучение света молекулами. В процессе люминесценции происходит отдача энергии, то есть исходно в молекуле накапливается избыточная энергия. Избыток энергии сопровождается неустойчивым равновесием и чреват повреждением молекулярных структур. Примером природной люминесценции является свечение термофильных растений вблизи гейзеров. Люминесценция может происходить при передаче энергии в различных процессах:

- воздействие потоком электронов (катодными лучами) — катодолюминесценция;
- тепловой нагрев — термолюминесценция;
- химические реакции — хемилюминесценция;
- воздействие электрическим током — электролюминесценция;
- облучение ультрафиолетовым и видимым светом — флюоресценция.

**Хемилюминесценция** — испускание света молекулами, перешедшими в возбужденное состояние в результате химической реакции. Чаще всего данное явление наблюдается при окислении органических веществ водорода пероксидом (Перекисью водорода<sup>▲</sup>), гипохлоритом, молекулярным кислородом и др. В **люминометрах** характерной особенностью является отсутствие источника света, свечение образца индуцируется химической реакцией. Принцип хемилюминесцентной детекции реализуется в вариантах методик иммунохимических исследований. Основными хемилюминесцентными метками служат сульфонамиды и эфиры акридина, инициаторами их свечения выступают смесь водорода пероксида (Перекиси водорода<sup>▲</sup>) и гидроокиси натрия или ЩФ. Хемилюминесцентная детекция обладает высокой специфичностью, не требует длительных инкубаций или добавления стоп-реагента, не использует дополнительные источники света.

Иммунохемилюминесценция в настоящее время активно используется в КДЛ и научной практике для обнаружения минимальных количеств аналитов в биопробах. В состав реакционной смеси при реакции входят меченые антитела или антигены и смесь: хемилюминесцентный субстрат, водорода пероксид (Перекись водорода<sup>▲</sup>) и усилители реакции. В качестве последних применяются ароматические амины, арилбороновые кислоты, гидроксиацетанимиды, гидроксibenзотиазолы, нафтолы, фенолы, тиофенолы и др. Для детекции результатов реакции иммунохемилюминесценции можно использовать фоточувствительные пленки (способные засвечиваться при попадании на них света) или специальные комплексы для регистрации свечения на базе фотоэлектронных умножителей. В КДЛ применяются иммунохимические анализаторы, разработанные для регистрации хемилюминесценции при протекании реакции «антиген–антитело». Эти приборы обладают высокой производительностью и способностью проводить анализ в автоматическом режиме. Несомненными достоинствами иммунохемилюминесценции являются высокая автоматизация и стандартизация аналитического процесса, высокая аналитическая чувствительность и специфичность, длительная стабильность реагентов, возможность исследования единичных проб. Однако перечень методик для определяемых аналитов и, собственно, набор определяемых тестов полностью зависят от конкретного производителя анализатора. Некоторым минусом также является невозможность использовать реагенты для иммунохемилюминесценции одного производителя на иммунохимических анализаторах других фирм-производителей, что обусловлено методическими особенностями постановки реакции на конкретном анализаторе и различной конструкцией тестов и приборов; кроме того, иммунохемилюминесценция существенно дороже, чем ИФА.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.6. Иммуофлюоресценция

Флюоресценция получила название от природного минерала — флюорита  $\text{CaF}_2$ , у которого это явление впервые наблюдалось. По характеру свечения различают *фосфоресценцию*, продолжающуюся относительно долго после прекращения воздействия, и *флюоресценцию* — свечение, происходящее только во время воздействия. Флюоресценция является частным случаем люминесценции, когда вторичное свечение объекта вызвано возбуждением световой волной. Возбуждение происходит при большей энергии, то есть при меньшей длине волны, чем вторичное свечение. Поэтому длина волны свечения при флюоресценции больше, чем длина волны возбуждения.

Длины волн поглощения и испускания, а также количество поглощенного и испущенного света являются характеристиками каждого из флюорохромов и могут существенно различаться для разных соединений. Для каждого из этих соединений характерны собственные спектры поглощения и эмиссии. В аналитических целях в тест-системах в качестве меток при проведении флюоресцентного и люминесцентного анализа часто используются флюорофор флюоресцеин и люминофоры акридиновый эфир и люминол. Применение реакции иммунофлюоресценции в КДЛ возможно в нескольких модификациях.

**Микроскопическое исследование с использованием люминесцентного микроскопа.** При микроскопии возможна визуальная оценка антигенных структур клеток и тканей, а также микроорганизмов. При этом происходит связывание специфически меченных флюорохромом антител с изучаемыми клеточными или тканевыми антигенами микропрепарата. Выделяют прямую и непрямую иммунофлюоресценцию.

При прямой иммунофлюоресценции тканевые антигены, инфекционные агенты или отложения сывороточных белков в ткани или клетках обнаруживаются с помощью меченных флюорохромами антисывороток или моноклональных антител. Прямая иммунофлюоресценция используется преимущественно для морфологических исследований биопсийного материала из ткани, цитологических и микробиологических исследований. В диагностике аутоиммунных заболеваний метод прямой иммунофлюоресценции используется для обнаружения отложений Ig и факторов комплемента в биопсийном материале кожи и почек.



Непрямая иммунофлюоресценция относится к тестам, в которых применяются для обнаружения антигенов антитела сыворотки крови и других биологических жидкостей. Криосрезы ткани, клетки или микроорганизмы используются как субстрат, с которым связываются аутоантитела. Аутоантитела способны связываться с различными структурами в одном субстрате, в результате с помощью люминесцентного микроскопа можно описать разные типы свечения. Так, АНА могут быть направлены как к антигенам нуклеохроматина, который диффузно распределен в ядре, так и к компонентам ядрышка. Для того чтобы различить эти варианты выявления АНА, наряду с титром АНФ описывается тип свечения ядра клетки. Типы свечения могут быть описаны при выявлении антинейтрофильных антител, антикератиновых антител, антимитохондриальных антител и многих других. Несомненным преимуществом непрямой иммунофлюоресценции является возможность оценки одновременного связывания аутоантител со всем разнообразием антигенов, которое имеется в тканевом субстрате. Это делает иммунофлюоресценцию удобной для скринингового использования и обуславливает большое значение этого метода в аутоиммунной диагностике. Объективными недостатками микроскопического анализа являются субъективность учета результатов и трудоемкость. Обе эти проблемы затрудняют широкое использование непрямой иммунофлюоресценции. Возможно проведение всех стадий иммунофлюоресцентного анализа в полностью автоматическом режиме на полностью автоматизированном модуле для проведения иммунофлюоресцентного анализа для диагностики аутоиммунных заболеваний. Встроенная камера делает снимки высокого разрешения и автоматически сохраняет их в базе данных. Предварительная оценка результатов (положительный или отрицательный) происходит автоматически.

**Мультиплексный иммунофлюоресцентный анализ.** В основе метода — набор стандартных процедур твердофазного иммуноанализа. Антитела в данном случае адгезированы не в планшете, а на флюоресцентно-меченных полистероловых частицах (микросферах). Частицы, покрытые антителами к различным анализам, отличаются друг от друга по интенсивности флюоресценции. На первом этапе образец инкубируют с микросферами. Происходит связывание исследуемого вещества с соответствующими антителами пропорционально его количеству. Затем образец инкубируют с биотинилированными вторичными антителами и после инкубации несвязавшиеся антитела удаляют путем отмывки, далее добавляют конъюгат стрептавидин-фикоэритрин и снова инкубируют. После инкубации и отмывки образцы анализируют на проточном цитофлюориметре или анализаторе Luminex. Концентрация исследуемого вещества пропорциональна интенсивности свечения фикоэритрина на соответствующем типе микросфер. Данный метод широко используется для определения аутоантител, диагностики инфекций, оценки цитокинов, хемокинов и других белковых маркеров, изотипирования Ig, оценки экспрессии белков, определения транскрипции генов, генотипирования и определения различных мутаций, определения лейкозных транслокаций, в фармакогенетике, хромосомном анализе, клеточном сигналинге, в определении онкомаркеров, HLA-типировании и определении HLA- и HPA-антител.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

### 7.8.7. Проточная цитофлюориметрия

Проточная цитофлюориметрия (ПЦ) — высокотехнологичный метод быстрого измерения характеристик клеток. Этим методом исследуются выборки от нескольких тысяч до нескольких миллионов клеток, что гарантирует статистическую достоверность результатов. В клинической практике наиболее часто ПЦ используют для исследования клеток крови и костного мозга, их антигенного состава, функциональной активности, количества ДНК и РНК, определения уровня продукции цитокинов. Две существенные особенности ПЦ делают этот метод особенно ценным для клинической практики. Во-первых, этот метод позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу, а при использовании ДНК-цитометрии — и по генотипу входящих в них клеток. Анализы такого рода служат для выявления отклонений, происходящих в процессе онкогенеза. Во-вторых, это возможность обнаружить и охарактеризовать редкие события, то есть встречающиеся с частотой  $10^5$ – $10^7$ , что стало возможным благодаря огромной производительности.

Принцип метода: в основе ПЦ лежат фотометрические и флюоресцентные измерения отдельных клеток, пересекающих одна за другой вместе с потоком жидкости лазерный луч монохроматического света.

Методом ПЦ можно измерять следующие параметры.

- Рассеяние света под малыми углами ( $1$ – $19^\circ$ ). Этот параметр используют для определения размеров клеток.
- Рассеяние света под углом  $90^\circ$ . Использование этого параметра позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы, а также о неоднородности или гранулярности цитоплазмы.
- Интенсивность флюоресценции изучаемого объекта может служить количественным критерием, характеризующим экспрессию антигенов (плотность рецепторов) на клетках.

При одновременной регистрации бокового и прямого светорассеяния можно выделить все клеточные популяции лейкоцитов. В этом случае удастся определить физические свойства каждой неокрашенной клетки (размер и сложность структуры), таким образом разделить анализируемую клеточную популяцию на отдельные субпопуляции. Основной формой отображения результатов в процессе накопления данных являются двухпараметрические гистограммы распределения. Чаще всего именно на гистограммах отмечается гейт, используемый для селекции событий при анализе по нескольким скоррелированным сопряженным параметрам. Параметры клеток, попавших внутрь отмеченного гейта, будут отображаться на скеттограммах.

С помощью флюоресцентных каналов изучают клеточные маркеры, для чего используют моноклональные антитела к мембранным и внутриклеточным компонентам клеток, меченные разными флюорохромными красителями. После окрашивания клеток моноклональными антителами происходят специфическое связывание последних с клеточными структурами и регистрация флюоресценции, индуцированной излучением лазера. В ПЦ применяют множество

флюоресцентных красителей. Моноклональные антитела, меченные различными флюорохромами, различаются как по специфичности их молекулярного связывания, так и по оптическим характеристикам: по спектрам поглощения и, соответственно, возбуждения флюоресценции, величинам молекулярных коэффициентов экстинкции, спектрам и квантовым выходам флюоресценции.

В зависимости от того, какими лазерами укомплектован прибор, подбирают флюоресцентные красители, самыми распространенными являются FITC, фикоэритрин (PE), аллофикоцианин (APC), перидинин-хлорофилл-протеин (PerCP).

*Преимущества ПЦ:* возможность оценки большого количества клеток за короткий промежуток времени, выявления иммунофенотипа анализируемых клеток, линейной принадлежности бластов, аберрантного фенотипа опухолевых клеток, относительная экономичность исследования (в сравнении с ИГХ и иммуоцитохимическими методами).

*Ограничения ПЦ:* отсутствие стандартных диагностических панелей, метод уступает в ДЧ и ДС молекулярно-генетическим методам исследования в дифференциальной диагностике Т-клеточных опухолевых заболеваний и при оценке МОБ при ОЛ миелоидной направленности и Т-клеточной линейности.

*Фенотипирование лимфоцитов периферической крови.* Для фенотипирования лимфоцитов периферической крови человека разработана многоцветная панель моноклональных антител (**табл. 7.21**).

**Таблица 7.21.** Панель моноклональных антител, использованная для анализа основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови практически здоровых лиц

Исследуемые популяции и субпопуляции	Флюорохромы и меченные ими моноклональные антитела			
	FITC	PE	ECD	PC5
B1-, B2- и B-клетки памяти	CD19	CD5	CD45	CD27
T-клетки, Th- и T-цитотоксические	CD8	CD4	CD3	CD45
NK-клетки, NK-цитолитические, NK-цитокинпродуцирующие	CD16	CD56	CD3	CD45
Th-наивные, Th-активированные/памяти	CD45RA	CD4	CD45R0	CD45
Регуляторные T-клетки	CD4	CD127	CD25	CD45
ααT-клетки, αβT-клетки	ααTCR	ααTCR	CD3	CD45
T-клетки активированные	CD3	CD25	HLA-DR	CD45

Глава 7. Лабораторная иммунология

Примечание. FITC — флюоресцеиноизотиоционат; PE — фикоэритрин; ECD — Energy Coupled Dye; PC — перидинин-хлорофилл-протеин.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.8.8. Технология иммунологических биочипов

Биологические микрочипы находят все более широкое применение в биологии, медицине, аналитической химии. Основное преимущество — одновременное иммунохимическое определение (диагностика) в исследуемом материале сразу нескольких (5, 10, 36 и более) возбудителей. Высокая производительность, относительно низкая стоимость анализа наряду с высокой ДЧ и ДС определения делают это новое направление в клинической лабораторной иммунодиагностике наиболее перспективным.

Иммуночипы, несомненно, в ближайшей перспективе сформируют свой сегмент диагностического рынка и потеснят традиционные технологии иммунохимического анализа. Для этого имеются очень веские основания. Конкурентные преимущества микропланшетных иммуночипов обусловлены тем, что их применение позволяет кардинально поднять производительность лабораторий. Кроме того, снижаются затраты на расходные реагенты, так как стоимость мультиплексных тестов в расчете на один выявляемый аналит значительно ниже. Преимущества технологии иммуночипов очевидны, когда речь заходит о получении комплексной картины заболевания, формируемой с помощью лабораторных тестов, а также при анализе малых количеств тестируемого материала, например при скрининге генетических заболеваний новорожденных с использованием микрообразцов крови, высушенной на фильтровальной бумаге.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.8.9. Масс-спектрометрический иммунологический анализ

Способность масс-спектрометрии обнаруживать множество анализируемых веществ одновременно полезна для анализа сложных биологических смесей, поскольку целые протеомы, липидомы или метаболомы могут быть исследованы в одном образце. В комбинированных методах иммуноаффинного захвата MS, или MS-иммуноанализах (MSIAS), используются иммобилизованные антитела для обогащения целевых белков из сложных биологических образцов, и таким образом улучшаются пределы обнаружения анализируемых веществ с низким содержанием. Разработка новых реагентов для конъюгации антител открыла способ применения ICP-MS для обнаружения хрупких молекул антител путем мечения их ионами металлов, которые обеспечивают уникальные изотопные сигналы в масс-



спектрах, называемые массовой цитометрией. Визуализирующая массовая цитометрия (ИМС) применяет принципы массовой цитометрии в сочетании с формой лазерной абляционной ионизации для создания растровых изображений ионов металлов из конъюгатов антител. ИМС применяется для выявления биомаркеров широкого спектра заболеваний человека с акцентом на участие иммунных клеток, включая изучение взаимодействий «опухоль — иммунная клетка», аутоиммунных заболеваний и иммунофенотипирования. Масс-цитометрия включает обнаружение антител, меченных гетероатомом, прикрепленных к специфическим антигенам на отдельных клетках в суспензии или внутри них. Способность к мультиплексированию и стратегии мечения антител делают эту платформу детекции идеально подходящей для улучшения диагностических возможностей существующей технологии проточной цитометрии.

Глава 7. Лабораторная иммунология

7.8.10. Выбор технологии иммунохимического анализа  
В лабораторной иммунологии достаточно часто встает вопрос о выборе технологии для определения той или иной группы аналитов. Например, определение гормонов можно проводить методами фотометрирования, в том числе турбидиметрией и нефелометрией, или ИФА-анализом, можно воспользоваться технологиями, основанными на использовании флуоресцентной или люминесцентной метки. Основным недостатком фотометрических методов является относительно узкий линейный диапазон измерения результатов. Даже лучшие фотометры позволяют регистрировать изменения аналитов (гормонов) не более чем в пределах четырех десятичных порядков. Флуоресцентные и люминесцентные технологии увеличивают линейный диапазон до шести-восьми десятичных порядков, то есть позволяют работать без разведения. В табл. 7.22 представлены сравнительные данные о чувствительности фотометрических, флуоресцентных и люминесцентных методов определения гормонов (и других аналитов). Флуоресцентные и люминесцентные технологии позволяют существенно увеличить чувствительность определения веществ в биопробах, однако они используются, как правило, в «закрытых» технологиях, включающих прибор–реактивы–калибраторы–КМ и т.д.

Глава 7. Лабораторная иммунология

Таблица 7.22. Сопоставление иммунохимических методов применительно к гормональным исследованиям

Метод детекции	Чувствительность, моль/л	Преимущества метода	Недостатки метода
Нефелометрия. Турбидиметрия	$\sim 10^{-6}$	Возможность проведения анализа в биохимической пробе	Узкий спектр показателей
ИФА, плащечная технология	$10^{-9} - 10^{-6}$	«Открытость» системы	Концентрация ряда гормонов ниже чувствительности системы
ИФА, пробирочная технология	$10^{-9} - 10^{-6}$	Возможность быстрого получения результата (один анализ)	Ограничен спектр, закрытая система
Флуоресценция	$10^{-9} - 10^{-8}$	—	Эффект гашения флуоресценции, закрытые технологии
Флуоресценция с генерацией сигнала	$10^{-16} - 10^{-9}$	Позволяет проводить измерения в широком диапазоне концентраций	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция	$10^{-9} - 10^{-8}$	—	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей
Люминесценция с генерацией света	$10^{-16} - 10^{-10}$	Измерения в широком диапазоне концентраций, включая минимальные	Закрытые технологии, ограничен спектр показателей

Логика развития лабораторной медицины привела к тому, что фотометрические методы, реализованные на биохимических анализаторах, применяются в основном как скрининговые ориентировочные диагностические технологии, выявляющие системную патологию. Иммунохимические методы, основанные на специфическом взаимодействии «антитело–антиген», используются для выявления или количественного определения конкретных маркеров, которые могут указать на наличие определенного заболевания или патологии. Качественные иммунохимические методы чаще применяются при диагностике инфекционных заболеваний, при которой важен ответ на вопрос, есть или нет заражения, есть или нет иммунитета к конкретному инфекционному агенту. Количественные иммунохимические методы используются для определения концентрации индивидуальных молекул, что позволяет оценить степень патологии, следить за эффективностью терапии, констатировать излечение. В случаях повышения метки, характеризующей патологию, эффективны менее чувствительные иммунохимические технологии: иммунотурбидиметрия, нефелометрия, ИФА. Если же количество метки снижается или требуется получить воспроизводимый результат в отдаленный период, то, несомненно, в этих случаях предпочтительно использовать иммунохемилюминесцентные технологии.

Рекомендуемая литература

1. Аббас А.К., Лихтман Э.Г., Пиллаи Ш. Основы иммунологии. Функции иммунной системы и их нарушения. Учебник / пер. с англ. под ред. Р.М. Хаитова, Ф.Ю. Гариба. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 408 с. doi: 10.33029/ 9704-6677-3-BIM-2022-1-408.
2. Анафилактический шок. Клинические рекомендации. 2020. Рубрикатор КР (minzdrav.gov.ru) [дата обращения: 23.04.2024].
3. Белохвостикова Т.С., Годков М.А., Ненашева Н.М. и др. Интерпретация лабораторных исследований при аллергии. М.: Гэотар-Медиа, 2025, 176 с.
4. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / Под ред. В.В. Долгова. М.—Тверь: Триада, 2015. 418 с.
5. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. В 2 т. / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
6. Лапосота М., Маккэффри П. Клинические лабораторные методы. Атлас наиболее часто выполняемых исследований / пер. с англ. под ред. В.В. Долгова, М.А. Годкова, А.В. Бугрова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 224 с.
7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб: Фолиант, 2018. С. 133–144.
8. Хаитов Р.М., Гариб Ф.Ю. Иммунология. Атлас. 2-е изд., обновленное. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 413 с.
9. Rich R.R., Fleisher Th.A., Schroeder Jr. H.W. et al. (eds.). Clinical Immunology. Principles and Practice. 6th Edn. Elsevier Ltd. 2023. P. 12–37, 39–53, 55–75, 93–105, 107–118.
10. Elsevier Limited. Eds: Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher et al, 2019, p. 1319.

## Глава 7. Лабораторная иммунология

11. Justiz Vaillant A.A., Vashisht R., Zito P.M. Immediate hypersensitivity reactions. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2022.
12. Jutel M. et al. Nomenclature of allergic diseases and hypersensitivity reactions: Adapted to modern needs: An EAACI position paper // Allergy. 2023. Vol. 78. N. 11. P. 2851–2874.
13. Gauvreau G.M., Bergeron C., Boulet L.P. et al. Sounding the alarmins-the role of alarmin cytokines in asthma // Allergy. 2023. Vol. 78. N. 2. P. 402–417. doi: 10.1111/all.15609.
14. Murphy K., Weaver C., Berg L. (eds.). Janeway's Immunobiology. 10th Edn. W.W. Norton and Company, Inc. 2022. P. 94–105.
15. Villalta D., Tonutti E., Bizzaro N. et al. Recommendations for the use of molecular diagnostics in the diagnosis of allergic diseases // Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol. 2018. Vol. 50. N. 2. P. 52–59. doi: 10.23822/EurAnnACI.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Система гемостаза — одна из основополагающих систем организма, которая, с одной стороны, сохраняет кровь в кровеносном русле в жидком агрегатном состоянии, с другой стороны — обеспечивает остановку кровотечения и предотвращает кровопотерю при повреждении кровеносных сосудов. Выполнение этих двух разнонаправленных функций осуществляется многокомпонентной системой клеточных и гуморальных механизмов, ферментных систем с множеством прямых и обратных связей. Для лучшего понимания принято рассматривать отдельные составляющие системы гемостаза с некоторым упрощением сложных физиологических механизмов. Однако всегда нужно иметь в виду, что описанные ниже компоненты работают исключительно в содружестве и одновременно, критически влияя на функционирование друг друга.

Кроме основной функции, система гемостаза активнейшим образом вовлечена в большое количество других физиологических и патологических процессов — от воспаления и иммунных реакций до метастазирования при онкологических заболеваниях. Клинические проявления нарушений свертывания крови представлены кровотечениями (или геморрагическим синдромом) и тромбозами; промежуточное положение занимает синдром ДВС. При этом патология свертывания может быть компенсированной, не проявляющейся клинически до воздействия триггерных или провоцирующих факторов. Компенсаторные возможности и запас прочности системы гемостаза очень велики. Так, спонтанные кровотечения могут не развиваться при снижении количества тромбоцитов менее  $20 \times 10^9/\text{л}$  и при активности некоторых факторов свертывания менее 10%, а тромбозы — не формироваться при наличии наследственной или приобретенной тромбофилии.

Особенностью заболеваний, обусловленных патологией системы гемостаза, является то, что без надежной лабораторной базы выявление их причин невозможно. Клинические проявления широко распространенных нарушений зачастую схожи. Разработан и используется обширный перечень лабораторных методов и приемов, способных предоставить информацию о состоянии системы свертывания комплексно, оценить состояние разных звеньев системы гемостаза, выявить точечные мутации, влияющие на свертывание крови.

**Коагулопатия** — нарушение плазменного гемостаза, сопровождающееся геморрагическими проявлениями, спонтанными или провоцируемыми.

**Тромбоцитопатия** — нарушение функции тромбоцитов с геморрагическим синдромом.

**Тромбофилия** — нарушения в генетическом кодировании факторов свертывания, системе естественных антикоагулянтов или приобретенные аутоиммунные нарушения, существенно повышающие риски тромбозов или патологии беременности.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

В физиологических условиях неповрежденная сосудистая стенка способствует поддержанию жидкого состояния крови. Целостность эндотелиального покрова, выстилающего внутреннюю поверхность сосудов, является основой нормального функционирования кровеносной системы. Клеточная мембрана эндотелиоцитов обладает высокой текучестью, что является важным условием антитромбогенных свойств сосудистой стенки. Высокая текучесть и плотное прилегание клеток друг к другу исключают контакт прокоагулянтов плазмы крови с субэндотелиальными структурами. При контакте клеток крови и плазменных факторов с неповрежденным эндотелием не происходит активации свертывания крови из-за отсутствия активирующего коагуляцию стимула. Эндотелиоциты синтезируют, представляют на своей поверхности и выделяют в кровь и субэндотелиальное пространство целый спектр биологически активных веществ — белков, пептидов и небелковых веществ, регулирующих гемостаз, препятствующих коагуляции, активации тромбоцитов, их адгезии и агрегации (простациклин, компоненты системы протеина C) и, наоборот, способствующих реализации функциональной способности тромбоцитов и спазму сосудов (фактор Виллебранда, оксид азота, эндотелин).

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.1.1. Маркеры состояния и повреждения эндотелия

С лабораторной точки зрения оценка состояния эндотелия в реальной клинической практике является сложной. Наиболее доступный метод — исследование антигена vWF, который отражает дисфункцию эндотелия или нарушения в синтезе и функционировании белка.

**vWF** — сложный мультимерный гликопротеин, синтезируемый эндотелиальными клетками и мегакариоцитами. У здоровых людей средняя концентрация vWF в венозной крови составляет 10 мг/л. В результатах анализов чаще указывается не концентрация, а процентное значение, отражающее, насколько отличается фактическое содержание антигена vWF в исследуемой крови от среднего. *Референтный диапазон* составляет 50–160%.

Повышенные уровни vWF являются индикатором повреждения эндотелия при сосудистой патологии. При многих заболеваниях, сопровождающихся острым и хроническим повреждением эндотелия и системным воспалением (СД, атеросклероз, опухоли различной локализации, гестоз), уровень vWF в крови значительно повышается. Краткое повышение vWF после физической нагрузки, а также во время беременности может быть скорее показателем активации или стимуляции эндотелиальных клеток, чем их повреждения.

Снижение концентрации vWF обнаружено при болезни Виллебранда, гипотиреозе и СКВ (приобретенный синдром Виллебранда). Количество белка сцеплено с группой крови. У лиц с группой крови 0 (I) антиген vWF примерно на 25% ниже. В связи с этим другие (не 0) группы крови многими исследователями рассматриваются в качестве независимого фактора риска тромбозов.

**Тромбомодулин** связан с мембраной эндотелиоцитов и в норме практически отсутствует в циркуляции. Появление значимой концентрации тромбомодулина в токе крови свидетельствует о повреждении эндотелиальных клеток. Повышение тромбомодулина наблюдается при СКВ, синдроме ДВС, респираторном дистресс-синдроме взрослых, эмболии легочной артерии, ИМ, после использования тромболитиков, при диабетической микроангиопатии, после транслюминальной ангиопластики коронарных артерий. Некоторые мутации гена тромбомодулина сопровождаются артериальными тромбозами.

**Эндотелин** формируется из вырабатываемого эндотелием предшественника препроэндотелина, который превращается в Big-эндотелин (38 аминокислотных остатков), затем при участии эндотелинпревращающего фермента, находящегося в эндотелии, образуется эндотелин-1 (21 АК-остаток). Вазомоторная активность эндотелина-1 увеличивается в 140 раз по сравнению с таковой Big-эндотелина, а период полураспада сокращается, большая часть эндотелина (80%) инактивируется при прохождении через легкие.

*Концентрация эндотелина-1* в плазме крови человека в норме — 0,1–1 фмоль/мл или не выявляется.

Эндотелин и Big-эндотелин имеют прогностическое значение при нарушении сердечной деятельности, при ИМ. Кроме того, эндотелин является маркером коронарного атеросклероза и коронарной эндотелиальной дисфункции, нарушения функционирования печени. Высокие уровни эндотелина в плазме наблюдаются при ишемии, после гемодиализа, выраженной гипертензии, после трансплантации сердца, печени, почек и костного мозга.

**Простациклин** является метаболитом арахидоновой кислоты, образуется преимущественно в эндотелии. Синтез простациклина происходит постоянно, но он не депонируется, а секретируется в слой гликокаликса на поверхности сосудистой стенки. В отличие от других простагландинов, простациклин не разрушается полностью, проходя через легкие, поэтому в случае увеличения его синтеза могут наблюдаться системные эффекты. Простациклин оказывает вазодилатирующее действие, основная локализация рецепторов к нему — гладкомышечные клетки артериальных сосудов. Внутривенное введение простациклина приводит к системному снижению артериального давления, причем в сосудах не только большого, но и малого круга кровообращения. Увеличение продукции простациклина наблюдается при активации эндотелия, гипоксии, под влиянием вазоактивных веществ (эпинефрин, гистамин, брадикинин, ангиотензин II, эндотелин-1), цитокинов, тромбина, гемодинамических факторов.

**Оксид азота** образуется в сосудистой стенке под влиянием постоянно экспрессированной на эндотелии NO-синтазы. NO имеет высокую химическую активность, легко реагирует со многими клеточными структурами и химическими компонентами, что определяет многообразие биологических эффектов. NO — мощный антиагрегант, подавляет активность тромбоцитов. Брадикинин, гистамин, ацетилхолин повышают образование и освобождение NO из эндотелиальных клеток.

Тромбомодулин, эндотелин, простациклин и оксид азота не являются в настоящее время аналитами, измеряемыми в практической лаборатории, но важны для функционирования системы гемостаза, и их оценка используется в научных исследованиях.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.1.2. Тромбоциты и их активность

Тромбоциты формируются в костном мозге, отшнуровываясь от мегакариоцитов, поступают в периферическую кровь и циркулируют там 9–10 сут. Постоянное формирование новых тромбоцитов позволяет поддерживать их количество в кровотоке в *референсных пределах* —  $150\text{--}400 \times 10^9/\text{л}$ . Несмотря на отсутствие ядра, в тромбоцитах доказан синтез белка *de novo*, они рассматриваются в качестве клеток крови. Около 1/3 всей массы тромбоцитов находится в селезенке (селезеночный пул): при спленомегалии этот пул возрастает, что может приводить к перераспределительной тромбоцитопении. Остальные 2/3 тромбоцитов циркулируют в крови.

При отсутствии гемопозитических стимулов объем циркулирующих тромбоцитов относительно постоянен.

При снижении продукции тромбоцитов гемостатический потенциал может быть частично компенсирован за счет повышения их объема. В обратной ситуации, при повышении количества тромбоцитов выше  $450 \times 10^9/\text{л}$ , MPV снижается, но не ниже определенного физиологического уровня. Соответственно, общий объем тромбоцитарного пула в крови возрастает пропорционально увеличению количества тромбоцитов. Это может приводить к увеличению тромбогенного потенциала.

Интактные тромбоциты имеют форму диска диаметром 2,8–3,4 мкм, объемом от 5,7 до 8,9 мкм<sup>3</sup>. В циркулирующем пуле преобладают зрелые тромбоциты диаметром 2–3 мкм (80–95%), «молодые» формы — макротромбоциты размером свыше 3 мкм — составляют 1–10%, а «старые» — микротромбоциты менее 2 мкм — 3–15%.

Важное свойство мембраны интактных тромбоцитов — разный состав фосфолипидов наружной и внутренней поверхности. Фосфатидилхолин и сфингомиелин, не обладающие прокоагулянтной активностью, распределены как в наружном, так и во внутреннем слое клеточной мембраны неактивированных тромбоцитов. Фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозитол, обладающие прокоагулянтными свойствами, в неактивированных тромбоцитах локализованы преимущественно на внутренней поверхности клеточной мембраны. В процессе активации тромбоцита концентрация фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола в наружном слое мембраны значительно возрастает, что формирует прокоагулянтную поверхность, необходимую для фиксации, активации и взаимодействия плазменных белков гемостаза. Кроме того, это перераспределение меняет вязкость клеточной мембраны, что также важно для гемостатических реакций. Кислые фосфолипиды мембраны тромбоцитов — фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол — и нейтральный фосфатидилэтаноламин объединяются под названием «фактор 3 тромбоцитов» (PF3).

**Рецепторы мембраны тромбоцитов** осуществляют специфические функции взаимодействия тромбоцитов с другими тромбоцитами, плазменными белками и небелковыми веществами. На поверхности клеток расположено значительное их количество, а в самом тромбоците имеется сложная система передачи и обработки сигналов. Большинство рецепторов являются гликопротеинами, фиксированными на цитоплазматической мембране тромбоцита. Один конец молекулы рецепторов находится во внеклеточном пространстве, а другой «пронизывает» мембрану и контактирует с эффекторными структурами, расположенными на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. На наружных частях гликопротеинов располагаются рецепторные локусы, специфичные для разных веществ. Рецепторы тромбоцитов могут иметь один или несколько лигандов, которые комплементарно взаимодействуют с рецептором, вызывая его конформационные изменения, модулируя выполнение тромбоцитом тех или иных функций. В табл. 8.1 представлены данные об основных рецепторах на поверхности тромбоцитов и связывающихся с ними лигандах.

**Органеллы тромбоцитов** разделяют на три вида:  $\alpha$ -гранулы, электронплотные тельца ( $\delta$ -гранулы) и лизосомы ( $\beta$ -гранулы).

В  $\alpha$ -гранулах хранится до 30 различных белков, большинство из которых были синтезированы еще в мегакариоцитах:  $\alpha$ -тромбоглобулин, фактор 4 тромбоцитов, фактор V, vWF, фибриноген, тромбоспондин, фибронектин, витронектин,  $\alpha_2$ -макроглобулин, Р-селектин, фактор роста тромбоцитов (PDGF), ингибитор тканевого активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1),  $\alpha_2$ -антиплазмин,  $\alpha_1$ -антитрипсин, протеин S, лейкоцитарный хемотаксический фактор, высокомолекулярный кининоген и др. Участие белков  $\alpha$ -гранул в физиологических и патологических процессах многостороннее: а) митогенный и хемотаксический эффект, б) адгезивное действие, участие в агрегации тромбоцитов, в) участие в плазменном гемостазе, г) вазоактивное действие, д) иммунные и другие эффекты.

**Таблица 8.1.** Мембранные рецепторы и их лиганды

Мембранные рецепторы	Связываемые лиганды
Рецепторы для высокомолекулярных белков	GP1b-V-IX
	vWF, тромбин
	GP1b-IIIa
	Фибриноген, vWF, фибрин, фибронектин, витронектин, тромбоспондин
	GP1c-IIa
	Фибронектин, ламинин
	VN-R
Рецепторы для физиологических стимуляторов	Витронектин, тромбоспондин
	GP1a-IIa
	Коллаген
	GP1Ib
	Тромбоспондин
	GPVI
	Коллаген
Рецепторы для физиологических стимуляторов	P2-R
	Аденозиндифосфат (АДФ)
	$\alpha_2$ -Адренорецептор
	Адреналин
	5-HT <sub>2</sub> -R
	Серотонин

	H <sub>1</sub> -R	Гистамин
	V <sub>1</sub> -R	Вазопрессин
	Thr-R (STDR) PAR1, PAR4	Тромбин
	TP-рецептор	Тромбоксан А <sub>2</sub>

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

В *плотных тельцах* (а-гранулы) хранятся субстанции, вызывающие сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов: адениновые нуклеотиды (АТФ, АДФ, аденозинмонофосфат, циклический аденозинмонофосфат, ГДФ, серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин, гистамин, Ca<sup>2+</sup> и др. Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до аденозинмонофосфата и аденозина; последние обладают прямым коронарорасширяющим действием. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, стимулирующим агрегацию тромбоцитов.

В *лизосомах* (а-гранулы) находится большое количество кислых гидролаз — пероксидаза, глюкозидазы, галактозидаза, а-глицерофосфатаза, глюкуронидаза, КФ, НЭ, протеазы (катепсины). Лизосомы выделяют хранящийся в них секрет только при необратимой активации тромбоцитов.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично (при обратимой активации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью), так и полностью, с необратимостью активации (при реакции высвобождения). После секреции большинство гранулярных мембран деградируют, гранулы не восстанавливаются и тромбоциты теряют свою физиологическую активность. Если они находятся в токе крови, измененная форма клеток способствует их быстрой элиминации в селезенке.

**Активация тромбоцитов** имеет первостепенное значение в формировании первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосудов. Этот процесс можно разделить на три одновременно происходящих этапа:

- *активация* тромбоцитов с выбросом тромбоцитарных медиаторов из гранул;
- *адгезия* тромбоцитов к субэндотелиальным структурам;
- *агрегация* — активация, рекрутирование и фиксация в зоне повреждения дополнительных тромбоцитов.

Реакции тромбоцита на активирующие воздействия однотипны. Тромбоцит меняет форму на шарообразную, у него появляются псевдоподии, увеличивается площадь его поверхности. Соприкасаясь со стенкой сосуда, он расплывается по ней; в этот момент происходит инверсия мембранных фосфолипидов. На наружной поверхности тромбоцита появляются фосфолипиды с прокоагулянтными свойствами — *фактор 3 тромбоцитов*.

Происходит секреция содержимого пулов хранения тромбоцита во внешнюю среду. Тромбоциты фиксируются на поверхностях (поврежденный эндотелий, стенты, искусственные клапаны сердца) и соединяются друг с другом — происходят адгезия и агрегация. Одновременно реализуется способность тромбоцитов формировать тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты, которые активно участвуют не только в гемостатических, но и в воспалительных процессах. Часть активаторов тромбоцитов присутствует в подпороговых концентрациях в плазме и избирательно накапливается в зоне повреждения сосудов, другие появляются в системе циркуляции при активации системы свертывания крови в физиологических или патологических условиях. Это обеспечивает нарастание сигнала — активация одной молекулы предшествующего уровня в системе свертывания приводит к активации от нескольких десятков до нескольких сотен тысяч последующих молекул. Из крови в зону повреждения поступают адреналин, вазопрессин, тромбин, плазмин. Некоторые факторы выделяются из самих тромбоцитов (АДФ, серотонин, vWF). Стимулировать тромбоциты способны протеолитические энзимы, антитромбоцитарные антитела, комплекс «антиген–антитело», бактерии, опухолевые клетки. В условиях *in vitro* для стимуляции агрегации используют АДФ в разных концентрациях, эпинефрин (Адреналин<sup>а</sup>), коллаген, арахидоновую кислоту, ристомин, тромбин.

**Тромбоцитопения** — снижение числа тромбоцитов ниже 150×10<sup>9</sup>/л, а клинически значимое снижение — ниже 100×10<sup>9</sup>/л или на 50% исходного значения (например, при ОКС, гепарин-индуцированной тромбоцитопении — ГИТ). Тромбоцитопения может быть обусловлена недостаточным образованием тромбоцитов, повышенным их разрушением или потреблением (**табл. 8.2**). Тяжелая тромбоцитопения проявляется множественными петехиями на коже, кровотечениями из слизистых оболочек.

**Таблица 8.2.** Причины тромбоцитопенических состояний

Причины тромбоцитопении	Состояния, при которых возникает тромбоцитопения
<b>Нарушение образования</b> Уменьшение числа или отсутствие мегакариоцитов в костном мозге Недостаточное образование тромбоцитов — неэффективный тромбопоэз	Лейкозы, АА, ПНГ (иногда) Алкогольная тромбоцитопения, тромбоцитопения при мегалобластной анемии, некоторые МДС
<b>Усиленное потребление тромбоцитов</b>	Синдром ДВС, выраженный ангиоматоз, гигантская кавернозная гемангиома, механические искусственные клапаны сердца
<b>Усиленное разрушение и утилизация тромбоцитов</b>	Гиперспленизм различной этиологии, остеомиелофиброз с миелоидной метаплазией, болезнь Гоше.

Секвестрация тромбоцитов в селезенке и поглощение покрытых антителами тромбоцитов макрофагами

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитопения, связанная с ВИЧ, лекарственная тромбоцитопения (например, ГИТ), СКВ, лимфома

**Тромбоцитопатии** бывают врожденными и приобретенными.

*Врожденные (наследственные) тромбоцитопатии* — достаточно гетерогенная группа нарушения функции тромбоцитов. К ним относятся тромбоцитопатии с дефектом мембраны тромбоцитов, дефекты сигнальных молекул, дефекты цитоскелета, дефициты гранул, нарушения прокоагулянтных свойств тромбоцитов и др. Тромбоцитопатии проявляются нарушением взаимодействия тромбоцит–сосудистая стенка (дефекты адгезии), нарушениями межтромбоцитарного взаимодействия (дефекты агрегации), нарушениями секреции, аномалиями обмена арахидоновой кислоты и синтеза тромбоксана  $A_2$ , дефектами цитоскелета. Клинические проявления врожденных нарушений функции тромбоцитов для большинства заболеваний сходны. Отмечается кровоточивость разной степени выраженности по микроциркуляторному типу: петехии, экхимозы, длительные первичные кровотечения после травм слизистых, первичные послеоперационные кровотечения, носовые кровотечения, маточные кровотечения на фоне менструации. В большинстве случаев геморрагический синдром выражен несильно и редко угрожает жизни. Исключение составляют такие заболевания, как тромбастения Глянцманна, синдром Бернара–Сулье, при которых возможны опасные для жизни проявления: внутричерепные кровоизлияния, тяжелые маточные и носовые кровотечения, кровотечения со слизистых других локализаций, послеоперационные кровотечения. При тромбастении Глянцманна описаны гемартрозы с развитием артропатии, сходной с гемофилической. Следует учитывать, что дифференциальная диагностика наследственных тромбоцитопатий затруднена, но встречаются они очень редко; например, частота встречаемости тромбастении Глянцманна — 1:200 000–1:1 000 000 населения.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

*Приобретенные тромбоцитопатии* встречаются значительно чаще. Причиной их может быть прием лекарственных препаратов (ацетилсалициловая кислота, нестероидные противовоспалительные препараты, антагонисты кальциевых каналов, антибиотики), они могут быть осложнением заболеваний (уремия, миелопролиферативные, лимфопролиферативные заболевания, парапротеинемии).

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.1.3. Скрининговые лабораторные тесты для выявления тромбоцитарных нарушений

Диагностически значимыми скрининговыми лабораторными тестами, используемыми для диагностики нарушений функций тромбоцитов, являются количество тромбоцитов в периферической крови и их параметры, определяемые на анализаторах; время кровотечения, которое имитируется на тромбоэластографе/-метре по времени свертывания. При подозрении на нарушения тромбоцитарной функции в качестве дополнительных в КДЛ применяется исследование спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов как с помощью агрегометров, так и методом проточной цитометрии.

**Количество тромбоцитов и тромбоцитарные индексы** определяют гематологические анализаторы.

**PLT** — количество тромбоцитов. При подсчете на анализаторах тромбоциты распознаются как частицы с объемом от 1,8 до 30,0 фл с обработкой гистограммы распределения по объему. Автоматические анализаторы позволяют получать надежные результаты; CV для PLT не превышает 2–4%, в то время как при подсчете тромбоцитов в камере Горяева CV количества тромбоцитов достигает 7–15% и более. Подсчет тромбоцитов в мазке по Фонию неприемлем из-за низкой воспроизводимости результатов и рассматривается в настоящее время как устаревший. Анализаторы сигнализируют «флагами» на бланке о выходе количества тромбоцитов за референтные пределы, наличии агрегатов тромбоцитов, макротромбоцитов или других элементов, сравнимых по объему с тромбоцитами (микроэритроциты). При подсчете клеток на гематологических анализаторах в качестве антикоагулянта используется ЭДТА. При наличии в крови пациента аутоантител к тромбоцитам калиевая соль ЭДТА может инициировать агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией. Кроме агрегации клеток, ложное занижение числа тромбоцитов может наблюдаться при их агглютинации под действием белков — тромбоцитарных агглютининов или при адгезии тромбоцитов к лейкоцитам (тромбоцитарный «сателлитизм») и при нарушении преаналитических правил взятия крови. Стандартным подходом в таких случаях для исключения ЭДТА-индуцированной псевдотромбоцитопении является смена антикоагулянта на натрия цитрат.

Имеется проблема дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов), их фрагментов (шизоцитов), а также фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис). Существует несколько механизмов, предупреждающих подсчет одних элементов вместо других. Например, в приборах, использующих кондуктометрический метод, анализируется не только высота электрического импульса, но и его форма. Если доля частиц с объемами в области 30 фл превышает запрограммированный порог, то выводится на экран сообщение «Micro RBC» либо «Macro PLT». При этом достоверность определения количества тромбоцитов снижена.

**MPV** у здоровых людей равен 7,4–10,4 фл и находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов. Такое соотношение определяет постоянство тромбоцитарной массы в циркулирующей крови. Увеличение MPV наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, СД, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом. Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях. Уменьшение этого показателя отмечается после спленэктомии и при синдроме Вискотта–Олдрича. Увеличение доли крупных тромбоцитов позволяет думать о компенсаторном увеличении образования тромбоцитов.

Часто это связано с укорочением жизни тромбоцитов в периферическом кровотоке. При необходимости оценки продукции тромбоцитов исследуется пунктат костного мозга, что позволяет оценить число и внешний вид мегакариоцитов и подтвердить наличие нарушений мегакариоцитарного роста.

**PDW** — показатель гетерогенности размеров (анизоцитоза) тромбоцитов. Величина PDW в среднем составляет 10–15%.

Этот показатель находится в обратной зависимости от числа тромбоцитов и их периода жизни. В каждом конкретном случае важна не только величина PDW, но и его динамика во времени, а также связь с другими тромбоцитарными показателями. Так, увеличение PDW с одновременным снижением MPV свидетельствует о преобладании микротромбоцитов среди общей популяции тромбоцитов (указывает на угнетение тромбоцитопоеза), а сочетание повышенного PDW с увеличением MPV отражает нарастание числа макротромбоцитов (усиление продукции тромбоцитов). В современных гематологических анализаторах отдельными показателями указывается процентное содержание микротромбоцитов (MicroPLT) и макротромбоцитов (MacroPLT). Увеличение PDW свыше 15% было обнаружено у 50% больных эссенциальной тромбоцитемией, у 21% пациентов с реактивным тромбоцитозом, но и у 14% здоровых людей.

Как артефакт, ложнозавышенное увеличение PDW может быть связано с присутствием микроцитов, шизоцитов, микроагрегатов тромбоцитов, фрагментов цитоплазмы лейкоцитов.

**PCT** — тромбокрит, показатель, характеризующий процент тромбоцитарной массы в объеме крови, вычисляется суммированием прямо измеренных объемов тромбоцитов или произведением MPV на их число:

$PCT = MPV \times PLT$ .

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

У здорового человека показатель стремится остаться стабильным: при уменьшении числа тромбоцитов усиливается тромбопоэз, и в циркулирующую кровь выбрасывается большее число молодых макротромбоцитов, что ведет к увеличению MPV. При увеличении количества циркулирующих тромбоцитов снижается продукция их в костном мозге, тем самым уменьшается процент макротромбоцитов, и MPV уменьшается. Однако при нарушении этого равновесия происходит или уменьшение PCT, что в конечном счете приводит к патологии первичного гемостаза и риску возникновения кровотечений, или повышение PCT, увеличивающее активность тромбоцитов и их способность к агрегации. Это повышает риск тромбозов.

Нормальные значения PCT варьируют в пределах 0,15–0,40%. Было обнаружено снижение PCT менее 0,1% при послеоперационных кровотечениях у пациентов с развившейся тромбоцитопенией. Отмечалось, что этот показатель более чувствителен для оценки риска возникновения кровотечения, чем число тромбоцитов.

Дополнительные показатели для тромбоцитов, рассчитываемые некоторыми гематологическими анализаторами, представлены в главе «Лабораторная гематология».

**Время кровотечения** — это время от момента нанесения стандартного повреждения кожи до момента прекращения вытекания крови. Оно характеризует функциональную активность тромбоцитов в совокупности с состоянием сосудистой стенки и используется для выявления тромбоцитопатии различного генеза и некоторых редких нарушений сосудистой стенки, при которых нарушен первичный гемостаз. Этот метод не стандартизован, обладает низкой ДС и ДЧ даже для получения самых общих сведений о нарушении гемостаза. Состояние гиперкоагуляции вообще не идентифицируется этим способом.

**Имитированное время кровотечения** выполняется на приборах типа PFA (Platelet Function Analyzer), в котором в измерительном картридже цитратная кровь пропускается через капилляр диаметром примерно 150 мкм, моделирующий микрососуд, покрытый пленкой из коллагена/адреналина или коллагена/АДФ. Это сопровождается образованием тромбоцитарной пробки, что оценивается по перфузионному давлению. Остановка перфузии фиксируется как «время кровотечения». Метод позволяет эффективно выявлять функциональные нарушения тромбоцитов, вызванные ацетилсалициловой кислотой, наследственные и приобретенные нарушения адгезии и агрегации тромбоцитов.

Технология PFA относится к глобальным тестам оценки гемостаза *in vitro*, является объективной заменой теста на время кровотечения, перспективна для внедрения в КДЛ.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.1.4. Функциональная активность тромбоцитов

Стандартизация исследования функции тромбоцитов бывает затруднена из-за значительного изменения их свойств при пробоподготовке, а также из-за отсутствия КМ. Традиционным тестом функциональной активности тромбоцитов является исследование в плазме богатой тромбоцитами спонтанной агрегации (на некоторых приборах) и агрегации, индуцированной разными активаторами. Причиной нарушений агрегации тромбоцитов могут быть ЛС (ацетилсалициловая кислота и другие нестероидные противовоспалительные препараты, антиагреганты, блокирующие рецепторы тромбоцитов к АДФ или фибриногену, антибиотики  $\beta$ -лактамового ряда, некоторые витамины), а также пряности и алкоголь. Поэтому для адекватной оценки результатов теста требуется тщательная стандартизованная подготовка больных, информирование лаборатории о приеме пациентом лекарств (особенно ацетилсалициловой кислоты и нестероидных противовоспалительных препаратов в предшествующие 7–9 дней), четкая стандартизация взятия и обработки крови и выполнение аналитических процедур строго по инструкции. В специализированных лабораториях выполняются тесты исследования агрегации в цельной крови, исследование активности рецепторов и определение в сыворотке содержимого тромбоцитарных гранул, освобождающихся при их активации на высокотехнологичных анализаторах.

Основными используемыми индукторами агрегации являются АДФ (для оценки общей активности и подавления ее препаратами группы антиагрегантов, блокирующих рецептор к АДФ — P2Y<sub>12</sub>); коллаген, адреналин, арахидоновая кислота (для оценки общей активности и действия ацетилсалициловой кислоты); ристомидин/ристоцетин<sup>69</sup> (для оценки адгезивной способности тромбоцитов и vWF).

**АДФ-индуцированная агрегация** является дозозависимой: как правило, при добавлении 0,5–1 мкмоль/л АДФ развивается обратимая агрегация, при внесении 5 мкмоль/л — двухфазная агрегация, при большей дозе (до 10 мкмоль/л) — необратимая однофазная агрегация. Однако агрегатограммы очень вариабельны даже у здоровых людей. АДФ-индуцированная агрегация отсутствует:

- при тромбастении Глянцманна (недостаточность рецепторов к фибриногену).

АДФ-индуцированная агрегация снижена при:

- приеме антиагрегантов из группы блокаторов пуриновых рецепторов тромбоцитов к АДФ (*клопидогрел, прасугрел, тикагрелор*);
- приеме ацетилсалициловой кислоты — иногда;
- синдроме «серых» тромбоцитов;
- использовании средств для наркоза, алкоголя.

Отсутствует вторая волна АДФ-индуцированной агрегации при:

- нарушении в системе сигнальных путей тромбоцитов;
- использовании ацетилсалициловой кислоты;
- нарушении реакции высвобождения (аспириноподобный эффект).

**Адреналин-индуцированная агрегация** в значительной степени зависит от уровня ионов Ca<sup>2+</sup> в среде.

При их физиологической концентрации (1–2 ммоль/л) адреналин не ведет к активации тромбоцитов и их агрегации, при значительном снижении Ca<sup>2+</sup> в цитратной плазме (до 20–40 мкмоль/л) адреналин вызывает дозозависимую агрегацию с экспрессией комплекса GP IIb/IIIa (первичная волна) и тромбоксан-опосредованной вторичной волной. По-видимому, в физиологических условиях в организме прямая адреналиновая агрегация отсутствует, адреналин потенцирует действие других агонистов.

Адреналин-индуцированная агрегация отсутствует при:

- тромбастении Глянцманна.

Адреналин-индуцированная агрегация снижена при:

- приеме ацетилсалициловой кислоты;
- нарушении секреции;
- дефекте рецепторов адреналина;
- квебекской аномалии тромбоцитов;
- дефиците плотных гранул.

Отсутствует вторая волна агрегации под действием адреналина:

- при дефиците плотных гранул;
- при использовании ацетилсалициловой кислоты.

**Коллаген-индуцированная агрегация.** Коллаген как естественный агент, стимулирующий тромбоциты, широко используется в лабораторной практике (обычно в конечной концентрации 10–20 мг/л). Активные тромбоциты легко связываются с коллагеном (имитируя адгезию к сосудистой стенке), затем наступает вторичная активация с синтезом и выбросом тромбоксана A<sub>2</sub> и последующей агрегацией клеток. На коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов влияет ацетилсалициловая кислота, снижая ее вследствие блокады продукции тромбоксана, поэтому коллаген считается простым и доступным индуктором для выявления аспиринорезистентности.

Коллаген-индуцированная агрегация отсутствует при:

- тромбастении Глянцманна;
- тромбоцитопатии с отсутствием рецепторов коллагена.

Адреналин-индуцированная агрегация снижена при:

- приеме ацетилсалициловой кислоты;
- дефиците плотных гранул;
- синдроме «серых» тромбоцитов;
- дефиците рецепторов коллагена.

Отсутствует вторая волна агрегации под действием коллагена при:



- использовании ацетилсалициловой кислоты, блокаторов кальциевых каналов.

Повышение коллаген-индуцированной агрегации может наблюдаться при ССЗ, атеросклерозе, но не является клинически значимым и не используется в диагностике этих состояний.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

В целом индуцированная в лабораторных условиях агрегация тромбоцитов не включена в настоящее время в клинические рекомендации по контролю антиагрегантной терапии. Однако оценка остаточной реактивности тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов может быть измерена разными способами, в том числе приборами исследований по месту лечения (VerifyNow, Innovance PFA-200) и дать полезную информацию о потенциальной эффективности проводимой терапии.

**Ристоцетин<sup>Ⓢ</sup> (ристомин)<sup>Ⓢ</sup>-индуцированная агрегация** применяется для количественной оценки vWF. Установлена линейная зависимость между степенью ристоцетиновой агрегации и количеством vWF. В основе метода лежит способность антибиотика ристоцетина<sup>Ⓢ</sup> (ристомин) стимулировать *in vitro* взаимодействие vWF с тромбоцитарным гликопротеином Ib. В большинстве случаев болезни Виллебранда отмечается нарушение ристоцетин<sup>Ⓢ</sup>-агрегации при нормальной агрегации на АДФ, коллаген и адреналин. Нарушение ристоцетин<sup>Ⓢ</sup>-агрегации выявляют и при макроцитарной тромбоцитопатии Бернара–Сулье (отсутствие на мембране тромбоцитов рецепторов для фактора Виллебранда). Для дифференциации применяют тест с добавлением нормальной плазмы: при болезни Виллебранда после добавления нормальной плазмы ристоцетин<sup>Ⓢ</sup>-агрегация нормализуется, в то время как при синдроме Бернара–Сулье этого не происходит.

Ристоцетин<sup>Ⓢ</sup>-индуцированная агрегация отсутствует при:

- синдроме Бернара–Сулье;
- болезни Виллебранда.

Ристоцетин<sup>Ⓢ</sup>-индуцированная агрегация снижена при:

- болезни Виллебранда (кроме 2N-типа);
- нарушении секреции;
- дефиците плотных гранул.

С помощью агрегатометрии производится диагностика врожденных нарушений функции тромбоцитов (табл. 8.3).

Таблица 8.3. Изменения агрегатограмм при врожденных нарушениях функции тромбоцитов

Индуктор агрегации/болезнь	АДФ		Адреналин		Арахидоновая кислота	Тромбин	Коллаген	Ристоцетин
	Первая волна	Вторая волна	Первая волна	Вторая волна				
Болезнь Виллебранда	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	↓ (кроме субтипов 2N и 2B)
Синдром Бернара–Сулье	Н	Н	Н	Н	Н	Н/↓	Н	↓
Тромбастения Глянцманна	↓	↓	↓	↓	↓	↓		+/-
Синдром «серых» тромбоцитов	↓	↓↓↓	↓	↓	Н/↓	+/-	↓	+/-

Примечание. Н — нормальная агрегатограмма; ↓ — сниженная реакция на индуктор агрегации. Методы исследования индуцированной агрегации тромбоцитов, основанные на добавлении в плазму, богатую тромбоцитами, разных индукторов, технологически отличаются по способу детекции происходящих процессов агрегации тромбоцитов: оптический, импедансный, лазерный. Эти способы детекции реализованы в специальных приборах — агрегометрах. В настоящее время блок исследования тромбоцитов оптическим методом появился в автоматических коагулометрах. Устаревшим является исследование агрегации тромбоцитов на стекле. При любом способе детекции исследование должно быть выполнено в течение 1–2 ч после получения пробы крови, без транспортировки (или с транспортировкой на короткое расстояние в шадящем режиме). Плазма для исследования не подлежит замораживанию.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

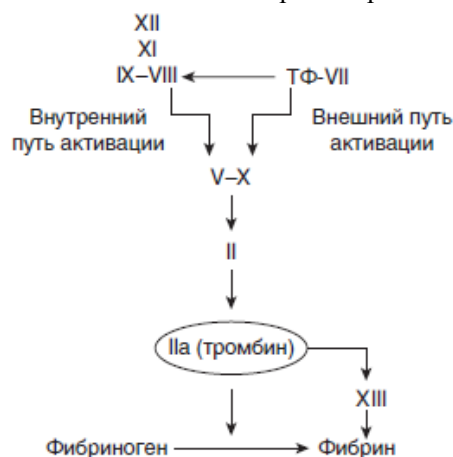
8.2. Плазменный гемостаз

Плазменный гемостаз — это система ферментов, кофакторов и ингибиторов свертывания, целью которой является образование фермента тромбина, а в конечном итоге — фибринового сгустка, составляющего основу тромба.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.2.1. Коагуляционный каскад активации свертывания крови

Свертывание плазмы представляет собой каскад протеолитических реакций, в ходе которого неактивные проферменты переходят в активное состояние и приобретают способность активировать следующий профермент. Реакции идут в строгой последовательности, которая в течение многих десятилетий представлялась в виде двух путей активации — внешнего и внутреннего (рис. 8.1). В конце XX в. на основании экспериментальных и клинических данных теория свертывания крови была существенно пересмотрена: определена роль клеточных элементов и мембраны тромбоцитов, изменены представления о значении и функционировании фактора XII, изучены перекрестные связи между внешним и внутренним путями активации. Система плазменного гемостаза стала разделяться не на два пути активации, а на три этапа — инициации, усиления и распространения, генерации тромбина и фибрина. Все эти обновления получили название клеточной теории свертывания (cell-based coagulation).



**Рис. 8.1.** Каскадные реакции плазменного гемостаза — функционирование и интеграция внешнего и внутреннего пути свертывания крови

Тем не менее для повседневного использования в клинической и лабораторной практике, особенно для интерпретации результатов скрининговых тестов коагулограммы, представление о внешнем и внутреннем путях активации сохраняет свою актуальность, а фактор XII подтверждает свою значимость для стартовой активации *in vitro* по внутреннему пути.

**Внешний путь образования протромбиназы** короткий, что ведет к быстрому тромбообразованию. Активация происходит через тканевой фактор. Тканевого фактора в системе циркуляции в норме нет, поэтому путь назвали «внешний». Тканевой фактор появляется при повреждении тканей из клеточных мембран, клеток крови, клеток субэндотелия и других тканей, богатых тромбопластином. В частности, моноциты содержат полноценный тканевой фактор. В физиологических условиях все факторы свертывания находятся в кровотоке в неактивном состоянии. Только малое количество фактора VII постоянно пребывает в крови в активной форме — фактор VIIa. При контакте тканевого фактора и фактора VIIa формируется комплекс, который переводит неактивный фактор X в активный фактор Xa. Фактор Xa при участии фактора Va в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности формирует протромбиназу. На начальном этапе количество этого комплекса небольшое, так же как и количество тромбина, но это количество позволяет через тромбиновые рецепторы активировать тромбоциты, мембрана которых становится матрицей для формирования и распространения дальнейших реакций коагуляционного каскада. Внешний путь образования протромбиназы достаточно быстрый, это основной путь запуска процесса свертывания крови, быстро реагирующий на повреждение тканей.

Активность внешнего пути поддерживается за счет положительной обратной связи, в которую включены несколько механизмов, из них наиболее существенной является активация тромбином факторов VII и V.

**Внутренний путь активации протромбиназы** начинается с контактной активации факторов коагуляционного каскада — фактора XII, высокомолекулярного кининогена, прекалликреина. К факторам контактной активации относят и фактор XI. Все эти факторы присутствуют в системе циркуляции, поэтому путь обозначили как «внутренний». Физиологическое значение именно контактной активации невелико и заключается во взаимодействии в начале процесса свертывания с поверхностью «твердого тела». Все сосуды покрыты эндотелием, мембраны которого характеризуются высокой текучестью. Появление «твердого тела» для плазменных факторов и для тромбоцитов — сигнал патологии и активации. В физиологических условиях основными инициаторами контактной активации являются коллаген субэндотелия и инвертированная фосфолипидная мембрана тромбоцитов, формирующаяся после реакции освобождения тромбоцитарных факторов. По-видимому, фактор XIIa можно рассматривать как «рецептор патологии». Его активная форма является инициатором фибринолиза, воспаления, аутолиза, иммунных реакций. Поэтому фактор XIIa часто исключается из схем коагуляционного каскада, описывающих реакции *in vivo*. Тем не менее в реакциях *in vitro*, в лабораторных исследованиях он проявляет свою активность и может существенным образом влиять на результат скринингового теста — активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ).

Контактная активация играет важную роль в активации свертывания крови при взаимодействии крови с нефизиологическими поверхностями, в частности при установке искусственных протезов или искусственных клапанов сердца. *Ex vivo* активация контактного пути происходит во время гемодиализа, при процедуре искусственного кровообращения и экстракорпоральной мембранной оксигенации, при которых кровь вступает

в контакт с искусственным покрытием. Антикоагулянтные препараты и стабилизаторы (натрия цитрат или гепарин), необходимые для поддержания потока крови через экстракорпоральный контур, не предотвращают контактную активацию. Более успешными представляются блокирующие фактор XIIa антитела, которые оказались способными предотвращать нежелательное свертывание крови во время этих процедур без обычного риска кровотечений, связанного с применением антикоагулянтов. Поэтому использование компонентов контактной системы в качестве потенциальных мишеней терапии представляется перспективной стратегией для профилактики и лечения тромбозов с минимальным или нулевым риском кровотечения при плановых экстракорпоральных процедурах.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Очевидно, что белки контактной системы имеют ограниченное значение при коагуляции с целью остановки кровотечения, но необходимы для формирования фибрина в ходе воспалительной реакции, для инициации и усиления активности фибринолиза, кининогенеза, ренин-ангиотензиновой системы и системы комплемента.

Внешний и внутренний пути сходятся в точке образования протромбиназного комплекса, который состоит из фактора Ха, фактора Va, фосфолипидов и  $\text{Ca}^{2+}$ . На протромбиназном комплексе активируется протромбин с образованием тромбина, который действует на фибриноген и приводит к формированию нитей фибрина. Стабилизирующую роль в образовании фибрина играет фактор XIII (трансглутаминаза), активатором которой является тромбин.

**Тромбин** — ключевой фермент гемостаза, образуется из протромбина — витамин-К-зависимого белка. Синтез протромбина происходит в печени, протромбин циркулирует в плазме в неактивной форме, так как его активный центр заблокирован собственным структурным компонентом. В комплексе факторов Ха–Va–II на фосфолипидной поверхности происходит ограниченный протеолиз протромбина. При расщеплении протромбина образуется протромбиновый фрагмент F1+2. Тромбин — сериновая протеаза, на молекуле которой имеется по крайней мере четыре сайта связывания для субстратов, ингибиторов, кофакторов и иона кальция. Способность тромбина активно функционировать на твердой фазе и в токе крови позволяет ему выполнять многочисленные функции. Важнейшие функции тромбина в гемостазе:

- ограниченный протеолиз фибриногена до фибрин-мономеров;
- активация факторов V, VIII, VII, XI;
- активация тромбоцитов;
- в комплексе с тромбомодулином активирует антикоагулянт протеин C;
- активация фактора XIII;
- ограниченный протеолиз плазматической карбоксипептидазы В до формы активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (TAFI).

Важнейшим ингибитором тромбина является антитромбин (АТ). Несколько меньшую роль играет кофактор гепарина II.

**Фибриноген** — предшественник фибрина — молекула, обладающая свойством быстро полимеризоваться в токе крови и образовывать прочный тромб, состоящий из нитей фибрина, тромбоцитов, других форменных элементов, эффективно закрывающий дефект сосуда и предотвращающий потерю крови. Фибрин образуется под действием тромбина не только при механическом повреждении сосудистой стенки для остановки кровотечения, но и во всех случаях дисфункции эндотелия при наличии дополнительных триггерных факторов. Важным является также тот факт, что отложения фибрина могут формироваться экстравазально при воспалительных и опухолевых процессах. Фибриноген, помимо формирования фибрина, принимает участие в агрегации и адгезии тромбоцитов, влияет на взаимодействие форменных элементов крови с сосудистой стенкой. Концентрация фибриногена в крови здорового человека значительно выше, чем концентрация других белков гемостаза. Синтез фибриногена происходит в печени и не зависит от витамина К. Некоторое количество фибриногена синтезируется в мегакариocyтах и содержится в тромбоцитах. Фибриноген — большой многокомпонентный белок, который состоит из трех пар полипептидных цепей — 2а, 2б, 2в, связанных между собой дисульфидными связями и переплетенных друг относительно друга. Тромбин отщепляет от фибриногена фибринопептид А и фибринопептид В, после чего формируются фибрин-мономеры, которые способны полимеризоваться и подвергаться перекрестной сшивке (cross-linked fibrin). Пространственная структура молекулы фибриногена состоит из центрального Е-домена и двух периферических D-доменов.

**Фактор XIII** — трансглутаминаза. В плазме большая часть фактора XIII связана с фибриногеном. Активируется фактор XIII за счет ограниченного протеолиза тромбином, что происходит одновременно с отщеплением фибринопептида А от фибриногена. Фактор XIIIa образует ковалентные связи между α-цепями нитей растворимого олигомера фибрина, которые соединяются за счет образования пептидных мостиков между боковыми радикалами лизина и глутамина. Сшитые между собой мономерами фибрина образуют прочную сеть, в такой форме фибрин не растворяется, плазма сворачивается.

**Витамин К-зависимые плазменные факторы.** Шесть белков плазмы крови, участвующих в реакциях коагуляции, являются витамин К-зависимыми — факторы II, VII, IX, X, антикоагулянты протеины С и S. Все они синтезируются в основном в печени в неактивной форме и под действием жирорастворимого витамина К приобретают способность к активации. Биохимический механизм состоит в α-карбоксилировании глутаматных остатков белков под действием витамин К-зависимой карбоксилазы. В результате формируется участок карбоксилированной глутаминовой кислоты, который способен взаимодействовать с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Именно витамин К-зависимый процесс делает белки способными взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$ , это происходит не только в системе свертывания, но и при формировании костной ткани,

где за счет этой реакции взаимодействуют органический и неорганический компоненты. В случае недостатка витамина К процессы карбоксилирования не идут и указанные белки поступают в кровоток в виде PIVKA (Protein Induced in Vitamin K Adsance), которые неспособны связывать  $Ca^{2+}$ . PIVKA могут быть измерены, свидетельствуют о дефиците витамина К (нарушение поступления с пищей, нарушение всасывания в отсутствие желчных кислот, нарушение продукции естественной кишечной флорой), но не только. В последние годы PIVKA рассматриваются как маркеры гепатоцеллюлярного рака и рака ПЖ.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

8.2.2. Естественные антикоагулянты

В табл. 8.4 представлены основные ингибиторы системы свертывания крови, которые контролируют процессы активации свертывания, локализуют их в месте повреждения и предотвращают распространение тромбоза.

Таблица 8.4. Ингибиторы системы свертывания плазмы крови

Аббревиатура	Вещество	Субстрат (объект действия)
AT	AT	Факторы IIa, IXa, Xa, XIa
PC	Протеин С (зависит от витамина К)	Факторы VIII, V
PS	Протеин S (кофактор протеина С) (зависит от витамина К)	Факторы VIII, V
	α2-Макроглобулин	Протеазы (неспецифический ингибитор)
C1-Ing	C1-ингибитор	Факторы XIIa, XIa
	α1-Ингибитор протеаз	Фактор XIa
PAI-3	Ингибитор протеина С	Активированный протеин С (аПС), комплекс тромбин–тромбомодулин
TFPI	Ингибитор внешнего пути (пути тканевого фактора)	Коагуляционный фактор Xa, комплекс факторов VIIa-TF
	Гепариновый кофактор II	Тромбин

Основными ингибиторами, исследуемыми в лаборатории, являются АТ, протеин С и протеин S.

**АТ, гепарин и их биологическая роль.** Активированный АТ формирует стабильный комплекс (1:1) с сериновыми протеазами плазменного гемостаза, в частности с тромбином, ингибируя их. АТ — гликопротеин, способный связываться со специфическими сульфатными группами на пентасахаридных структурах гепарина. После этого в молекуле АТ происходит конформационный сдвиг, его активность повышается более чем в 1000 раз. АТ синтезируется в печени и является наиболее значимым ингибитором системы свертывания крови. Помимо тромбина, АТ ингибирует фактор Xa, а также факторы IXa, XIa, XIIa. Активность АТ существенно усиливается в присутствии отрицательно заряженных гликозаминогликанов, таких как гепарансульфат, входящих в структуру гликокаликса на поверхности эндотелиальных клеток. Аналогичное действие на АТ оказывают гепарин, вырабатываемый тучными клетками (расположены в основном в периваскулярной соединительной ткани), и фармакологические препараты — нефракционированный гепарин (НФГ) и низкомолекулярные гепарины (НМГ), получаемые из гепарина химической или энзиматической обработкой.

Тромбин, факторы Xa и IXa при связывании с АТ инактивируются. После образования эквимольного (1:1) комплекса «тромбин–АТ» гепарин может освобождаться для организации других комплексов. НФГ связывается одновременно как с ингибируемым ферментом, так и с АТ, тогда как НМГ связывается только с молекулой АТ. Поэтому НМГ более эффективно освобождается из комплекса и более активно подавляет факторы Xa и IXa, что препятствует образованию тромбина. В составе протромбиназного комплекса, содержащего фосфолипиды,  $Ca^{2+}$  и фактор Va, фактор Xa становится нечувствительным к ингибирующему эффекту АТ/гепарина, тогда как свободная форма фактора Xa быстро ингибируется комплексом «АТ/гепарин».

Гепарин и НМГ широко используются для профилактики и лечения тромбоэмболических осложнений. Для реализации их антикоагулянтного эффекта в крови необходимо не менее 60% обычной концентрации АТ. Антикоагулянтное действие гепарина можно быстро и обратимо снять внутривенным введением протамина сульфата — белка, ковалентно связывающегося с гепарином.

**Протеин С** — витамин К-зависимый белок плазмы, синтезируется в печени. аПС является специфической сериновой протеазой, сходной по структуре с другими витамин К-зависимыми сериновыми протеазами. Основная функция его в гемостазе — инактивация факторов Va и VIIa, являющихся неферментными ускорителями свертывания крови. Протеин С, связываясь со специфическим рецептором на эндотелиальной мембране, контактирует с комплексом «тромбин–тромбомодулин», следствием чего является ограниченный протеолиз протеина С с образованием активной сериновой протеазы. аПС — очень специфичная протеаза, которая в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  инактивирует путем протеолиза исключительно белки-акселераторы плазменного гемостаза Va и VIIa, причем только в том случае, если они собраны в комплекс с фосфолипидами. Протеин S является кофактором этой реакции. Время полувыведения аПС из плазмы — примерно 15 мин.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

**Протеин S** — витамин K-зависимый белок, синтезируемый в печени. Протеин S присутствует в плазме как в свободном состоянии, так и в комплексе со связывающим белком, который доставляет протеин S на фосфолипидную мембрану. аПС в кооперации со свободным протеином S разрушает активные формы факторов VIIa и Va, причем только свободная форма протеина S активна в качестве кофактора аПС.

**Тромбомодулин** — мембранный белок эндотелиальных клеток, в системе микроциркуляции его концентрация относительно высока. Тромбомодулин связывает тромбин и изменяет его действие с прокоагулянтного на антикоагулянтное. Это в первую очередь вызвано тем, что комплекс «тромбомодулин–тромбин» активирует протеин C, приводя к образованию аПС. Прямая активация протеина C тромбином очень слаба и не имеет физиологического значения. Связывание протеина C со специфическим рецептором на поверхности эндотелиальных клеток сопровождается повышением чувствительности к комплексу «тромбомодулин–тромбин» и резкой активацией протеина C.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.2.3. Фибринолиз

Система фибринолиза — протеолитическая система плазмы крови, ответственная за лизис фибринового сгустка, а также вовлеченная в деградацию коллагена, ангиогенез, сопряженная с процессом апоптоза и связанная с другими протеолитическими системами. Фибринолиз локализует образование фибрина в месте повреждения, сдерживает избыточное фибринообразование, препятствуя окклюзии просвета сосуда. Центральным ферментом фибринолиза является плазмин, на регуляцию активности которого направлены все реакции системы фибринолиза.

**Внешний и внутренний пути активации плазминогена.** В фибринолизе, так же как в системе коагуляции, имеется два пути: внешний и внутренний пути активации плазминогена. Эти пути, в отличие от коагуляционного каскада, не подверглись смене парадигмы и по-прежнему рассматриваются как работающие *in vivo*.

**Внешний путь активации плазминогена** начинается с выхода из эндотелиальных клеток тканевого активатора плазминогена (t-PA) и проурокиназы. Эти вещества преимущественно активируют плазминоген, связанный с фибрином; благодаря этому фибринолиз идет только в тромбах. На тромбах комплекс «фибрин–тканевый активатор–плазминоген» — наиболее специфическое и эффективное действующее начало фибринолиза. В результате образования этого комплекса плазминоген переходит в активный плазмин, который разрушает пептидные связи в фибрине.

**Урокиназа** имеет различное происхождение — образуется в почках, кроме того, фибробластами, эпителиальными клетками, пневмоцитами, децидуальными клетками плаценты и эндотелиоцитами. Многие клетки содержат рецепторы к урокиназе, что послужило основанием считать ее основным активатором фибринолиза в межклеточном пространстве, обеспечивающем протеолиз в процессе клеточного роста, деления и миграции клеток.

**Внутренний путь активации фибринолиза** обеспечивается высокой степенью гомологии в структуре фактора XII, плазминогена и тканевых активаторов плазминогена, способностью калликреина активировать плазминоген и проактиватор плазминогена урокиназного (про-u-PA) и тканевого (про-t-PA) типов. Процесс активации фибринолиза фактором XII резко усиливается при остановке кровотока и образовании фибрина. Это приводит к очищению сосудистого русла от фибриновых сгустков, образующихся в процессе внутрисосудистого свертывания крови. В связи с этим у пациентов с дефицитом факторов контактной активации (прекалликреина, фактор XII, высокомолекулярного кининогена) при сохраненных плазменных факторах происходит снижение генерации тромбина и удлинение *in vitro* АЧТВ, но не возникает кровоточивости. Наоборот, в результате неполноценной активации фибринолиза имеется тенденция к тромбозам. В процессе фибринолиза, как и в плазменном звене коагуляции, внешний и внутренний пути активации плазминогена взаимодействуют между собой. В процессе фибринолиза функционируют и обратные связи. Так, проурокиназа активируется до урокиназы под действием плазмينا (положительная обратная связь), эффект усиливается при связывании с урокиназным рецептором.

**PAI-1** — специфический ингибитор t-PA и u-PA. Он относится к группе ингибиторов сериновых протеаз. Помимо этого, он может подавлять активацию фибринолиза стрептокиназой. Основная функция PAI-1 — ограничить фибринолитическую активность местом расположения гемостатической пробки за счет ингибирования t-PA. Это выполняется легко за счет большего содержания его в сосудистой стенке по сравнению с t-PA. На месте повреждения активированные тромбоциты выделяют избыточное количество PAI-1, предотвращая преждевременный лизис фибрина.

PAI-1 обнаружен в плазме и тромбоцитах. В плазме он связан с витронектином. PAI-1 синтезируется в эндотелиальных клетках. Если концентрация PAI-1 в крови повышается, увеличивается риск тромбозов.

У гена *PAI-1*, который называется *PLANHI*, выявлен полиморфизм в промоторной области; он известен как полиморфизм *5G(-675)4G*. Аллель *5G* сопровождается меньшей активностью, чем аллель *4G*. Поэтому у носителей аллеля *4G* концентрация *PAI-1* выше, чем у носителей аллеля *5G*, что приводит к повышению риска тромбообразования, а во время беременности — к повышению рисков нарушения функции плаценты и невынашивания беременности. В популяции возможны три варианта генотипа: *5G/5G*, *5G/4G*, *4G/4G*. Оказалось, что в крови людей, имеющих вариант *4G/4G*, концентрация *PAI-1* значительно выше, чем у людей, имеющих варианты *5G/5G* и *5G/4G*. Оказалось также, что вариант *4G/4G* предрасполагает не только к повышению риска тромбозов, но и к ожирению и повышению уровня ХС. Торможение фибринолиза у таких людей ведет к значительному риску летальности в результате септических инфекций, в частности менингококковой инфекции у детей. Поскольку многие осложнения беременности, в частности гестоз, сопровождаются тромбозом спиральных артерий, снабжающих плаценту, риск гестоза у женщин, являющихся носительницами варианта *5G/4G*, примерно в 2 раза выше, чем у женщин — носительниц варианта *5G/5G*, а у женщин — носительниц варианта *4G/4G* риск гестоза был в 2 раза выше, чем при варианте *5G/4G*. Поэтому исследование полиморфизма *5G/4G* стало важной составной частью обследования при наличии в анамнезе осложнений течения беременности (остановки развития

на малых сроках, тяжелые гестозы, внутриутробная смерть плода, гипотрофия и задержка внутриутробного развития, хроническая внутриутробная гипоксия плода, преждевременное созревание плаценты). Исследование полиморфизма гена *PAI-1* важно проводить при подготовке к экстракорпоральному оплодотворению, поскольку мощная гормональная стимуляция эстрогенами, сопровождающая схемы экстракорпорального оплодотворения, является фактором, повышающим риск тромбозов в месте имплантации. Несмотря на приведенные данные, продолжают дискуссии о клиническом значении генотипа *PAI-1* из-за высокой частоты встречаемости аллеля *4G* в популяции. В настоящее время генетические варианты *4G/5G* и *4G/4G* не относят к наследственным тромбофилиям.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

**А2-Антиплазмин, А2-макроглобулин, А1-антитрипсин** совместно предупреждают появление плазмينا в системе циркуляции в свободном виде, исключая его деградирующий эффект на фибриноген, а также на факторы свертывания VIII и V и другие плазменные белки. Деятельность этих ингибиторов является важным условием поддержания гемостатического баланса. Измерение данных маркеров не имеет широкого распространения в КДЛ, не влияет на принятие клинических решений и проводится в основном в исследовательских целях. Тем не менее их роль в реакциях фибринолиза существенна, и в перспективе при накоплении доказательной базы и расширении технологических возможностей лабораторий исследование таких маркеров может быть включено в клинические рекомендации.

**Продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ) и D-димеры.** Плазмин является очень активной и в то же время относительно неспецифичной сериновой протеазой. Тем не менее он лизирует в фибрине и фибриногене связи между фрагментами D и E. При лизисе фибрина плазмин не разрушает сформировавшиеся в процессе полимеризации прочные связи между фрагментами D. Поэтому при деградации фибрина образуются в основном комплексы D-димеры.

ПДФ в широком понимании могут формироваться на разных этапах фибринообразования. D-димеры являются одними из составляющих компонентов, объединенных под термином «ПДФ», которые образуются уже при свершившемся тромбообразовании. В связи с этим D-димеры нужно рассматривать не столько как маркеры активации фибринолиза, сколько в качестве маркеров активации свертывания крови, в то время как суммарную группу ПДФ — в обоих качествах. Определяя D-димеры, определяем продукты разрушения фибринового тромба, определяя ПДФ, выявляем результат протеолитического действия плазмينا, который может быть связан как с разрушением тромба (фибринолиз), так и с активацией плазмينا активаторами фибринолиза даже в отсутствие тромба, но в результате действия его на фибриноген.

Некоторые фрагменты ПДФ обладают выраженной физиологической активностью. Они снижают агрегацию тромбоцитов и нарушают полимеризацию фибрин-мономеров, являясь по сути антикоагулянтами. ПДФ способны нарушать целостность или повышать проницаемость сосудистой стенки. Поэтому при некоторых клинических ситуациях с низкой концентрацией фибриногена кровотечения могут быть вызваны не только уменьшением концентрации фибриногена, но и присутствием ПДФ, формирующихся при активном фибринолизе.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.2.4. Базовые тесты, характеризующие плазменный гемостаз

Выполнение всех возможных тестов для уточнения характера нарушений свертывания крови — практически недоступная задача. Поэтому важно соблюдать этапность проведения тестов, исходя при этом из клинических данных и анамнеза пациента.

На первом этапе для уточнения направленности нарушений необходимо провести тесты, отражающие состояние целых звеньев системы гемостаза. Существует набор тестов, традиционно называемых скрининговыми, для диагностики состояния системы гемостаза. В перечень скрининговых тестов плазменного гемостаза традиционно включают:

- Протромбиновое время (ПВ);
- Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ);
- фибриноген.

Скрининговые тесты оценивают состояние внешнего и внутреннего каскадов активации протромбиназы, позволяют выявлять нарушения со стороны факторов-субстратов, кофакторов, ингибиторов каскада свертывания, а также действие некоторых лекарственных препаратов или аутоантител. Основным тестом на состояние внешнего каскада свертывания плазмы является ПВ, внутреннего каскада — АЧТВ. Изменения фибриногена, качественные и количественные, могут нивелировать изменения предшествующих этапов плазменного гемостаза.

**ПВ** — время образования фибринового сгустка в бедной тромбоцитами цитратной плазме (или в цельной капиллярной крови) при активации внешнего пути гемостаза тромбопластином — тканевым экстрактом, содержащим тканевой фактор и фосфолипиды, в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при температуре 37 °C. Показатель ПВ в плазме при измерении в одних и тех же условиях достаточно стабилен и имеет коэффициент внутрииндивидуальной вариации 4,0%, а межиндивидуальной вариации — 6,8%.

В отличие от других тестов коагулограммы ПВ остается достаточно стабильным при хранении цитратной плазмы в закрытой вакуумной пробирке при комнатной температуре до 24 ч. После центрифугирования образцы плазмы до исследования хранят при +18–25 °C; охлаждение ниже +14 °C может привести к холодной активации фактора VII и занижению ПВ. Для длительного хранения (>24 ч) требуется замораживание плазмы.

*Реактивы* для определения ПВ могут отличаться по нескольким показателям: чувствительность, реактивность к гепарину, разная активность по свертыванию контрольной плазмы подвержены межсерийным колебаниям. Свертывание в тесте ПВ не должно быть <10 с, что связано со сложностью детекции.

Для представления результатов ПВ используются несколько способов:

- 1) время свертывания в секундах;
- 2) протромбиновое отношение (в РФ используется редко) — отношение ПВ пациента к ПВ нормальной (пулированной) не менее чем от 20 доноров или представленной производителем) плазме;
- 3) протромбиновый тест по Квику, %; тест основан на построении калибровочной кривой при измерении ПВ на плазмах с заранее известной активностью факторов свертывания внешнего пути;
- 4) МНО, которое представляет собой протромбиновое отношение, возведенное в степень международного индекса чувствительности (англ. ISI — International Sensitivity Index). Международный индекс чувствительности предоставляется производителем тест-системы и должен колебаться в районе 1,0. Международный индекс чувствительности может быть рассчитан локально в результате трудоемких процедур, которые не используются в лабораториях ввиду сложности.

**ПВ** в секундах представляется в цифровой форме, однако из-за отсутствия калибровки является, по сути, качественным показателем с неопределенным масштабом. Его существенный недостаток — низкая воспроизводимость, несопоставимость результатов исследований в разных лабораториях, на разных приборах или с тест-наборами разных серий из-за нестандартизованности тромбопластинового реагента. Поэтому нельзя сравнивать результаты у одного пациента, полученные в разных лабораториях, на разных приборах или с тест-наборами разных серий. Тем не менее ПВ в секундах часто используется в качестве быстрого простого теста при наблюдении в динамике за больным в одной и той же лаборатории. ПВ входит в шкалу диагностики синдрома ДВС, разработанную Международным обществом по тромбозу и гемостазу (ISTH) в 2001 г. и являющуюся до настоящего времени основной.

В бланках ответов, как правило, указывается верхнее пограничное ПВ, установленное в КДЛ или указанное в аннотации к набору, превышение которого заставляет искать причины удлинения ПВ.

**Протромбиновый тест по Квику** состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы после добавления тромбопластина и  $\text{Ca}^{2+}$ . В тесте ПВ по Квику для перевода времени свертывания в процент активности факторов протромбинового комплекса строится калибровочный график с использованием разведений стандартной плазмы. В тесте Квика фактически определяется активность факторов протромбинового комплекса (фактор VII + фактор X + фактор V + фактор II) в процентах от референтной нормальной пулированной плазмы. В норме она составляет >70%; верхняя референтная граница по ряду технологических причин не указывается.

Недостатком этого метода калибровки ПВ является то, что разведение плазмы моделирует только снижение концентрации факторов, которое может наблюдаться, например, при нарушении синтеза белков в печени или развитии коагулопатии потребления. При дефиците витамина К или приеме его антагонистов (варфарин) концентрация факторов может быть близкой к норме, но их функциональные свойства, активность существенно изменены. Это приводит к необходимости стандартизации исследований и использованию в таких случаях МНО — показателя, который также сглаживает разницу между реагентами с различными аналитическими характеристиками.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

При очевидной простоте выполнения протромбина по Квику оценка его результатов представляет серьезную проблему. Во-первых, в тесте активируется ряд последовательных и взаимовлияющих реакций; суммарная скорость зависит от многих параметров. Во-вторых, время свертывания нормальной и, что исключительно важно, патологической плазмы значительно варьирует в зависимости от источника и метода получения тромбопластина.

**МНО** реализует единство измерений для протромбинового теста за счет первичного стандартного образца тромбопластина, до которого прослеживаются измерения ПВ. На основе отнесения к первичному стандартному образцу ICSH разработал стандартизованный протромбиновый тест. В его основе лежит наличие линейной зависимости между логарифмами ПВ и разными концентрациями разведенного тромбопластина. На практике это означает, что значения протромбинового отношения (отношение ПВ пациента к среднему нормальному ПВ, полученному с использованием пулированной или лиофилизированной плазмы) могут быть приведены возведением в степень (представляющую собой Международный индекс чувствительности используемого тромбопластина) к величине, которая была бы получена при определении активности факторов протромбинового комплекса с первичным стандартным образцом тромбопластина. Эту величину было предложено называть МНО.

По рекомендации ВОЗ определение международного индекса чувствительности является обязанностью производителей тест-систем, которые должны определять чувствительность каждой серии выпускаемых ими тромбопластинов, сравнивая ее с эталоном тромбопластина, чувствительность которого принята за единицу. Для каждой серии тромбопластинового реагента международный индекс чувствительности обозначается на его упаковке и обычно составляет от 1,0 до 1,2 (предпочтительны низкие значения).

Необходимо отметить, что в течение многих лет в РФ использовался показатель «протромбиновый индекс», который представлял собой отношение ПВ контрольной плазмы человека к ПВ пациента, выраженное в процентах. Этот показатель не отражает активности факторов свертывания, является простым арифметическим соотношением двух временных величин, не учитывает характеристики тест-систем, не включен в расчет на автоматических коагулометрах, которые проводят только калибровку по Квику. Таким образом, показатель «протромбиновый индекс» — тест устаревший и не отвечающий современным требованиям лабораторной диагностики. Нередко совершается ошибка формулировки: лаборатория выполняет протромбиновый тест по Квику, но результат называет протромбиновым индексом. Такие несоответствия должны быть устранены.

*Удлинение ПВ (снижение процента протромбина по Квику, повышение МНО)* наблюдается при заболеваниях печени с нарушением синтетической функции, лечении антагонистами витамина К, дефиците витамина К (холестаз, мальабсорбция, дисбактериоз), наличии в крови ингибиторов свертывания (гепарин, ПДФ), врожденном дефиците факторов протромбинового комплекса II, V, VII, X, гипофибриногенемии (менее 1,0 г/л), дисфибриногенемии и нарушении полимеризации фибрина, при синдроме ДВС.

*Укорочение ПВ (повышение процента протромбина по Квику, снижение МНО)* не имеет клинического значения и не является основанием для диагностики гиперкоагуляции. Именно поэтому референсным значением протромбина по Квику является >70% без указания верхней границы.

**АЧТВ** (или активированное парциальное тромбопластиновое время) — скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, наличия ингибиторов свертывания, контроля гепаринотерапии, выявления дефицита факторов VIII и IX (гемофилия А и В). Слова «частичное» или «парциальное» в названии теста указывают на то, что в нем используется не экстракт тканей («полный тканевой тромбопластин»), а только активатор контактной фазы и фосфолипиды. В тесте АЧТВ под действием активаторов, например каолина или эллаговой кислоты, активируется контактный фактор XII и далее — внутренний путь плазменного гемостаза, а фосфолипиды служат поверхностью для сборки ферментных комплексов.

Компоненты контактной активации — фактор XII, высокомолекулярный кининоген, прекалликреин, а также фактор XI — не требуют  $\text{Ca}^{+2}$  для активации. Чтобы уменьшить вариабельность  $\text{Ca}$ -независимого начального этапа внутреннего каскада активации протромбиназы, сначала инкубируют плазму с каолином и кефалином (достигается максимальная активация фактора XIa), а затем тест стартует добавлением  $\text{CaCl}_2$  и фиксируется время свертывания плазмы. При выполнении теста АЧТВ определяется время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы при физиологической температуре (37 °C), в условиях стандартной активации контактной фазы. Благодаря отсутствию тромбоцитов в плазме и добавлению их заменителя — фосфолипидов — на результаты теста АЧТВ практически не влияют тромбоцитарные факторы.

Преаналитический этап имеет большое значение для получения корректных результатов теста: учет принимаемых пациентом лекарственных препаратов, правильность взятия крови, использованный антикоагулянт, его соотношение с кровью, условия и сроки хранения и транспортировки пробы. Результаты теста сильно зависят от правильного отношения кровь/антикоагулянт (9:1), поэтому требуется обязательный входной контроль полноты заполнения кровью вакуумных пробирок с натрия цитратом при их поступлении в лабораторию. При недозаполнении пробирки более чем на 10% пробу не принимают, поскольку значения АЧТВ и других тестов будут искажены. Охлаждение пробы ведет к активации контактной фазы *in vitro*. Биологический материал для исследования АЧТВ стабилен до 4 ч при комнатной температуре; при лечении гепарином исследование необходимо провести в течение 1 ч после взятия материала. Возможно хранение замороженной при -20 °C бедной тромбоцитами плазмы до 30 дней, если иное не написано в инструкции к тест-системе, но допустимо лишь однократное размораживание. Подтверждена необходимость избегать гемолиза в пробах цитратной крови, предназначенных для исследований системы гемостаза.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Системы межлабораторной стандартизации теста АЧТВ, приборной и реагентной базы до настоящего времени нет. В связи с этим для получения сопоставимых результатов целесообразно использовать в лаборатории реактивы от одного производителя. АЧТВ-реагент должен отвечать следующим требованиям: иметь одинаковые диапазоны нормальных значений для разных серий реактивов одного производителя, быть чувствительным к клинически значимому дефициту факторов свертывания крови и к эффектам НФГ. Набор реактивов для АЧТВ содержит активатор контактной фазы и фосфолипиды.  $\text{CaCl}_2$  добавляется в пробу отдельно, как стартовый реактив. Контактный активатор — это высокодисперсионная суспензия отрицательно заряженных частиц каолина (белая глина) или эллаговая кислота, полифенол или сульфатиды (отрицательно заряженные сульфатированные липиды) в смеси с каолином. Фосфолипиды используют синтетические или выделенные из тканей животных (например, мозг кролика) или из сои. В случае использования синтетических фосфолипидов их состав и концентрация стандартизованы. В результате достигается воспроизводимость результатов при использовании разных серий реагента одного производителя. Отдельные реагенты обладают лучшей чувствительностью к эффектам волчаночного антикоагулянта (ВА), что особо отмечается производителем, как «АЧТВ-реагент, чувствительный к ВА». Использование такого реагента для оценки активности факторов свертывания может приводить к их ложному занижению до критических значений.

Референсные значения АЧТВ зависят от используемых реактивов и приборов и наиболее часто составляют 25–40 с. Границы референтных значений уточняются в каждой лаборатории и могут изменяться при замене прибора и/или использовании других реагентов.

Для снижения влияния интерферирующих факторов и некоторой стандартизации результатов исследования возможна оценка результата в виде индекса АЧТВ:

Индекс АЧТВ = (АЧТВ пациента/АЧТВ контрольной нормальной плазмы).

Диапазон нормы — 0,8–1,1.

*Удлинение АЧТВ* (увеличение индекса АЧТВ) наблюдается при:

- врожденном или приобретенном дефиците факторов внутреннего пути активации — VIII, IX, XI, XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена; снижение активности факторов II, V, X может в какой-то мере удлинять АЧТВ, но в значительно большей степени это снижение сказывается на величине ПВ. Поэтому одновременное измерение АЧТВ и ПВ «охватывает» всю картину активности факторов коагуляционного каскада, а измерение фибриногена завершает картину;



- наличии ингибиторов к факторам свертывания (ингибиторная гемофилия);
- лечении гепарином (более выражено удлинение АЧТВ в присутствии в крови НФГ, прямо зависит от дозы) и прямыми ингибиторами тромбина (недозозависимое удлинение);
- наличии в крови антифосфолипидных антител (аФЛ) волчаночного типа (ВА) и высоких концентраций ПДФ;
- дефиците vWF, который часто ведет к снижению активности фактора VIII (болезнь или приобретенный синдром Виллебранда);
- нарушении белково-синтетической функции печени;
- коагулопатии потребления (синдром ДВС);
- гипофибриногенемии (концентрация фибриногена менее 1 г/л).

*Укорочение АЧТВ* напрямую не говорит об ускорении свертывания, поскольку часто бывает связано с нарушением преаналитических технологий (травматичное взятие крови, недостаточное перемешивание, длительное хранение), поэтому большого клинического значения не имеет. Тем не менее оно может быть поводом для дальнейшего определения маркеров активации гемостаза и тромбообразования и дополнительных исследований (D-димер, фибрин-мономер, тест тромбодинамики, тромбоэластография/тромбоэластометрия (ТЭГ/ТЭМ). Поскольку удлинение АЧТВ и ПВ может быть связано как с дефицитом факторов, так и с присутствием ингибиторов, для дифференциальной диагностики выполняется тест смешивания (или микс-тест), описанный ниже.

**Фибриноген.** Определение количества функционального фибриногена по Клаусу считается наиболее точным тестом, он основан на определении времени свертывания при добавлении избытка тромбина. В этих условиях критическим для свертывания становится концентрация фибриногена. Калибровочная кривая строится на зависимости времени образования сгустка под действием тромбина от концентрации фибриногена, определенной биохимическим методом. Если время свертывания очень короткое (<5 с), то тест проводится на разведенной плазме. Из-за очень высокой активности тромбина присутствующие в плазме АТ или гепарин на результаты определения фибриногена практически не влияют.

ПДФ влияют на процесс полимеризации фибрин-мономеров, поэтому могут при определении фибриногена по Клаусу быть причиной ложнонизких результатов.

В одной из модификаций метода Клауса используется химическая добавка к тромбину, снижающая скорость образования сгустка и «растягивающая» время его выпадения до 100 с при разной концентрации фибриногена. Использование модифицированного метода позволяет обойтись без дополнительных разведений образцов плазмы и препарата тромбина, что снижает вероятность ошибок и делает определение более удобным. Валидация данной модификации в сравнении со стандартным методом Клауса не проведена.

Турбидиметрический метод определения фибриногена по изменению мутности плазмы с использованием препаратов змеиного яда (батроксобины) используется для определения фибриногена на автоматических коагулометрах и биохимических анализаторах. Результаты в меньшей степени подвержены влиянию ПДФ и дисфибриногенемии.

*Референсный диапазон* плазменной концентрации фибриногена в разных источниках и разными производителями представляется разными значениями. Чаще используется интервал 2–4 г/л (иногда — 1,8–3,5 г/л). Результат не зависит от возраста и пола. В печени синтезируется 2–5 г фибриногена в сутки, время полувыведения его из крови составляет около 4 дней.

*Увеличение концентрации фибриногена.*

- Острый или хронический воспалительный процесс. *Фибриноген — острофазный белок.* Его концентрация в плазме крови может возрастать до 10 г/л и более при бактериальных инфекциях и тяжелых травмах, при этом повышение уровня фибриногена в острой фазе воспаления имеет транзиторный характер.
- Заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, ГУС).
- Системные заболевания соединительной ткани (РА, узелковый периартериит).
- ПНГ.
- Новообразования.
- Беременность.
- Атеросклероз как проявление хронического воспаления. Риск ССЗ и их осложнений увеличивается по мере повышения уровня фибриногена; корреляция между уровнем фибриногена и развитием ИМ и инсульта особенно четко прослеживается у пациентов молодого и среднего возраста. У курящих людей концентрация фибриногена несколько выше, чем у некурящих, что также связано с воспалительными изменениями в легких и стенке сосудов.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

*Снижение концентрации фибриногена.*

- Врожденный или приобретенный (печеночная недостаточность) дефицит фибриногена.
- Потребление при синдроме ДВС, массивных тромбозах (в этом случае может иметь место как снижение, так и повышение фибриногена).
- Прием лекарственных препаратов — *вальпроат натрия, фибраты, фенобарбитал, стрептокиназа, урокиназа, аспаргиназа.*
- Значительная физическая перегрузка также ведет к снижению уровня фибриногена.

В течение многих лет к скрининговым тестам было принято относить **ТВ**. В настоящее время в большинстве случаев это признано нецелесообразным по следующим причинам: тест не стандартизован; отклонения в результатах измерения ТВ (удлинение) при оказании первичной медицинской помощи в амбулаторном звене, на которое

и нацелены скрининговые тесты, практически не встречается; количество клинических ситуаций, для которых характерно удлинение ТВ, ограничено и сводится к присутствию гепарина в плазме крови, наличию ПДФ и приему дабигатрана этексилата, а также возможно при дисфибриногенемии и при снижении фибриногена  $< 0,5$  г/л. Для оценки эффекта гепарина используется тест АЧТВ, присутствие ПДФ измеряется специальным тестом или исследованием D-димера, а дабигатрана этексилат не требует постоянного лабораторного контроля, и ТВ рассматривается в этом контексте только с точки зрения объяснения причины значительного удлинения в случае, если его все-таки измерили. В связи с вышеизложенным нецелесообразно включение ТВ в скрининговую коагулограмму, но это не исключает его использования в КДЛ как теста дополнительной информации, поскольку он показывает нарушения на этапе превращения фибриногена в фибрин и зависит в основном от концентрации и свойств фибриногена, а также от наличия антикоагулянтов — ингибиторов фибринообразования (гепарина, АТ, патологических белков), а также дабигатрана этексилата. Антивитамин К-препараты (варфарин) не влияют на результаты теста.

*Нормальное значение* ТВ зависит от активности тромбина; чаще составляет 12–17 с. Тест не стандартизован, при определении ТВ могут использоваться растворы тромбина разной активности, которые нестабильны, активность постепенно снижается после приготовления. Пределы нормальных значений ТВ рекомендуется устанавливать в каждой лаборатории самостоятельно. Тест может выполняться в модификациях, в частности после нейтрализации гепарина протамина сульфатом. Тест практически непригоден для мониторинга лечения гепарином или гирудином, так как результаты зависят от состояния системы «фибриноген/фибрин», кроме того, ТВ характеризуется очень малым временным интервалом.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.2.5. Дополнительные тесты, характеризующие плазменный гемостаз

**Определение отдельных факторов плазменного гемостаза.** Принцип методов определения активности отдельных факторов свертывания крови, основанный на клоттинговой технологии, состоит в использовании готовых плазм, лишенных того или иного фактора (дефицитные плазмы), а сами методы получили название заменных проб.

Выполнение заменной пробы проводится на основе базовых тестов — ПВ и АЧТВ — и состоит в том, что к плазме больного с подозрением на дефицит фактора добавляется плазма, лишенная этого фактора, в соотношении 1:1 и на полученной смеси вновь выполняется тест, который (АЧТВ или ПВ) зависит от дефицита именно этого фактора. Если время свертывания (например, в тесте АЧТВ) после добавления заменной плазмы не восстанавливается, то в плазме больного и в фактор-дефицитной плазме отсутствует один и тот же фактор. Если же время свертывания при проведении повторного тестирования восстановилось, значит, с заменной плазмой был внесен недостающий фактор и подбор фактор-дефицитных плазм следует продолжать. Например, при гемофилии А (дефицит фактора VIII) АЧТВ с плазмой пациента будет удлинено. При добавлении к такой плазме плазмы, дефицитной по другому фактору (например, по фактору IX), время свертывания в тесте АЧТВ восстановится до нормальных значений, поскольку с добавленной плазмой был внесен фактор VIII, отсутствовавший в плазме больного гемофилией А. Если же к плазме больного добавить плазму, дефицитную по фактору VIII, то время коагуляции в тесте АЧТВ останется увеличенным. Это доказывает, что как в плазме больного, так и в дефицитной только по фактору VIII отсутствует один и тот же компонент (в данном случае фактор VIII).

При удлинении ПВ заменную пробу для выявления дефицита фактора VII проводят клоттинговым методом с плазмой, лишенной фактора VII. Метод аналогичен определению активности факторов в тесте АЧТВ.

**Определение факторов с использованием хромогенных субстратов.** Принцип основан на использовании короткоцепочечных пептидов (из 6–10 аминокислот), к которым через эфирную связь «пришит» хромоген. Для каждого из протеолитических ферментов системы свертывания известна последовательность из аминокислот, которая создается в короткоцепочечных пептидах. При расщеплении пептидов освобождается «пришитый» к ним хромоген, меняется оптическая плотность раствора. Скорость освобождения хромогена определяется по увеличению абсорбции раствора, которая пропорциональна активности протеазы. Принципы методик одинаковы с тестами клинической химии (кинетическое определение активности ферментов), поэтому методы могут выполняться на биохимических анализаторах.

При исследовании отдельных факторов, обладающих ферментной активностью, или ингибиторов, которые не определяются в простых коагуляционных тестах, могут применяться синтетические не только хромогенные, но и флюорогенные субстраты. Флюорогенные субстраты обладают большей аналитической чувствительностью и характеризуют изменения компонентов гемостаза в большем диапазоне концентраций, чем хромогенные субстраты. Они могут использоваться для определения компонентов гемостаза, присутствующих в плазме в следовых концентрациях или обладающих относительно низкой активностью.

Использование хромогенных и флюорогенных субстратов позволяет оценить протеолитическую активность отдельных факторов плазменного гемостаза, поскольку почти для каждого фактора-фермента можно подобрать свой специфический субстрат.

**Принцип определения дефицита факторов или действия ингибиторов.** Удлинение АЧТВ и/или ПВ может быть вызвано дефицитом факторов свертывания или присутствием ингибиторов, в частности волчаночного типа. Для дифференцирования дефицита факторов свертывания от присутствия специфического ингибитора или ВА необходимо провести исследование коррекции активности факторов или скрининговых тестов при смешивании тестируемой плазмы с нормальной плазмой, в том числе с разведением. Если при добавлении к плазме больного с удлинением АЧТВ плазмы, содержащей все факторы, АЧТВ восстанавливается, то в плазме больного был дефицит фактора. Если АЧТВ не восстанавливается в полной мере, то в плазме присутствует ингибитор, в частности, им может быть ВА, который блокирует фосфолипидную матрицу.

Соотношения компонентов могут быть разными. Чаще применяется смешивание 1:1 (1 часть исследуемой плазмы на 1 часть нормальной плазмы), это соотношение удобно для подсчета и обладает неплохой чувствительностью. При низкой активности ингибитора можно использовать соотношение «2 части исследуемой плазмы на 1 часть нормальной». При высокой активности можно использовать соотношение 1:4 и более и по степени коррекции косвенно судить об активности ингибитора.

После смешивания необходимо проводить тесты немедленно и через 1 ч инкубации, что позволяет судить о характере ингибитора (табл. 8.5).

**Таблица 8.5.** Дифференциальная диагностика врожденного дефицита факторов внутреннего пути (фактор VIII или фактор IX), специфического ингибитора (чаще к фактору VIII) и волчаночного антикоагулянта

Тесты	Врожденный дефицит факторов внутреннего пути	Специфический ингибитор факторов внутреннего пути	ВА
Тест смешивания. Исследование сразу после смешивания	Коррекция	Обычно коррекция	Нет коррекции
Тест смешивания. Исследование после часовой инкубации	Коррекция	Вновь становится удлинненным	Нет коррекции

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Дополнительно для дифференциальной диагностики между дефицитом и наличием ингибитора можно провести пробу с разведением по крайней мере до трех разных концентраций. При наличии дефицита повторное измерение показывает одинаковый расчетный процент фактора в цельной плазме. В присутствии ингибитора при разведении можно наблюдать относительное увеличение фактора, что связано с диссоциацией комплекса «фактор–ингибитор» и освобождением фактора из заблокированного состояния.

**Протеин С** определяется несколькими методами: клоттинговым, методом с хромогенным субстратом, иммунохимическим методом. В процессе измерений используется активатор протеина С из яда змеи щитомордника, который переводит протеин С в активную форму. Определение протеина С рекомендуется проводить:

- при комплексном обследовании для выявления причин тромбозов (с одновременным определением АТ, протеина S и др.) — по показаниям группе лиц, подозрительных на наследственную тромбофилию;
- при *purpura fulminalis* у новорожденных;
- при патологии беременности: преэклампсии, эклампсии, внутриутробной задержке развития плода, спонтанных абортах, повторных выкидышах.

Активность протеина С у взрослых составляет 70–140% уровня референтной нормальной плазмы.

Снижение активности протеина С наблюдается при:

- врожденном (наследственном) дефиците или аномалиях протеина С с повышенным риском венозных тромбозов;
- геморрагической болезни новорожденных;
- заболеваниях печени с нарушением функции;
- синдроме ДВС (потребление);
- лечении пероральными антагонистами витамина К.

Повышение активности протеина С не имеет клинического значения.

**Резистентность к активированному протеину С (РаПС).** Резистентность (устойчивость) фактора Va к ингибирующему воздействию аПС — один из серьезных факторов риска патологических тромбозов. Если в норме при добавлении аПС к плазме происходит удлинение АЧТВ, при РаПС добавление аПС может не сопровождаться удлинением либо АЧТВ удлинится существенно меньше.

РаПС может быть как врожденной, так и приобретенной патологией. Мутация гена фактора V (фактор V Лейден) оценивается как наиболее распространенная причина РаПС (по данным некоторых исследователей, в 95% случаев РаПС обусловлена лейденской мутацией). Исследование РаПС может быть приоритетным перед генетическим тестированием, но исторически сложилась ситуация, при которой выполнение генетического анализа и поиск мутации фактора V Лейден в РФ является более доступным и дешевым методом, в то время как в западных странах поиск наследственной тромбофилии начинается именно с РаПС.

Приобретенная патология связана с наличием воспалительного процесса, повышением содержания фактора VIII (белок острой фазы), аФЛ, беременностью.

РаПС была обнаружена среди 20% больных с первичным тромбозом глубоких вен бедра и среди 40% больных тромбофилией. По разным данным, от 20 до 60% больных с тромбозом глубоких вен бедра имеют РаПС.

**Скрининговые тесты на аПС** разработаны на основе модифицированного теста АЧТВ, который проводится с аПС и без него, или на основе ПВ со змеиным ядом. Добавление аПС в норме вызывает удлинение АЧТВ за счет инактивации факторов Va и VIIIa в плазме. Поэтому в тесте сравнивается время выпадения сгустка в тесте АЧТВ с добавлением и без добавления аПС и рассчитывается отношение. Референтные значения теста зависят от используемых реактивов и приборов. Тем не менее, несмотря на разные методы и приборную базу, обычно добавление аПС к плазме приводит по крайней мере к двукратному удлинению АЧТВ. Недостаточное удлинение АЧТВ (патологический результат) свидетельствует о РаПС.

**Определение протеина S.** Протеин S — витамин К-зависимый белок, служит кофактором протеина С. В норме 60–70% протеина S представлено свободной формой, 30–40% — формой, связанной с транспортным белком C4b-BP.

Именно свободная форма представляет интерес для исследования. Референтные значения определяются производителем реагентов, составляют в среднем 60–130%, у мужчин несколько выше. Снижение активности протеина S в плазме относится к тромбофилическим состояниям. В зависимости от содержания в крови общего количества протеина S и его свободной формы различают три типа наследственного дефицита:

- I тип — количественная недостаточность — снижен уровень общей и свободной форм протеина S;
- II тип — качественная недостаточность — нормальный уровень общей и свободной форм при снижении функциональной способности;
- III тип — снижение свободной формы при нормальном количестве общей.

I и III типы являются наиболее распространенными и могут быть диагностированы при исследовании уровня свободного протеина S.

Приобретенные формы дефицита протеина S характерны для недостаточности витамина K и приема антивитаминов K-препаратов, тяжелых поражений печени, острого синдрома ДВС, приема эстрогенов (пероральных контрацептивов). Относительный дефицит протеина S наблюдается при повышении C4b-ВР. C4b-ВР — белок острой фазы, его количество повышается в плазме крови при воспалении, аутоиммунных реакциях, при беременности, у женщин, принимающих стероидные контрацептивы.

Повышение активности протеина S не имеет клинического значения.

**Определение АТ.** Основным методом исследования АТ является определение активности с хромогенными субстратами. Референтное значение — активность АТ 75–125% уровня контрольной нормальной плазмы.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

У новорожденных уровень АТ составляет около 50% и достигает уровня взрослых к 6 мес. Небольшое снижение АТ наблюдается в середине менструального цикла, в пред- и послеродовой и послеоперационный периоды. Эти сдвиги более выражены у пациентов с группой крови А (II), а также у пожилых.

*Снижение содержания и/или активности АТ* отмечается при:

- врожденном дефиците АТ — наследственной тромбофилии с высоким риском венозных тромбозов и патологии беременности;
- заболеваниях печени (опухоли, цирроз, алкогольный гепатит);
- нефротическом синдроме (протеинурия свыше 5 г/л);
- множественных травмах, синдроме ДВС, сепсисе (гиперпотребление);
- поздних гестозах, тяжелых родах;
- приеме эстрогенов (оральных контрацептивов), глюкокортикоидов, частом длительном введении гепарина.

Тест может применяться при мониторинге лечения гепарином для уточнения эффективности действия препарата. Длительная гепаринотерапия и лечение высокими дозами гепарина, особенно НФГ, может приводить к снижению активности АТ в плазме по механизму потребления.

**Тест ПДФ** является основным для оценки активности фибринолиза и выполняется иммунологическим методом с использованием поликлональных или моноклональных антител. Тесты, основанные на взаимодействии поликлональных антител с эпитопами, присутствующими на молекулах превращения и распада фибриногена, требуют предварительного полного удаления фибриногена из реакционной среды, которое проводится путем добавления к крови активного тромбина или змеиного яда с тромбиноподобным эффектом и быстрого отделения от образовавшегося сгустка.

В методе ELISA используются моноклональные антитела. Тем не менее трудно дифференцировать продукты, образующиеся при деградации фибрина, от веществ, сформировавшихся при распаде фибриногена, особенно при назначении активаторов фибринолиза в качестве лекарственных препаратов.

Основное клиническое применение теста определения ПДФ — диагностика и динамическое наблюдение при синдроме ДВС; ПДФ повышаются при фибринолитической терапии, но не являются критерием ее эффективности.

**D-димеры** — продукты деградации перекрестно-сшитого фибрина, образовавшегося на конечном этапе формирования тромба в результате протеолитического действия плазмина. Важнейшее обстоятельство: источником D-димеров является не только фибрин в составе внутрисосудистого тромбообразования, но и экстравазальные отложения фибрина, которые сопровождают воспалительные заболевания. Таким образом объясняется увеличение D-димеров в крови при хронических воспалительных заболеваниях кишечника, легких, прогрессирующем атеросклерозе. Это же обстоятельство определяет низкую специфичность исследования при тромбозах.

Определение D-димеров проводится с использованием моноклональных антител. Методом выбора является высокочувствительный метод иммунотурбидиметрии с латексным усилением на автоматическом коагулометре. Качественное определение методом агглютинации недопустимо. Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина.

Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерах, поэтому D-димеры — показатель того, что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин, а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку эти антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и в сыворотке.

Польза количественного измерения концентрации D-димеров утверждена международными клиническими рекомендациями по диагностике тромбоза глубоких вен, тромбозамблии легочной артерии (ТЭЛА) и определении длительности антикоагулянтной терапии после первого эпизода тромбоза. Высокая чувствительность при низкой специфичности определяет высокую отрицательную предсказательную ценность метода. Еще одно показание

к измерению D-димеров — наблюдение в динамике за пациентами с развивающимся синдромом ДВС или подозрением на него. В рекомендации ISTH включена группа ПДФ, а D-димер формально не прописан, однако его принадлежность к группе продуктов деградации фибрина, доступность выполнения в практических лабораториях, простота исследования позволяют широко использовать его при синдроме ДВС.

Алгоритм использования D-димеров в диагностике тромбоза глубоких вен и ТЭЛА строится на использовании этого теста только в группах низкого и умеренного риска в соответствии со шкалами Wells для соответствующих клинических состояний. В случае если D-димер при измерении в правильной группе не превышает точку отсечения, с вероятностью 99% тромбоз глубоких вен или ТЭЛА исключаются. В случае превышения выполняется визуализирующее исследование для подтверждения диагноза.

D-димеры — нестандартизованный аналит, имеют разную величину молекул и не обладают четко определенной структурой, поэтому антитела в тест-системах разных производителей также могут различаться по специфичности. Результаты определения могут выражаться как в единицах D-димера (D-Dimers Unit — DDU), так и в фибриноген-эквивалентных единицах (Fibrinogen Equivalent Unit — FEU), у которых уровень условной верхней границы (cut-off) различается в 2 раза (0,25 и 0,5 мкг/мл соответственно). У лиц старше 50 лет концентрация D-димеров нарастает; условная верхняя граница референтного интервала может быть определена по формуле Douma: концентрация D-димера в FEU (мкг/мл) = (возраст в годах) × 0,01.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

D-димеры неспецифически повышаются при следующих состояниях:

- онкологические заболевания;
- острые инфекции;
- острые и хронические воспалительные процессы;
- беременность по мере прогрессирования;
- послеоперационный и послеродовой период;
- травма;
- распространенные гематомы;
- прогрессирующий атеросклероз, атеротромбоз.

В некоторых случаях повышение D-димеров не объясняется никакой причиной. Тогда необходимы более тщательный онкопоиск и выявление сопутствующих заболеваний.

Повышение D-димеров по мере прогрессирования беременности определяет трудности интерпретации результатов, которые могут демонстрировать значительное нарастание. Учитывая неспецифичность данных изменений, назначать исследование D-димера в период беременности нецелесообразно, что отражено в клинических рекомендациях по нормальной беременности. По тем же причинам нельзя использовать D-димер для диагностики тромбозов глубоких вен и ТЭЛА при беременности.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.3. Глобальные тесты контроля гемостаза

Глобальные тесты представляют собой интегральный подход к оценке свертывающей системы. Не анализируя отдельные факторы гемостатических реакций, они характеризуют конечный этап всего каскада — процесс превращения фибриногена в фибрин и образование фибринового сгустка. В настоящее время наиболее широко используются три теста: тест генерации тромбина (ТГТ), ТЭГ (ТЭМ) и тромбодинамика. Каждый из этих тестов обладает особенностями регистрации разных состояний свертывающей системы крови, преимуществами и недостатками.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.3.1. Тест генерации тромбина

ТГТ — интегральный метод, который дает информацию о динамике образования и ингибирования тромбина после активации коагуляции в образце крови. Для проведения ТГТ используют флуориметры. Методика определения ТГТ основана на том, что тромбин, образующийся в ходе реакции тромбообразования, разрушает пептидную связь флюорогенного субстрата. В качестве активатора выступает рекомбинантный тканевой фактор, релипидизированный смесью отрицательно заряженных фосфолипидов (фосфатидилсерин : фосфатидилэтаноламин : фосфатидилхолин — 20:20:60). После инкубации смеси при температуре 37 °С для запуска свертывания в лунки флуориметра вносится буфер, содержащий  $\text{Ca}^{+2}$  и флюорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате высвобождается молекула флюорофора, излучение которого автоматически регистрируется флуориметром. Интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации тромбина, образовавшегося в данный момент времени. На основании измерений флюоресценции посредством программного обеспечения строится кривая генерации тромбина (**рис. 8.2**). Оценивают время задержки реакции, площадь под кривой образования тромбина (восходящую часть), достигаемый максимум и нисходящую часть, которая характеризует инактивацию тромбина и соответствующие временные показатели.



**Рис. 8.2.** Тест генерации тромбина. Определяют время инициации свертывания, мин; пиковую концентрацию тромбина, нмоль/л; время достижения пиковой концентрации тромбина, мин; эндогенный тромбиновый потенциал — площадь под кривой генерации тромбина

С помощью ТГТ можно определить состояние гипо- и гиперкоагуляции, оценить действие лекарственных препаратов, выявить нарушения в системе естественных антикоагулянтов.

Важность применения ТГТ состоит в том, что показатели клоттинговых тестов часто остаются неизменными, плохо оценивают гиперкоагуляцию даже при возникновении тромбоза. При определении отдельных маркеров коагуляции могут выявляться отклонения от референтного интервала, однако это не позволяет судить о наличии гиперкоагуляции в целом, так как изменения отдельных компонентов свертывающей системы могут быть нивелированы в организме включением компенсаторных механизмов.

Обратная ситуация может наблюдаться в случае, когда изменение отдельных показателей коагулограммы не сопровождается изменением ТГТ. Так, у пациента могут быть повышены фактор VIII, vWF и D-димеры; при этом увеличение активности отдельных прокоагулянтных факторов может быть минимизировано повышением активности антикоагулянтных факторов, показатели ТГТ будут в таком случае в норме. При мониторинге антикоагулянтной терапии у больных, получающих варфарин, при одинаковых (даже целевых) значениях МНО показатели ТГТ могут значительно отличаться, а клинические признаки недостаточной эффективности или безопасности присутствовать (тромбозы и кровотечения).

ТГТ является универсальным методом оценки тромбогенного потенциала гемостаза и может быть использован в качестве дополнительного теста для оценки пациентов с тромбофилией (врожденной и приобретенной), гемофилией; мониторинга терапии гемофилии при наличии ингибитора фактора VIII; оценки антикоагулянтной терапии, направленной на ингибирование тромбина и фактора Ха в клинически неясных случаях.

Неоценимую помощь оказывает ТГТ в научных исследованиях.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.3.2. Тромбоэластометрия/тромбоэластография

ТЭМ/ТЭГ — метод глобальной оценки гемостаза, который качественно и полуколичественно позволяет охарактеризовать процесс образования сгустка, его механические характеристики, плотность, стабильность и процесс фибринолиза.

Принцип ТЭМ/ТЭГ: исследуемый образец помещается между двумя поверхностями, на одну из которых подаются вращательно-колебательные движения, а другая соединена с устройством, принимающим и фиксирующим колебания. После добавления в образец активатора свертывания крови начинается образование сгустка. По мере полимеризации фибрина колебания с одной поверхности начинают передаваться на другую и регистрироваться. Получаемая кривая зависимости амплитуды колебаний от времени характеризует процесс свертывания крови, а позже — фибринолиза. ТЭМ можно использовать для исследования цельной крови, цельной крови с антикоагулянтами, богатой и бедной тромбоцитами плазмы с цитратом в качестве антикоагулянта.

Количество расчетных параметров по кривой ТЭМ/ТЭГ велико. Наиболее важной информацией, которую можно извлечь из ТЭМ/ТЭГ, является:

- время до начала образования фибрина;
- время формирования сгустка;
- максимальная амплитуда (зависит от концентрации фибриногена, количества и качества тромбоцитов, взаимодействия фибрина и тромбоцитов в сгустке);
- время лизиса сгустка.

Метод позволяет исследовать как спонтанную коагуляцию, так и индуцированную активаторами. Применение разных активаторов и реактивов позволяет достичь разнообразных диагностических целей. Метод можно использовать для оценки действия гепарина, фибринолитиков или их ингибиторов. Наряду с изменениями, вызываемыми лекарственными препаратами, ТЭМ/ТЭГ позволяет идентифицировать тромбоцитопатии, гиперкоагуляцию и другие нарушения.

Разработаны достаточно компактные тромбоэластометры, которые можно использовать в качестве приборов по месту лечения и оценивать процесс гемостаза немедленно после взятия крови, что существенно уменьшает влияние преаналитических факторов, с привлечением медицинского персонала клинических отделений. Оценка функционального состояния всего гемостаза занимает от 10–15 до 30 мин.

Наиболее изученная и важная область применения ТЭМ/ТЭГ — острые коагулопатии, массивные кровотечения, акушерские осложнения, обеспечение пересадки печени. Приборами ТЭМ/ТЭГ должны быть обеспечены реанимационные отделения, родильные дома, перинатальные центры. Применение в плановом порядке нецелесообразно. Ограничением в отношении широкого внедрения в практику является высокая стоимость прибора и картриджей для исследования.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

8.3.3. Тромбодинамика

Тест тромбодинамики — глобальный тест свертывающей системы крови. С высокой чувствительностью он позволяет выявлять как гипо-, так и гиперкоагуляцию, подходит для ранней диагностики склонности к тромбообразованию. Это исследование *in vitro* пространственно-временной динамики свертывания крови, инициированной локализованным активатором свертывания в условиях, близких к условиям свертывания крови *in vivo*. Тест учитывает пространственную неоднородность процессов, происходящих при свертывании крови. Образцы плазмы крови помещаются в каналы прозрачной измерительной кюветы, которая находится в водяном термостате. Затем в каналы кюветы вводится специальная вставка (активатор), на торце которой нанесено нанопокрывтие с активатором свертывания — тканевым фактором. Таким образом, активатор моделирует поврежденную стенку сосуда. Как только плазма крови соприкасается с активатором, начинается процесс свертывания: от локализованного на торце вставки тканевого фактора в объем плазмы начинает расти фибриновый сгусток, как на поврежденной стенке сосуда *in vivo*. Процесс возникновения и роста фибринового сгустка регистрируется цифровой видеокамерой в рассеянном свете. Полученная серия кадров дает детальную информацию о динамике свертывания крови во времени и пространстве. На основе этих данных рассчитываются численные параметры пространственно-временной динамики роста фибринового сгустка: время задержки роста сгустка, скорость роста сгустка, наличие спонтанного тромбообразования. Достоинства метода:

- метод диагностики гемостаза, который учитывает пространственно-неоднородные процессы, происходящие при свертывании крови;
- тромбодинамика позволяет выявить склонность к гиперкоагуляционным состояниям на ранней стадии, когда другие методы еще недостаточно чувствительны.

Несмотря на привлекательность технологии и принципа метода, использование теста тромбодинамики до настоящего времени не структурировано, не включено в клинические рекомендации и не может рассматриваться как самостоятельный тест для оценки свертывания крови. Тест требует опытного сотрудника лаборатории для его исполнения и строгого соблюдения правил преаналитического этапа и СОП.

Глава 8. Лабораторная гемостазиология

8.4. Лабораторный контроль антитромботических препаратов

К антитромботическим препаратам относят антиагреганты, влияющие на функцию тромбоцитов, и антикоагулянты, влияющие на плазменный гемостаз. Прием антитромботических препаратов изменяет результаты лабораторных тестов, оценивающих гемостатическую функцию. Это влияние может зависеть от дозы препарата и коррелировать с клинической эффективностью и безопасностью, но может не являться дозозависимым. В связи с этим некоторые антитромботические средства (в основном антикоагулянты) нуждаются в строгом лабораторном контроле, который, по сути, представляет собой терапевтический лекарственный мониторинг, некоторые препараты не нуждаются в лабораторном контроле для индивидуального подбора дозы. В некоторых случаях исследование может выполняться не с целью дозирования, а для дополнительной оценки действия ЛС. Влияние антитромботических препаратов также должно учитываться при выполнении исследований гемостаза с диагностической целью. Препараты антитромботической группы назначаются в соответствии с клиническими показаниями и факторами риска тромбозов и кровотечений, на основании клинических рекомендаций и в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи. Часть препаратов дозируется строго по результатам лабораторных исследований; другие нуждаются лишь в периодической оценке в зависимости от функционирования метаболизирующих и выводящих органов. Основные лабораторные исследования в группах препаратов, которые опираются на лабораторный эффект их присутствия, представлены в табл. 8.6.

Таблица 8.6. Лабораторные исследования в оценке действия и контроле антитромботической терапии

Группы препаратов	Лабораторные тесты	
	Обязательные	Могут быть полезны
Ацетилсалициловая кислота	Нет	Функциональная (индуцированная) активность тромбоцитов, фармакогенетический анализ
Блокаторы рецепторов тромбоцитов к АДФ		
Блокаторы рецепторов тромбоцитов к фибриногену (рецепторов GPIIb/IIIa)	Нет	Нет

НФГ	Время активированного свертывания при тотальной гепаринизации (экстракорпоральные методы), АЧТВ при использовании лечебных доз, количество тромбоцитов до начала терапии и регулярно с 5-го по 14-й день терапии	АТ, оценка функции почек, анти-Ха-активность может быть измерена, но на практике применяется редко
НМГ	Количество тромбоцитов до начала терапии и регулярно с 5-го по 14-й день терапии	АТ, анти-Ха-активность при использовании терапевтических доз в отдельных группах, оценка функции почек
Блокатор фактора Ха <i>фондапаринукс натрия</i>	Нет	АТ
Антивитамины К-препараты	МНО в течение всего времени терапии, АЧТВ однократно в начале лечения	Оценка функции печени, фармакогенетический анализ
Прямые ингибиторы факторов свертывания — дабигатран этексилат, ривароксабан, апиксабан	Оценка функции почек перед началом терапии и далее не реже 1 раза в год. В группах риска или при изменении клинической ситуации — 1 раз в 3–6 мес	Скрининговые тесты коагулограммы в определенных клинических ситуациях

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.4.1. Лабораторный контроль гепаринотерапии

Гепарин — глюкозаминогликан, который получают экстракцией в основном из тканей легких крупного рогатого скота, свиньи или из слизистой оболочки кишечника быков. Слабоочищенная фракция — *НФГ* — имеет молекулярную массу от 5000 до 30 000 Да, в основном ингибирует тромбин, в меньшей степени — фактор Ха и другие факторы внутреннего пути. Несмотря на принятое ранее отнесение гепарина к группе прямых антикоагулянтов, действие его осуществляется только через АТ с многократным усилением активности этого естественного антикоагулянта. Гепарин вызывает конформационные изменения в молекуле АТ, потенцирует его эффекты, что приводит к ускорению процесса примерно в 1000–10 000 раз. Врожденный или приобретенный дефицит АТ негативно сказывается на работе гепарина и может сводить его эффективность к минимуму.

НФГ является источником НМГ, который получают из НФГ энзиматической и химической деградацией.

**Контроль терапии НФГ** в первую очередь проводится по АЧТВ — это основной тест в контроле за дозированием и оценке соотношения эффективность/безопасность использования НФГ. При назначении гепаринотерапии необходимо определить СКФ и количество тромбоцитов; далее тромбоциты исследуются каждые 3 дня с 5-го по 14-й день терапии. Периодичность, сроки и характер лабораторного контроля НФГ определяются дозами и путем введения препарата: лабораторный контроль терапевтических доз НФГ (25 000–40 000 ЕД/сут, или от 1000 ед/ч, или 400–600 ЕД/кг в день), вводимого инфузионно, основан на измерении АЧТВ не реже 2 раз в сутки, в начале терапии — чаще. Доза подбирается таким образом, чтобы АЧТВ превышало референтное значение для данной лаборатории в 1,5–2,5 раза.

Профилактические низкие дозы гепарина (менее 15 000 ЕД/сут) используются редко (заменены НМГ), существенно не влияют на тесты коагулограммы, не требуют временного лабораторного мониторинга.

**Контроль терапии НМГ.** НМГ обладает преимущественно анти-Ха-активностью и не влияет на скрининговые тесты коагулограммы. Тем не менее перед началом терапии необходимо исследовать функцию почек и выполнить скрининговую коагулограмму. Дальнейшие исследования определяются клинической необходимостью. Несмотря на то что НМГ значительно реже приводит к развитию ГИТ, количество тромбоцитов определяется каждые 3 дня с 5-го по 14-й день терапии.

Исследование анти-Ха-активности рутинно не требуется, но может быть полезно и даже включено в рекомендации для отдельных групп больных, получающих лечебные дозы НМГ (беременные, пациенты с механическими искусственными клапанами сердца, больные с экстремально низкой или высокой массой тела, больные с почечной недостаточностью). Уровень анти-Ха-активности колеблется при использовании лечебных доз НМГ до 0,8–1,2 МЕ/мл. Профилактические дозы 0,2–0,4 МЕ/мл не требуют лабораторного контроля, измеренная анти-Ха-активность может быть полезна лишь для подтверждения факта ответа пациента на введение гепарина или определения передозировки при геморрагических осложнениях.

Во всех случаях приоритетной является клиническая оценка состояния пациента, особенно с точки зрения кровоточивости.

В случае контроля эффектов НМГ взятие крови должно осуществляться через 3–4 ч после инъекции препаратов в соответствии с их фармакокинетикой. Первое измерение проводится после двух-трех инъекций, в последующем — 1 раз в неделю и даже реже, а также в случае изменения дозы.

**ГИТ** развивается преимущественно у пациентов, получающих НФГ. Тромбоцитарный фактор 4 (PF4) является гепаринсвязывающим белком. На поверхности тромбоцитов формируется мультимолекулярный комплекс между гепаринзависимыми IgG и PF4, в результате у большинства пациентов происходит активация тромбоцитов с умеренной тромбоцитопенией.

ГИТ бывают двух типов. ГИТ I типа наблюдается у 10–20% пациентов в первые 1–4 дня гепаринотерапии и характеризуется доброкачественным течением. При этом происходит незначительное снижение количества



тромбоцитов — до уровня не менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ . Уменьшение количества тромбоцитов является результатом прямого взаимодействия молекул НФГ с мембраной тромбоцита, активации и агрегации тромбоцитов. Тромбоцитопения при ГИТ I типа носит транзиторный характер, может самостоятельно исчезать и не требует специальных действий врача.

ГИТ II типа — это иммуноопосредованное осложнение терапии гепарином, которое наблюдается у 0,3–3% пациентов, получающих НФГ более 4 дней. При этом отмечается снижение числа тромбоцитов до  $30\text{--}60 \times 10^9/\text{л}$  или более чем на 50% исходного уровня (даже в пределах референтного интервала). Образующиеся в ответ на введение гепарина антитела класса IgG (значительно реже классов IgM и IgA) к комплексу «гепарин–PF4» вызывают активацию тромбоцитов, повреждение эндотелия, запускают реакции коагуляционного каскада и последующее высвобождение тромбина, что приводит к парадоксальному результату — увеличению риска венозного и артериального тромбоза, несмотря на то что терапия гепарином проводится для предотвращения тромботических осложнений. НМГ практически не вызывают подобной тромбоцитопении, вероятно, из-за меньших, чем требуется для образования иммунного комплекса, размеров молекул.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Покрытые антителами тромбоциты активно удаляются из системы циркуляции макрофагами. ГИТ-IgG способны повреждать эндотелиальные клетки. Это связано с тем, что гепарансульфат гликокаликса эндотелия как структурный аналог гепарина может вступать в качестве антигена во взаимодействие с ГИТ-IgG. Затем возможны развитие иммунных реакций на поверхности эндотелия, адгезия в этих зонах макрофагов, выделение тканевого фактора и развитие пристеночного тромба.

У отдельных пациентов имеется предрасположенность к развитию ГИТ, которая связана с мутацией в специфическом рецепторе на тромбоцитарной мембране (Fc $\alpha$ RIIA). Молекулярно-генетическая диагностика позволяет идентифицировать пациентов с повышенным риском развития ГИТ и рикошетных тромбозов.

Такие основные симптомы ГИТ, как тромбоцитопения и тромбообразование, крайне неспецифичны, что осложняет постановку диагноза, особенно для реанимационных больных, у значительной доли которых наблюдается снижение числа тромбоцитов, но оно никак не связано с ГИТ. С другой стороны, сам симптом тромбообразования ставит перед клиницистами диагностическую дилемму, называемую «парадоксом ГИТ». Появление новых тромбов заставляет клиницистов выбирать между недостаточной эффективностью терапии гепарином (в этом случае необходимо увеличение дозы гепарина) и ГИТ (требуется немедленная отмена гепарина). Своевременная диагностика и переход на альтернативные антикоагулянты негепариновой природы — ключ к предотвращению развития ГИТ II типа. Диагностика ГИТ начинается с использования правила «4Т», по результатам которого выделяются пациенты с высокой вероятностью ГИТ:

- Time — время возникновения тромбоцитопении — от 4-го до 15-го дня после начала введения гепарина;
- Thrombosis — наличие вновь возникшего тромбоза;
- Thrombocytopenia — снижение количества тромбоцитов в периферической крови на 50% и более в двух измерениях подряд;
- oTher reasons of thrombocytopenia — отсутствие других реальных причин тромбоцитопении.

При наличии хотя бы трех положительных ответов необходимо при возможности выполнить лабораторную диагностику и перевести больного на альтернативный антикоагулянт.

Для диагностики ГИТ используют две группы тестов. В основе первой группы иммунологических тестов лежит обнаружение в крови антител к комплексу «гепарин–PF4» с помощью методов твердофазного ИФА, агглютинации в геле или иммунофилтрации. Разработаны автоматизированные тест-системы на основе латекс-агглютинации с конкурентным торможением (иммунотурбидиметрия) или на основе иммунохемилюминесценции. Основным недостатком антигенных методик является низкая специфичность: отсутствие в крови пациента антител к комплексу «гепарин–PF4» позволяет исключить ГИТ II типа с высокой вероятностью, но присутствие антител к комплексу «гепарин–PF4» в крови еще не подтверждает данный диагноз.

Вторая группа включает функциональные тесты (или тесты «с отмытыми тромбоцитами»). В основе этих методов лежит выявление гепаринзависимой активации донорских тромбоцитов сывороткой пациента. Эти тесты обладают большей положительной прогностической значимостью. При ручном исполнении основными недостатками функциональных методов являются отсутствие стандартизации и длительное время исполнения (до нескольких суток), что делает их неприменимыми в рутинной клинической практике. Если у больного, получавшего гепарин, развивается тромбоцитопения, возможно проведение исследования гепарин-ассоциированной агрегации тромбоцитов и ГИТ с использованием импедансного люминесцентного агрегометра, который одновременно с агрегацией тромбоцитов в цельной крови позволяет определять высвобождение из гранул АТФ как конечную точку активации тромбоцитов, вызванной антителами.

Высокая стоимость, а также низкая частота встречаемости ГИТ II типа ограничивают доступность исследований на выявление антител к комплексу «гепарин–PF4». В клинической практике используются правило «4Т» и лабораторные методы исключения ГИТ II типа с переходом на альтернативные антикоагулянты (фондапаринукс натрия или пероральные ингибиторы факторов свертывания) без подтверждающего теста.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

#### 8.4.2. Контроль терапии антивитамином К-препаратами

С середины XX в. основными препаратами с доказанной эффективностью в профилактике эмболических инсультов и рекуррентных венозных тромбозов и эмболий были антагонисты витамина К — препараты группы монокумаринов, основным из которых является *варфарин*. Название «варфарин» стало нарицательным для группы антивитаминов К-препаратов и, несмотря на то, что в настоящее время на территории РФ зарегистрировано не менее 9 лекарственных средств под таким названием, допустимо использовать его в клинической и лабораторной практике для группы препаратов. Термин «непрямые антикоагулянты» применительно к этой группе в настоящее время не используется. В результате их действия блокируется переход неактивных витамин К-зависимых факторов в активную форму; образуются неспособные к активации факторы (PIVKA). Витамин К-зависимыми являются факторы II, VII, IX и X, а также антикоагулянты — протеины С и S. Положительные стороны и недостатки использования антивитаминов К-средств представлены в **табл. 8.7**.

**Таблица 8.7.** Преимущества и ограничения использования антивитаминов К-препаратов в лечебных целях

Преимущества	Ограничения
<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Доказанная высокая эффективность.</li> <li><input type="checkbox"/> Пероральный способ введения.</li> <li><input type="checkbox"/> Возможность длительного приема.</li> <li><input type="checkbox"/> Не вызывают аутоиммунную тромбоцитопению.</li> <li><input type="checkbox"/> Относительно низкая стоимость.</li> <li><input type="checkbox"/> Возможность приема при почечной недостаточности.</li> <li><input type="checkbox"/> Возможность наглядно оценить эффект лабораторными методами</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Сложность подбора дозы — большая вариабельность индивидуальной чувствительности к препарату и узкое терапевтическое окно.</li> <li><input type="checkbox"/> Медленное развитие эффекта в начале терапии и медленное его угасание при отмене препарата, то есть плохая «управляемость».</li> <li><input type="checkbox"/> Зависимость эффекта от диеты и приема других лекарств.</li> <li><input type="checkbox"/> Относительно высокий риск кровотечения.</li> <li><input type="checkbox"/> Необходимость постоянного лабораторного контроля</li> </ul>

**Индивидуальная чувствительность к варфарину** зависит от влияния генетически запрограммированной активности метаболизирующих варфарин печеночных ферментов семейства P-450 (CYP2C9) и белка-мишени (VKORC1). Генетическое тестирование на полиморфизм, определяющий чувствительность к варфарину, позволяет персонализировать терапию и доступно в большом количестве лабораторий. Знание генотипа по двум ключевым генам увеличивает безопасность приема препарата, уменьшает сроки подбора дозы и снижает время пребывания больного в зоне чрезмерной гипокоагуляции, имеет большое прогностическое значение. Генетическое тестирование стоит проводить до начала лечения, особенно у пациентов с заведомо длительным или пожизненным приемом антивитаминов К-препаратов [механические искусственные клапаны сердца, антифосфолипидный синдром (АФС) с венозными и артериальными тромбозами]. В дальнейшем коррекция дозы осуществляется по уровню гипокоагуляции в соответствии с лабораторными критериями, независимо от результата генетического исследования.

**Контроль с использованием МНО.** Узкое терапевтическое окно и риск передозировки с развитием кровотечений требуют постоянно контроля уровня гипокоагуляции на фоне приема варфарина. Лабораторным критерием является стандартизованное для «варфариновых» больных МНО, целевое терапевтическое значение которого определено на основании многолетнего опыта наблюдения за пациентами, получающими монокумарины при разных заболеваниях. В основном клиническая ситуация требует поддержания уровня МНО в интервале 2,0–3,0, при котором достигается хорошая эффективность при достаточной безопасности приема препарата. В некоторых случаях (искусственные клапаны сердца в митральной позиции или дополнительные факторы риска, рецидивирующие тромбозы при АФС) такой гипокоагуляции бывает недостаточно, уровень МНО рекомендуется поднимать до 2,5–3,5 (**табл. 8.8**).

**Таблица 8.8.** Показания к использованию антивитаминов К-препаратов и рекомендуемая интенсивность гипокоагуляции по уровню международного нормализованного отношения

Показания	Уровень МНО
Венозные тромбоэмболические осложнения (кроме АФС)	2,0–3,0
Фибрилляция предсердий (если используются антивитамины К-препараты)	2,0–3,0
Искусственные механические клапаны сердца; имеют значение позиция протеза (аортальная, митральная, комбинированная) и тип протеза	2,5–3,5, редко — 2,0–3,0, индивидуально значение МНО может быть повышено до 3,5–4,0 +/- ацетилсалициловая кислота
Венозные тромбоэмболические осложнения при доказанном АФС	2,5–3,5
Артериальные тромбозы при доказанном АФС	2,5–3,5, + ацетилсалициловая кислота

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

Измерение МНО может проводиться не только в стационарной лаборатории, но и на портативном коагулометре. Преимущество такой модели заключается в быстром получении информации об уровне антикоагуляции и, соответственно, быстром принятии решения по дозированию препарата с изменением дозы, при необходимости — в тот же день. Портативные коагулометры могут использоваться в модели PSM (Patient Safe Management), при которой прошедший соответствующее обучение пациент самостоятельно измеряет дома МНО и сам проводит коррекцию дозы, иногда обращаясь к медицинскому персоналу за консультацией.

На фоне лечения варфарином важно оценивать не только каждый результат измерения МНО, но и время нахождения МНО в терапевтическом диапазоне значений (Time in Therapeutic Range — TTR). Оптимальным для сохранения равновесия между риском ишемических и геморрагических осложнений является TTR более 70%.

**Варфариновые некрозы.** Рикошетные тромбозы с некрозом кожи при использовании антивитамина К-препаратов могут развиваться у больных при дефиците протеина С и приеме стартовой большой дозы препарата. В этом случае возникает состояние, при котором протеин С как витамин К-зависимый антикоагулянт очень быстро снижается (время его полужизни в системе циркуляции — 4–6 ч). В то же время витамин К-зависимые факторы свертывания, в том числе протромбин, остаются еще активными (у них период полужизни — 16–20 ч), что особенно актуально при фоновой активации системы свертывания у тяжелых больных с воспалением, сепсисом, инфекциями. Быстрое снижение уровня протеина С провоцирует в этом случае массивное тромбообразование, проявляющееся вплоть до некрозов кожи в области ягодиц, МЖ. Оценить состояние системы протеина С необходимо до терапии варфарином (анамнестическое подозрение на наследственную тромбофилию; скрининг протеина С всем пациентам, получающим варфарин, не показан). Непосредственно в период лечения антивитамина К-препаратами определение протеина С затруднено.

Дополнительных исследований, кроме контроля МНО в период приема антивитамина К-препаратов, не требуется, за исключением тех, которые необходимы для наблюдения за пациентом в соответствии с его заболеванием. Это положение в полной мере относится к измерению D-димера и применению глобальных тестов контроля гемостаза. Более того, многие параметры, оценивающие состояние гемостатической функции или используемые в диагностике, не могут быть исследованы на фоне приема антивитамина К-препаратов из-за получения недостоверных или ложноположительных результатов: это ВА, протеин С, протеин S, активность факторов свертывания II, VII, IX, X (снижены на фоне терапии варфарином).

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

### 8.4.3. Контроль терапии пероральными антикоагулянтами — прямыми ингибиторами факторов Ха и Па

Нежелательные свойства монокумаринов в значительной мере устранены в группе прямых ингибиторов факторов свертывания крови — прямых оральных антикоагулянтов. Предсказуемость эффекта, широкое терапевтическое окно и улучшенная безопасность, особенно в отношении внутричерепных кровоизлияний, выгодно отличают эти препараты. Препараты не вызывают аутоиммунную тромбоцитопению, могут применяться у больных с ГИТ.

*Ривароксабан, апиксабан* — прямые оральные антикоагулянты, прямые ингибиторы фактора Ха — продемонстрировали эффективность по принципу «не хуже» в предотвращении кардиоэмболических инсультов у пациентов с фибрилляцией предсердий, при тромбозе глубоких вен и ТЭЛА. Скрининговые тесты не отражают дозозависимое действие препаратов и не должны использоваться в их мониторинге. Для определения количества этих препаратов в плазме можно использовать тест определения анти-Ха-активности, строго контролируя тест-системы и калибраторы, которые должны соответствовать поставленной задаче, то есть нельзя использовать тест-системы и калибраторы, предназначенные для измерения анти-Ха-активности НМГ или НФГ.

*Дабигатрана этексилат* — прямой оральный антикоагулянт, прямой ингибитор тромбина, оказывает ингибирующее воздействие независимо от уровня АТ. В клинических исследованиях в дозе 150 мг × 2 раза в сутки показал превосходство над варфарином в профилактике ишемического инсульта и системных эмболий при фибрилляции предсердий, в дозе 110 мг × 2 раза в сутки — эффективность по принципу «не хуже». Инактивируя тромбин, демонстрирует целый ряд эффектов, которые характерны для чрезмерной продукции данной молекулы. Основной путь выведения — через почки, поэтому контроль СКФ особенно важен.

Скрининговые тесты коагулограммы не отражают действие дабигатрана этексилата (Дабигатрана<sup>▲</sup>), за исключением ТВ, которое существенно удлиняется (в 8–10 раз, иногда не подлежит измерению), но не является дозозависимым, не может служить инструментом оценки эффективности или подбора дозы, а лишь указывает на приверженность больного лечению и наличие препарата в крови. Количественное определение дабигатрана этексилата (Дабигатрана<sup>▲</sup>) в плазме возможно определить по тесту разбавленного ТВ — отдельное исследование со специальным реагентом. В целом пероральные препараты прямого точечного действия на факторы свертывания не нуждаются в постоянном лабораторном контроле. Перед началом терапии должны быть выполнены ОАК, анализ мочи для оценки в динамике уровня Нб и наличия гематурии. На старте терапии прямыми оральными антикоагулянтами необходима также оценка почечной функции по клиренсу креатинина (формула Кокрофт-Голт), так как именно такой подход был применен в базовых клинических исследованиях. Дальнейшее наблюдение может осуществляться в соответствии с рекомендациями нефрологов и по уровню СКФ. Периодичность измерения — от 3 мес до года в зависимости от возраста пациента и его коморбидности.

Исследование АЧТВ, протромбинового теста и ТВ [только для *дабигатрана этексилата*] может быть полезно в экстренной ситуации подозрения на кровотечение или для безопасного проведения планового хирургического вмешательства. Так же как и для варфарина, исследование ВА на фоне приема прямых оральных антикоагулянтов невозможно.

Прямые ингибиторы факторов Ха и Па не применяются у беременных, пациентов с искусственными клапанами сердца, больных с нарушениями сердечного ритма клапанной этиологии и ТЭЛА на фоне АФС. В случаях с тяжелой почечной недостаточностью (клиренс креатинина менее 15 мл/мин) у больных, нуждающихся в антикоагулянтной терапии, возможно применение только *варфарина*.

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

#### 8.4.4. Лабораторный контроль терапии антиагрегантами

Антиагрегантные препараты (антиагреганты) жизненно необходимы больным с клиническими проявлениями атеротромбоза, включая больных с ОКС, нестабильной стенокардией, цереброваскулярными сосудистыми событиями, периферическим атеросклерозом. В клинической практике используется несколько групп препаратов — ингибиторы циклооксигеназы (ацетилсалициловая кислота и препараты на ее основе), блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов и блокаторы рецепторов тромбоцитов к фибриногену. Последние имеют короткое действие, вводятся внутривенно при инвазивных сосудистых процедурах и лабораторному контролю не подлежат.

Обязательных рекомендаций для лабораторного контроля терапии антиагрегантами группы ацетилсалициловой кислоты и блокаторов АДФ-рецепторов не существует; их назначение и дозирование проводятся исходя из клинических данных. Тем не менее опыт ряда медицинских центров показывает, что исследование агрегации тромбоцитов при оценке эффективности лечения антиагрегантами может быть полезным. В соответствии с международными рекомендациями считается целесообразным исследование остаточной активности тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов у особых групп больных высокого риска (тромбоз стента в анамнезе, при подозрении на резистентность к компонентам двойной антиагрегантной терапии; при необходимости проведения аортокоронарного шунтирования; проблемы приверженности лечению), при подозрении на резистентность к препаратам, высоком риске кровотечений, в других особых случаях.

Однако, учитывая довольно высокую распространенность резистентности к препаратам (до 10–38%), особенно к *клопидогрелу*, вопрос о целесообразности контроля функции тромбоцитов при их приеме остается открытым. Истинная резистентность к ацетилсалициловой кислоте встречается нечасто и связана с тем, что циклооксигеназа присутствует на тромбоцитах в виде двух изоформ — циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2. При преобладании циклооксигеназы-2 действие ацетилсалициловой кислоты слабо выражено или отсутствует. Однако чаще клиническая резистентность объясняется низкой приверженностью пациентов лечению.

Что касается блокаторов АДФ-рецепторов, то наибольшие проблемы могут возникать при приеме *клопидогрела*, так как препарат не является активным веществом, а требует для осуществления антитромбоцитарного эффекта сложного преобразования в системе печеночных микросомальных ферментов. После абсорбции в кишечнике около 85% принятого препарата инактивируется эстеразами плазмы и выводится кишечником. Оставшаяся часть подвергается двухэтапной биотрансформации в печени с участием ферментов семейства CYP450. Образовавшийся короткоживущий метаболит действует на тромбоциты, связываясь с рецепторами. Системам транспортеров и биотрансформации присущ генетический полиморфизм с изоформами с высокой и низкой активностью. Наиболее изученным является влияние генетических вариантов CYP2C19 и CYP3A4. Генотипирование доступно в лабораториях с помощью ПЦР. Для контроля чувствительности к антиагрегантам могут быть выполнены исследования, представленные в **табл. 8.9**.

**Таблица 8.9.** Потенциальные возможности лаборатории в определении чувствительности к лечению антиагрегантами

Лекарственный препарат	Рекомендуемый вид исследования	Рекомендуемые сроки оценки действия
Ацетилсалициловая кислота-содержащие антиагреганты	Агрегатометрия: коллаген- или адреналин-индуцированная агрегация тромбоцитов	Через 1–2 нед от начала терапии
Блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов	Агрегатометрия: АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов	Через 5–7 дней от начала терапии

Кроме стандартной агрегатометрии, может быть выполнено исследование с использованием приборов по месту лечения на приборе VerifyNow® и Multiplate Analyzer® со специальными картриджами для оценки остаточной реактивности тромбоцитов. Для интерпретации результатов разработаны целевые значения остаточной реактивности тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов (**табл. 8.10**).

**Таблица 8.10.** Характеристика тестов оценки функции тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов

Метод измерения	Принцип метода, единицы измерения	«Терапевтическое окно» остаточной реактивности тромбоцитов
VerifyNow P2Y12	Измерение светопропускания при связывании тромбоцитов с микрочастицами, покрытыми фибриногеном. Результат представляется в условных единицах реактивности (PRU)	85–208 PRU
Multiplate Analyzer	Полуавтоматический импедансный агрегометр, имеющий шесть каналов для проведения основных тестов на агрегацию тромбоцитов. Результат в условных единицах (U)	18–46 U

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

#### 8.4.5. Влияние препаратов антикоагулянтного действия на показатели коагулограммы

Препараты антикоагулянтного действия влияют на показатели коагулограммы, что должно быть учтено в назначении тестов и интерпретации их результатов. Представленные в **табл. 8.11** данные помогут не только исключить ложные, наведенные лекарственным препаратом изменения, но и определить причину геморрагических осложнений, связанную с приемом антикоагулянтов.

При контроле антикоагулянтной терапии для оценки эффективности и безопасности лечения используются определенные временные интервалы взятия крови относительно времени приема препарата и специфические для данных целей тесты (**табл. 8.12**).

**Таблица 8.11.** Влияние препаратов антикоагулянтной активности на показатели коагулограммы

Тест		Препарат					
		Антивитамин К	НФГ, терапевтическая доза	НМГ	Дабигатрана этексилат	Ривароксабан	Апиксабан
Протромбиновая активность		+++	Нет влияния	Нет влияния	+/-	++	+
АЧТВ		+	++	+/-	+/-	+/-	+/-
ТВ		Нет влияния	+++	+/-	+++	Нет влияния	Нет влияния
Фибриноген по Клауссу		Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния
D-димер		Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния
Протеин С	Клоттинговый метод	+++	Нет влияния	Нет влияния	++	+	Нет данных
	Хромогенный метод	+++	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	+/-	Нет данных
Протеин S	Антиген-метод	+++	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	+/-	Нет данных
	Клоттинговый метод	+++	Нет влияния	Нет влияния	++	++	Нет данных
АТ	Хромогенный метод	Нет влияния	Нет влияния	+/-	Нет влияния	Нет влияния	+++
ВА		+++	++	+/-	++	++	++

**Таблица 8.12.** Временные интервалы и тесты для определения параметров коагулограммы у пациентов, принимающих антикоагулянтную терапию

Лекарственный препарат	Время взятия крови		Лабораторный тест
	Для контроля эффективности антикоагулянтной терапии	Для контроля безопасности антикоагулянтной терапии	
НФГ, внутривенное введение	Необходимо определить исходное АЧТВ, затем определять АЧТВ каждые 4 ч с последующим увеличением или уменьшением скорости инфузии гепарина натрия до достижения целевого уровня АЧТВ (в 1,5–2,5 раза выше нормы), в дальнейшем определять АЧТВ каждые 6 ч		АЧТВ (основной тест), анти-Ха-активность гепарина, калиброванная по НФГ (дополнительный тест)
НФГ, подкожное введение профилактической дозы	Не проводится	Не проводится	Скрининговая коагулограмма по клиническим показаниям
НМГ, подкожное введение лечебной дозы	Через 3–4 ч от введения разовой дозы препарата, по клиническим показаниям	Перед следующим введением препарата, по клиническим показаниям	Анти-Ха-активность гепарина, калиброванная по НМГ
Фондапаринукс натрия	Через 3–4 ч от введения разовой дозы препарата, по клиническим показаниям	Перед следующим введением препарата, по клиническим показаниям	Анти-Ха-активность, калиброванная по фондапаринуксу натрия
Антивитамин К-препараты	Первое измерение после двух принятых доз, утром	При подборе дозы — каждые 2–3 дня, далее 1 раз в неделю в течение месяца, в последующем не реже 1 раза в месяц	МНО (основной тест), ДНК-диагностика чувствительности к варфарину (дополнительно по показаниям)
Дабигатрана этексилат	Не проводится	Не проводится	АЧТВ, ТВ, тест с разбавленным тромбином, экариновое время; через 3–4 ч от приема дозы препарата, по клиническим показаниям
Ривароксабан/апиксабан	Не проводится	Не проводится	Анти-Ха-активность, калиброванная по ривароксабану/апиксабану; через 3–4 ч от приема дозы

			препарата, по клиническим показаниям
Антиагрегантная терапия	Не проводится	Не проводится	Агрегационная активность тромбоцитов в отдельных группах пациентов для определения эффективности/безопасности

## Глава 8. Лабораторная гемостазиология

В заключение подчеркиваем, что обследование пациентов, особенно при первичной постановке диагноза, должно проводиться в тесном контакте врача КЛД и лечащего доктора. Основу диагностики составляют клиничко-анамнестические данные. Врачу лаборатории необходимы сведения о клинической картине, семейном и индивидуальном анамнезе, принимаемых препаратах, влияющих на гемостаз, и поставленных задачах для проведения эффективного диагностического поиска.

### Рекомендуемая литература

1. Вавилова Т.В., Варданян В.В. и др. Интерпретация коагулограммы при нарушениях свертывания крови. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 176 с.
2. Долгов В.В., Вавилова Т.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М.–Тверь: Триада, 2019. 400 с.
3. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. Т. 1 / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 928 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика: учебник в 2 томах. Т. 1 / Под ред. В.В. Долгова. М.: Лабдиаг, 2017. 688 с.
5. Тактика клинической лабораторной диагностики: практическое руководство / Под ред. А.М. Иванова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 101 с.
6. Медицинская лабораторная диагностика. Программы и алгоритмы. Руководство для врачей / Под ред. А.И. Капищенко. Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023. 976 с.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Все методы молекулярной диагностики основаны на «правилах Чаргаффа», которые описывают соотношения между пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями в составе нуклеотидов, формирующих цепь ДНК: 1)  $A=T$  и  $G=C$ , то есть количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а количество гуанина (Г) равно количеству цитозина (Ц); 2) количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых —  $A+G = T+C$ . В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали структуру ДНК и определили принцип комплементарности — при взаимодействии двух цепей нуклеиновых кислот азотистые основания формируют парные (комплементарные) комплексы «аденин–тимин» и «гуанин–цитозин», которые удерживаются водородными связями, обеспечивая двучепочную спиральную структуру молекулы ДНК. При делении клетки каждая цепь ДНК служит матрицей для синтеза новой цепи, при этом последовательность нуклеотидов во вновь синтезируемой ДНК задается последовательностью комплементарных оснований в ДНК-матрице.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.1. Полимеразная цепная реакция

Ключевым событием для развития молекулярной диагностики стала разработка в 1983–1984 гг. К. Мюллисом принципа проведения ПЦР с использованием алгоритма циклических изменений температуры и устойчивой к высоким температурам Таq-ДНК-полимеразы, выделенной из экстремально термофильной бактерии *Thermus aquaticus*.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.1.1. Характеристика полимеразной цепной реакции

ПЦР — метод амплификации *in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной нуклеотидной последовательностью. Для получения новых копий целевого фрагмента ДНК в реакционной смеси ПЦР обязательно наличие коротких искусственно синтезированных олигонуклеотидов — праймеров (фрагментов ДНК), комплементарных границам целевого фрагмента.

Помимо двух праймеров, которые фланкируют целевой фрагмент исследуемой ДНК с двух сторон, для амплификации необходимо наличие ДНК-полимеразы — фермента, обеспечивающего достраивание 3'-конца новой цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Для рутинных молекулярно-генетических исследований методом ПЦР используется Таq-полимераза, устойчивая к высоким температурам. Для синтеза новой цепи ДНК необходим «строительный материал» — смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов — дезоксиаденозинтрифосфата, дезоксигуанозинтрифосфата, дезоксцитозинтрифосфата и дезокситимидинтрифосфата. Основой для реакционной смеси ПЦР выступает буферный раствор — смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей

оптимальные условия для реакции и стабильное значение pH. В состав буфера обязательно входят ионы  $Mg^{2+}$ . Компоненты реакционной смеси должны соответствовать определенным требованиям. ДНК-полимераза должна быть термостабильной, чтобы сохранять ферментативную активность на протяжении 35–45 циклов амплификации с изменением температурного режима от +95 до +50–60 °C.

**Праймеры** — искусственно синтезированные одноцепочечные фрагменты ДНК размером от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные анализируемому участку ДНК-мишени. Требования к праймерам.

1. Праймеры должны быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания и синтеза фрагментов, отличных от искомого. Часть праймеров и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов при этом израсходуется на синтез неспецифической ДНК, что приведет к значительной потере чувствительности.
2. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, то есть не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом.
3. Область отжига праймеров должна находиться вне зон известных и возможных мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании на такую зону отжига праймеров не происходит, и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат. Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и обычно варьирует от +55 до +72 °C. Высокой специфичности ПЦР можно достигнуть, используя праймеры с более высокой температурой отжига, например +65–68 °C.

**Используемый для амплификации анализируемый образец** — это подготовленный к внесению в реакционную смесь ПЦР препарат, содержащий искомую НК (например, ДНК микроорганизмов или человека, комплементарную ДНК, полученную из РНК путем обратной транскрипции), служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется. Степень очистки ДНК-матрицы не существенна для многих «простых» ПЦР и амплификации фрагментов ДНК до 1000–2000 пар нуклеотидов. В этих случаях возможно проведение ПЦР из клеточных лизатов, бактериальных колоний, соскобов мягких тканей и пр. Для амплификации длинных фрагментов ДНК (более 3000 пар нуклеотидов) и для высокотехнологичных применений ПЦР (секвенирование по Сэнгеру, высокопроцессивное NGS) нужны хорошо очищенные ДНК-матрицы. Некоторые вещества [ионные детергенты, фенол, этанол, гемин, некоторые реагенты для ДНК-мечения, антикоагулянты в вакутейнерах для забора крови (гепарин)], используемые в различных методиках для сбора биоматериала и выделения нуклеиновых кислот, даже в небольших количествах могут ингибировать ПЦР. Целостность ДНК-матрицы важна при амплификации длинных фрагментов. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 мес при +4 °C без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать ДНК во избежание ее деградации. Для амплификации длинных фрагментов требуется больше матрицы, однако слишком высокая концентрация исходной ДНК в реакционной смеси может ингибировать ПЦР и приводить к неспецифической амплификации.

**Проведение ПЦР** представляет собой реализацию алгоритма циклических изменений температуры (табл. 9.1). Амплификация начинается под воздействием высоких температур с предварительной денатурации, которая обеспечивает разрушение водородных связей между комплементарными парами нуклеотидов в двуцепочечной спирали ДНК и ее «расплетание» на одноцепочечные ДНК-матрицы. Далее следует повторение из 35–45 циклов, включающих три этапа последовательных изменений температуры: денатурация, отжиг праймеров, синтез новой цепи ДНК. **Отжиг праймеров** — это их присоединение к одноцепочечной ДНК-матрице в соответствии с правилом комплементарности. После отжига праймеров Taq-полимераза начинает синтез новой цепи ДНК с 3'-конца праймера и движется по направлению от 3'- к 5'-концу ДНК. На этапе синтеза температура реакционной смеси доводится до оптимальной для работы Taq-полимеразы, то есть +72 °C. Если температура отжига праймеров близка к температуре синтеза, то возможно проводить циклы ПЦР в два этапа.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Таблица 9.1. Примерная программа проведения полимеразной цепной реакции

Цикл	Количество циклов	t, °C	Время
Предварительная денатурация	1	92–95	1–5 мин
Денатурация	35–45	92–95	10–60 с
Отжиг праймеров		~55–68	10–60 с
Синтез (элонгация)		72	60 с
Досинтез (финальная элонгация)	1	72	3–5 мин

В ходе амплификации количество копий целевого фрагмента ДНК растет экспоненциально, однако увеличивать количество циклов ПЦР более 45–50 нецелесообразно, так как далее эффективность реакции падает и наступает «эффект плато». Оптимальные условия амплификации, такие как температура, время инкубации и количество циклов ПЦР, зависят от множества факторов — характеристик используемого амплификатора — программируемого термоциклера, объема пробы, свойств ДНК-матрицы, структуры праймеров — и подбираются индивидуально. Отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов обеспечивается специфичностью используемых праймеров и ДНК-зондов, количеством вносимой ДНК-матрицы, оптимальными условиями ПЦР (температура отжига,

количество циклов).

**Причинами ложноотрицательных результатов** являются, как правило, ошибки на преаналитическом этапе сбора биологического материала, выделения и хранения НК (табл. 9.2).

**Причиной ложноположительных результатов** является контаминация другими биологическими образцами, НК, амплификатами (ампликонами), как на стадии выделения НК, так и на стадии сбора реакционной смеси для ПЦР. Возможна контаминация биологических образцов на стадии взятия материала, а также контаминация используемых реактивов, рабочих поверхностей, используемого инструментария и расходных материалов (дозаторы, наконечники к ним, пробирки и т.п.).

**Таблица 9.2.** Причины ложноотрицательных результатов полимеразной цепной реакции и способы их устранения

Причины ложноотрицательных результатов	Способ устранения
Дегградация НК в биологических образцах	Использовать новый образец
Потеря осадка, содержащего НК, в процессе выделения	Аккуратно удалять на всех этапах растворы для отмывки
Дегградация НК после выделения	Использовать пластик, свободный от ДНКаз и РНКаз, воду, обработанную DEPC; соблюдать температурный режим хранения, условия заморозки/разморозки образцов НК

На всех стадиях выполнения ПЦР используются контрольные образцы.

1. *Внутренний контрольный образец* — неконкурентная НК/фрагмент НК — добавляется в каждую пробирку на этапе выделения, контролирует эффективность выделения ДНК/РНК (наличие ингибиторов, потери на этапе отмывок), качество амплификации в каждой пробирке, необходим для правильной интерпретации результатов постановки и определения валидности каждого результата.
2. *Отрицательный контрольный образец* — не содержит НК, служит для контроля отсутствия контаминации, также проходит все стадии ПЦР-анализа.
3. *Положительный контрольный образец* — содержит искомый фрагмент НК в известном количестве, служит для контроля стабильности реагентов и правильности программы ПЦР, готовится одна реакционная пробирка на каждый отдельный генетический маркер, при выполнении количественной ПЦР может использоваться как образец сравнения.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.1.2. Методы молекулярной диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции

**Аллель-специфичная ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов реакции** — метод выявления SNP. В его основе лежит использование аллель-специфичных праймеров, которые строго комплементарны нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы на 3'-конце. Если комплементарность неполная, а это происходит при наличии SNP, то эффективность элонгации с таким праймером резко снижается либо отсутствует. При электрофоретической детекции результата в данной пробе будет отсутствовать бэнд (фрагмент ДНК), соответствующий амплифицируемому фрагменту. Как правило, для анализа одной пробы в случае использования аллель-специфичных праймеров ПЦР проводят в двух пробирках — в одну добавляется аллель-специфичный праймер, комплементарный последовательности ДНК без SNP (нормальный аллель), а в другую — комплементарный последовательности ДНК с SNP (мутантный аллель).

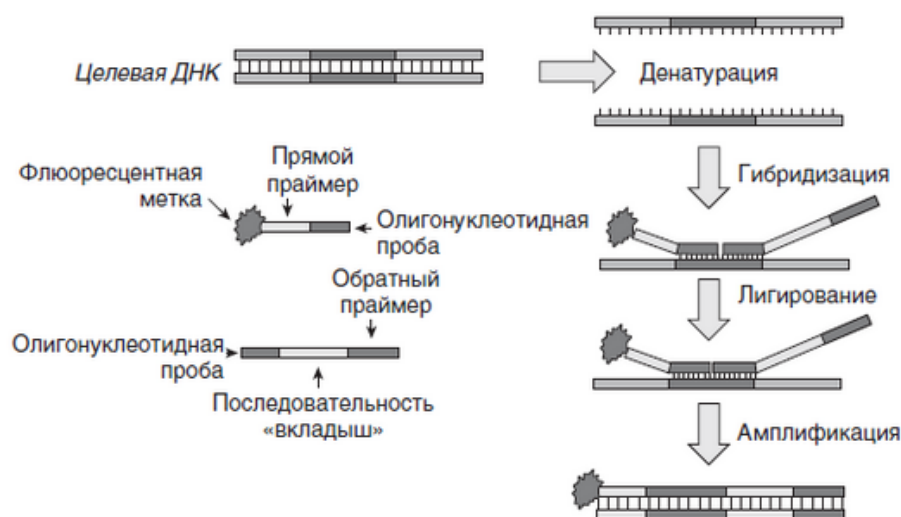
В настоящее время такой подход к выявлению SNP практически не используется в рутинной практике КЛД, так как электрофоретическое разделение продуктов амплификации с последующей окраской трудоемко, имеет высокий риск контаминации и, как следствие, повышенные требования к помещениям лаборатории — выделение отдельного помещения для проведения стадии электрофореза, изолированного от зоны постановки ПЦР.

**ПЦР и рестрикционный анализ**, или полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, — это выявление SNP с использованием эндонуклеаз рестрикции. Эндонуклеазы рестрикции — рестриктазы (от лат. *restrictio* — ограничение) — представляют собой группу ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот. В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза распознает свой уникальный сайт рестрикции — короткую последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него. Если SNP расположен в последовательности ДНК, идентичной сайту рестрикции определенной рестриктазы, то при нуклеотидной замене сайт может появляться или, наоборот, исчезать, соответственно, при электрофоретическом разделении продуктов анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов будет визуализироваться различный набор бэндов — фрагментов ДНК.

Данный метод является достаточно точным, однако этап электрофоретического разделения продуктов рестрикции накладывает ограничения на использование в рутинной практике КЛД. Метод остается востребованным для идентификации известных, но редко встречающихся мутаций, например для подтверждающей диагностики моногенных наследственных заболеваний.

**Мультиплексная амплификация лигазно-зависимых зондов** (Multiplex ligation-dependent probe amplification — MLPA) — метод, выявляющий крупные перестройки одного гена или соседних генов (рис. 9.1).





**Рис. 9.1.** Принцип метода мультиплексной амплификации лигазно-зависимых зондов (MLPA). Каждый зонд состоит из двух олигонуклеотидов, которые гибридизуются друг за другом на комплементарный участок ДНК.

Гибридизованные олигонуклеотиды «сшивает» фермент лигаза, и они становятся единым лигированным зондом, который далее амплифицируется в ходе полимеразной цепной реакции

При MLPA происходит умножение копий не фрагмента ДНК-матрицы, а лигированного зонда. Каждый зонд будет образовывать продукт амплификации уникальной длины, который далее может быть детектирован с помощью электрофоретического разделения. Кроме того, каждый зонд может быть помечен уникальной флуоресцентной меткой, в таком случае детекция результата может проводиться как ПЦР-РВ с помощью амплификатора с блоком оптической детекции. MLPA используют для диагностики наследственных заболеваний, обусловленных делециями или дупликациями генов.

*ПЦР с обратной транскрипцией* используют для идентификации известной последовательности РНК. Для этого на первой стадии одноцепочечную РНК превращают в комплементарную ей ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы, далее ПЦР проводится по стандартной схеме, с использованием комплементарной ДНК в качестве ДНК-матрицы

ПЦР с обратной транскрипцией используется для выявления РНК вирусов, а также для количественного определения специфических молекул РНК в клетках или тканях как показателя экспрессии соответствующих генов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

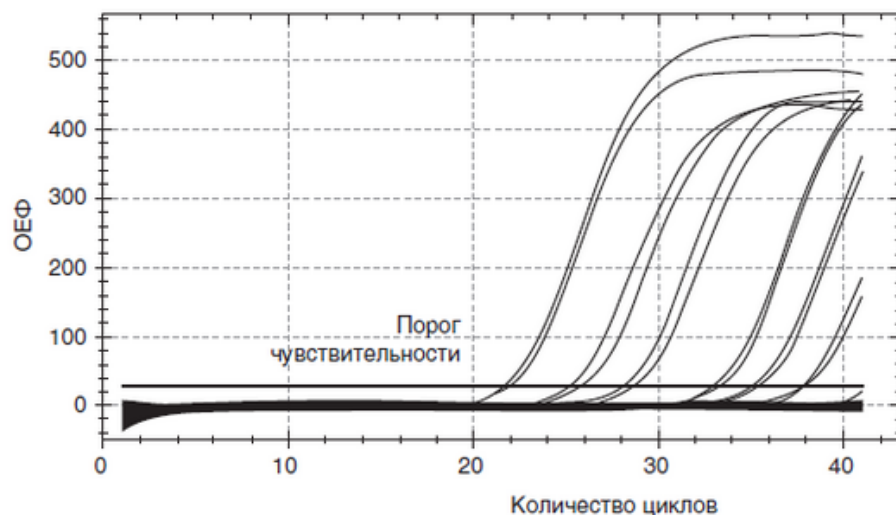
### 9.1.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Технология ПЦР-РВ (англ. Real-time PCR) позволяет количественно оценить исходное число копий анализируемой НК-ДНК или комплементарной ДНК. Принцип метода ПЦР-РВ заключается в добавлении флуоресцентного красителя в реакционную смесь ПЦР, при этом накопление флуоресцентного сигнала будет равно накоплению продукта амплификации. Для реализации методики ПЦР-РВ необходимо наличие в амплификаторе оптического блока, который будет регистрировать сигнал флуоресценции.

Флуоресцентный сигнал можно получить, используя несколько технологий: 1) флуоресцентный краситель, интеркалирующий в синтезируемый двуцепочечный фрагмент ДНК; 2) молекулярные «маячки» с инвертированными концевыми повторами, которые образуют «шпильку» с «красителем» на одном конце и «гасителем» на другом, флуоресцентный сигнал регистрируется, когда «шпилька» расправляется и соединяется с комплементарной последовательностью в цепи ДНК; 3) флуоресцентно-резонансный перенос энергии (FRET), когда в реакционную смесь ПЦР добавляют два зонда с соответствующими флуорофорами, которые при соединении зондов с комплементарными участками синтезированной ДНК оказываются рядом и усиливают флуоресцентный сигнал, регистрируемый оптическим блоком; 4) TaqMan-технология ПЦР-РВ, основанная на 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы.

Преимуществом ПЦР-РВ является отсутствие этапа электрофоретического разделения, что уменьшает риск контаминации, не требует отдельного помещения для детекции, снижает трудозатраты, кроме того, технология ПЦР-РВ открывает возможность для стандартизации и автоматизации молекулярно-генетических исследований.

*Количественная ПЦР.* Технология ПЦР-РВ позволяет определить количество исходного генетического материала в анализируемом образце. Независимо от используемой методики детектирования продуктов амплификации графический результат накопления флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации будет выглядеть как экспоненциальная кривая с наличием линейного участка и последующим выходом на плато (**рис. 9.2**).



**Рис. 9.2.** Кривые накопления продуктов амплификации в ходе полимеразной цепной реакции в реальном времени. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. По мере повторения циклов полимеразной цепной реакции интенсивность флуоресценции экспоненциально увеличивается, что связано с количеством исходного образца ДНК. Через некоторое количество циклов флуоресценция достигнет порога, регистрируемого прибором. Чем большее количество целевой ДНК содержится в образце, тем раньше начнется регистрируемая флуоресценция и потребуется меньшее число циклов полимеразной цепной реакции, необходимых для достижения пороговой флуоресценции, которую способен зарегистрировать прибор. Чем меньшее число циклов для этого требуется, тем больше содержится ДНК или РНК в пробе

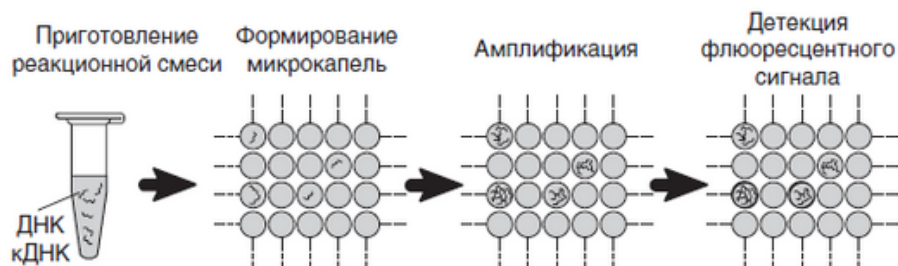
Цикл, на котором начинается рост кривой, зависит от исходного количества ДНК-матрицы, соответственно, это количество может быть рассчитано с помощью формул, а также с использованием стандартных образцов с известной исходной концентрацией ДНК для построения калибровочного графика. Как правило, программное обеспечение амплификатора с возможностью регистрации результата в режиме реального времени позволяет автоматизировать такие расчеты. Данный метод подходит для оценки уровня экспрессии генов, определения вирусной нагрузки, маркеров остаточной болезни.

**Определение генетических вариантов (SNP) методом ПЦР-РВ.** Метод ПЦР-РВ можно использовать не только для количественного анализа, но и для качественного определения наличия генетических вариантов (SNP). По сути, в данном подходе будет реализовываться аллель-специфичная ПЦР. В случае с использованием интеркалирующего красителя на одну пробу надо собирать две пробирки с реакционной смесью: в одной будут праймеры, специфичные к нормальному аллелю, в другой — к мутантному. Если же используется TaqMan-технология ПЦР-РВ, то реализуется принцип мультиплексной ПЦР, то есть в одной пробирке находится зонд, комплементарный нормальному аллелю и меченный одним флуорофором, и зонд, комплементарный мутантному аллелю, меченный другим флуорофором. Детекция флуоресцентного сигнала идет по двум разным каналам. Если детектируется только сигнал от одного флуорофора, то видим гомозиготный образец (нормальный генотип или мутантный генотип), если детектируются сигналы от обоих флуорофоров, то образец — гетерозигота.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.1.4. Цифровая полимеразная цепная реакция

Цифровая ПЦР (англ. Digital PCR, dPCR) представляет собой усовершенствованный метод традиционной ПЦР-РВ, позволяющий произвести прямой подсчет числа ДНК-мишеней. Принцип метода цифровой ПЦР: формирование из реакционной смеси микрокапель, которые содержат единичную молекулу ДНК-матрицы или не содержат матрицу вовсе, в каждой микрокапле проходит независимая ПЦР (**рис. 9.3**). Детекция результата цифровой ПЦР проводится «по конечной точке», как правило, с использованием флуоресцентной метки. Метод позволяет определять продукты ПЦР, синтезированные с единственной ДНК-матрицы.



**Рис. 9.3.** Принцип метода цифровой полимеразной цепной реакции

Метод может быть использован для идентификации редких генетических вариантов, для точного определения копий генов, для анализа экспрессии генов и определения микроРНК в единичных клетках. Преимуществами цифровой ПЦР перед ПЦР-РВ являются высокая точность и чувствительность анализа при малых количествах матрицы, отсутствие необходимости использовать стандарты и калибровочные кривые, меньшая чувствительность к присутствию ингибиторов ПЦР в пробе.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.1.5. Петлевая изотермическая амплификация

Петлевая изотермическая амплификация, или LAMP (англ. loop-mediated isothermal amplification), представляет собой метод амплификации искомого фрагмента ДНК с использованием полимеразы, которая вытесняет вторую цепь ДНК и работает при постоянной температуре. Для проведения LAMP используется большой фрагмент Bst ДНК-полимеразы I, обладающий сильной вытесняющей активностью. Количество используемых в LAMP праймеров — не менее 4, может использоваться 6, 8, 12 праймеров. Увеличение числа праймеров увеличивает специфичность реакции. Праймеры при достройке образуют ампликоны «гантелеобразной» структуры. Процесс амплификации методом LAMP включает три основных этапа: 1) образование базовой гантелеобразной структуры, 2) этап циклической амплификации, 3) этап элонгации и повторения циклов. Оптимальная температура работы Bst ДНК-полимеразы I составляет 65 °С.

Детекция результатов LAMP осуществляется несколькими способами:

- 1) электрофоретическое разделение (например, в агарозном геле с окраской);
- 2) визуализация по конечной точке с флюоресцентным красителем;
- 3) преципитация ампликонов с пирофосфатом магния и турбидиметрия;
- 4) измерение флюоресценции в реальном времени через равные временные промежутки проведения реакции (используется чаще всего).

В качестве преимуществ LAMP по сравнению с ПЦР-РВ можно выделить отсутствие термочиклирования и предварительной денатурации, высокую специфичность за счет использования нескольких пар праймеров, низкую чувствительность к примесям, быстроту выполнения анализа при высокой степени амплификации, наличие визуальных методов детекции.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.2. Методы молекулярной диагностики, основанные на гибридизации

К методам, основанным на гибридизации, относятся анализ с использованием ДНК-микрочипов и сравнительная геномная гибридизация.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.2.1. ДНК-микрочип

*ДНК-микрочип (microarray)* представляет собой множество одноцепочечных нуклеотидных фрагментов небольшого размера с известной последовательностью — ДНК-зондов, которые закреплены на твердой подложке. Исследуемый образец ДНК наносится на микрочип и по принципу комплементарности связывается с соответствующим зондом. Как правило, перед нанесением образцы ДНК метят флюоресцентным красителем, если произошло связывание с определенным зондом микрочипа, то данная точка начинает «светиться». Считывание флюоресцентного сигнала позволяет сделать выводы о наличии в анализируемой ДНК определенной последовательности нуклеотидов. Данная технология может быть использована как для обнаружения SNP в генах, так и для оценки экспрессии генов — по уровню флюоресцентного сигнала связанной с зондом комплементарной ДНК (комплементарная ДНК, полученная из РНК путем обратной транскрипции).

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.2.2. Сравнительная геномная гибридизация

*Сравнительная геномная гибридизация* (англ. comparative genomic hybridization) — это метод исследования всего генома для выявления хромосомных перестроек (аббераций), также носит название «хромосомный микроматричный анализ» (chromosomal microarray). При сравнительной геномной гибридизации выполняется сравнение генома пациента (исследуемая ДНК) с геномом здорового человека или группы здоровых людей (контрольная ДНК). Исследуемую и контрольную ДНК по отдельности денатурируют, фрагментируют и модифицируют, встраивая флюоресцентные метки, разные для исследуемого и контрольного образцов. Подготовленную таким образом ДНК наносят на чип, который содержит сегменты хромосом. Гибридизация обеих ДНК происходит равновероятно (конкурентно), соответственно, преобладание флюоресценции красителя исследуемой ДНК над красителем контрольной ДНК указывает на дупликацию в геноме пациента конкретного участка хромосомы, а обратная ситуация сигнализирует о его делеции.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.2.3. Флюоресцентная гибридизация in situ

FISH основана на использовании флюоресцентно меченных ДНК-зондов, комплементарных определенным участкам хромосом. FISH применяется для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*. Зонды бывают трех видов: 1) локус-специфичные — к отдельному участку хромосомы, как правило, к определенному гену; 2) центромерные зонды — комплементарные повторяющимся последовательностям центромерных областей хромосом; 3) зонды, комплементарные участкам

хромосом, подобранные таким образом, чтобы покрывать всю хромосому. FISH позволяет выявить количественные и качественные геномные и хромосомные аномалии — делеции, транслокации, удвоения, анеуплоидию. Метод FISH используют в преимплантационной, пренатальной и постнатальной генетической диагностике, в диагностике онкологических заболеваний, в ретроспективной биологической дозиметрии. FISH позволяет оценить генетический статус отдельной клетки и выявить несколько этиопатогенетически значимых аномальных клеток среди тысяч других с нормальным генотипом. Поставленная задача является уникальной для данного метода, она не под силу ни одному известному на сегодняшний день методу, даже ПЦР, при котором ДНК всех клеток смешивается и результат усредняется.

FISH может использоваться для:

- диагностики генетических заболеваний, связанных с изменениями в количестве или структуре хромосом, например синдрома Дауна, синдрома кошачьего крика;
- определения того, какие гены активны в клетке и как их активность меняется в зависимости от различных факторов;
- идентификации различных типов клеток в ткани или образце;
- изучения генетических изменений, лежащих в основе развития рака.

Преимущества FISH:

- высокая точность: FISH позволяет с высокой точностью определить местоположение ДНК-последовательностей в клетках;
- чувствительность: FISH может обнаружить даже небольшие количества ДНК;
- универсальность: FISH можно использовать для исследования различных типов клеток и тканей;
- наглядность: результаты FISH можно визуализировать с помощью флуоресцентного микроскопа.

*Ход определения.* Флуоресцентный зонд предназначен для соответствия конкретной интересующей последовательности ДНК. Этот зонд помечают флуоресцентным красителем. Разные зонды можно пометить разными красителями для одновременного обнаружения нескольких целей.

ДНК в образце (клетки из образца крови, биопсии или срезов тканей) денатурируется нагреванием для разделения на одиночные нити. Флуоресцентно меченный зонд наносится на образец, где он связывается (гибридирует) с комплементарной последовательностью ДНК в геноме. Образец промывают для удаления излишков зонда. Образец исследуют под флуоресцентным микроскопом. Зонды, связавшиеся с определенными последовательностями ДНК, будут флуоресцировать, и их местоположение можно будет визуализировать и проанализировать.

*Spectral karyotyping (SKY)* — разновидность FISH-метода, в котором все пары хромосом одновременно окрашиваются разными флуорохромами и визуализируются в разных цветах при одной гибридизации. Методом SKY определяют уникальный спектральный профиль каждой хромосомы, генерируемый конкретными комбинациями различных флуорохромов.

*Multiplex in situ hybridization (M-Fish)* — мультиплексная гибридизация *in situ* является 24-цветным методом кариотипирования, позволяет проводить анализ сложных межхромосомных перестроек.

*COBRA-FISH* — многоцветная методология FISH, которая позволяет распознавать все хромосомные плечи, картировать сайт геной и вирусной интеграции в контексте окраски плеч хромосом.

*MultiColorBanding* — метод многоцветного бэндинга хромосом, предназначен не для полного анализа всех хромосом, а для проведения детального анализа отдельной хромосомы.

FISH является таргетным методом, позволяет оценить в основном только количество копий определенных хромосом или их районов. Небольшого числа флуорохромов недостаточно для выявления внутрехромосомных aberrаций в пределах одного цветового бэнда или в немеченых участках.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.3. Секвенирование

**Секвенирование** (от лат. *sequentum* — последовательность) нуклеиновых кислот — определение их нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. В результате секвенирования участков ДНК получают последовательности участков генов, целых генов, мРНК или полных геномов организмов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.3.1. Секвенирование по Сенгеру

Определение последовательности ДНК, основанное на селективном ферментативном синтезе, предложено Фредериком Сенгером в 1970-х гг., получило название «секвенирование по Сенгеру». Этот метод определения последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК также известен как метод обрыва цепи. В основе метода лежит ПЦР, в реакционную смесь которой, помимо смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов (дезоксиаденозинтрифосфат, дезокситимидинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат, дезоксицитозинтрифосфат), добавляют смесь дидезоксинуклеотидов (дидезоксиаденозинтрифосфат, дидезокситимидинтрифосфат, дидезоксигуанозинтрифосфат, дидезоксицитозинтрифосфат). У дидезоксирибонуклеотидов отсутствует 3'-гидроксильная группа, поэтому после их включения в цепь ДНК дальнейший синтез обрывается. Таким образом, в результате ПЦР образуется смесь

ампликонов разной длины, оканчивающихся на определенную «букву». Смесь ампликонов разделяется с помощью капиллярного электрофореза. Так как каждый дидезоксирибонуклеотид мечен своим флюоресцентным красителем, то синтезированные фрагменты ДНК, выходящие из капиллярной колонки, детектируются по флюоресцентному сигналу, формируя последовательность «пиков» разного цвета, которая соответствует последовательности анализируемого фрагмента ДНК. Используя секвенаторы, основанные на данной технологии, за один раз можно расшифровать последовательности ДНК длиной до 1000 нуклеотидов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.3.2. Высокопроцессивное секвенирование/секвенирование нового поколения

NGS, или высокопроцессивное секвенирование, представляет собой технологию массового параллельного секвенирования, обеспечивающую высокую пропускную способность, масштабируемость и скорость определения нуклеотидных последовательностей. Данная технология может быть использована как для полногеномного секвенирования, когда определяется последовательность всего генома организма, так и для экзомного (определение последовательности кодирующей области генома) и таргетного (определение нуклеотидной последовательности отдельных локусов или выявление конкретных SNP) секвенирования. С помощью NGS можно определять последовательность не только ДНК, но и РНК (RNA-Seq), что позволяет обнаруживать новые варианты РНК, определять микроРНК и количественно определять мРНК для оценки экспрессии генов.

В настоящее время существует несколько технологий NGS, все они позволяют «прочитать» одновременно сразу несколько участков генома, что и является их главным отличием от более ранних методов секвенирования, включая секвенирование по Сенгеру.

*Пиросеквенирование* — метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, реализующий принцип «секвенирование путем синтеза», при котором включение каждого нуклеотида детектируется за счет ряда химических реакций с высвободившимся пирофосфатом, сопровождающихся выделением кванта света. На первом этапе анализируемая ДНК фрагментируется случайным образом на последовательности 300–500 пар оснований. Далее комплементарные цепи каждого фрагмента разделяются, и к каждой цепи «пришивается» одинаковый для всех олигонуклеотидный «адаптер». Приготовленные таким образом фрагменты ДНК-матрицы закрепляют на твердой фазе и проводят ПЦР, в процессе которой по очереди добавляют дезоксиаденозинтрифосфат, дезокситимидинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат, дезоксицитозинтрифосфат. Если на секвенируемом фрагменте ДНК есть комплементарный к добавленному нуклеотид, то при образовании фосфодиэфирной связи побочным продуктом станет пирофосфат, который активирует химическую реакцию, катализируемую люциферазой — ферментом светлячка *Photinus pyralis*. Пирофосфат под действием АТФ-сульфуриказы превращается в АТФ, являющийся источником энергии для окисления люциферазой люциферина до оксилуциферина, что сопровождается хемилюминесценцией — выделением кванта света. Выделение кванта света детектируется, и с помощью программного обеспечения по пирограмме строится последовательность нуклеотидов в анализируемых фрагментах ДНК-матрицы. Нуклеотиды, которые не были включены в синтез новой цепи на данном цикле, а также АТФ разрушаются апиразой, затем следует новый цикл с добавлением следующего дезоксинуклеотида.

*Метод секвенирования с применением реверсивной терминации* — короткие «прочтения» — образец ДНК фрагментируется на короткие последовательности от 300 до 500 пар оснований, которые наносятся на предметное стекло — проточную ячейку. В секвенаторе выполняется повторяющийся цикл, при котором в проточную ячейку за один раз добавляется один модифицированный нуклеотид (например, Т), затем ячейка промывается и добавляется другой нуклеотид (например, Ц). Нуклеотиды модифицированы нуклеотид-специфичной флюоресцентной меткой с цветовым кодированием. Прибор отслеживает, какой цвет присутствует в каждом участке проточной ячейки в течение каждого цикла. В результате получается набор данных, упорядоченных по времени цветов и положений. Скомпилированная цветовая последовательность преобразуется в нуклеотидную последовательность на каждом участке проточной ячейки, то есть получается нуклеотидная последовательность каждого фрагмента ДНК, фиксированного на проточной ячейке.

*Метод полупроводникового секвенирования* — короткие «прочтения» — образец ДНК фрагментируется на короткие последовательности 250–500 пар оснований, которые модифицируются добавлением к их концам специфических нуклеотидных последовательностей — «ДНК-адаптеров». Фрагменты ДНК, модифицированные адаптерами, помещают в раствор с магнитными бусинами, покрытыми короткими нуклеотидными последовательностями, комплементарными адаптерам. В результате фрагменты ДНК прикрепляются каждый к своей бусине, далее фрагменты ДНК амплифицируются, и бусина оказывается покрыта копиями соответствующего фрагмента ДНК. Бусины, покрытые ДНК, помещают в чип с микроскопическими лунками таким образом, что каждая бусина попадает в свою лунку. В секвенаторе выполняются повторяющиеся циклы добавления свободных нуклеотидов по одному за каждый цикл. Циклы повторяются 200–400 раз. Когда свободный нуклеотид вводится во фрагмент ДНК, то высвобождаются ионы водорода, тем самым снижается рН в конкретной лунке, электрический потенциал лунки при этом повышается. Прибор регистрирует, в каких лунках произошло изменение напряжения при добавлении конкретного нуклеотида, преобразует эту информацию в нуклеотидную последовательность каждого фрагмента ДНК, добавленного в чип. Таким образом, определение последовательности нуклеотидов в данном методе основано на электрическом способе детекции, а не на оптическом.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

*Метод одномолекулярного секвенирования в реальном времени* — длинные «прочтения» — образец ДНК разделяют на фрагменты размером 20 000 пар оснований и более. Данная технология основана на фиксировании процесса

синтеза ДНК-полимеразой новой цепи на ДНК-матрице в реальном времени. Длинные фрагменты ДНК подготавливают к секвенированию путем добавления на концы двух ДНК-шпилек. При денатурации с помощью этих шпилек фрагменты ДНК превращаются в замкнутые одноцепочечные петли. Петли отделяют от фрагментов и помещают в проточную ячейку с микроскопическими лунками, на дне которых иммобилизована ДНК-полимераза. Каждая петля ДНК попадает в свою лунку, после чего ДНК-полимераза присоединяется к фрагменту петли, который одинаков для всех подготовленных фрагментов ДНК. Далее в ячейку наносятся флюоресцентно меченные свободные нуклеотиды, которые встраиваются в растущую цепь, синтезируемую ДНК-полимеразой комплементарно петле ДНК. Так как ДНК-полимераза фиксирована на дне лунки, встраивание нуклеотидов происходит также на дне каждой лунки, где флюоресцентная метка каждого добавленного нуклеотида возбуждается лазером, находящимся под лункой, и излучаемый свет регистрируется сенсором. В результате получается цветовой ряд для каждой лунки с известной локализацией на пластине, который является нуклеотидной последовательностью для каждой лунки и, соответственно, для каждого фрагмента ДНК.

*Метод одноцепочечного секвенирования с помощью белковых нанопор* — длинные «прочтения» — в этом методе образец ДНК фрагментируют на длинные двуцепочечные последовательности, которые модифицируют в формате «направляющей шпильки», то есть к одному концу фрагмента ДНК крепится нуклеотидная шпилька, а к другому — направляющий сегмент. При плавлении ДНК-фрагментов образуется длинный сегмент одноцепочечной ДНК со следующим расположением последовательностей: направляющий сегмент; исследуемая ДНК; шпилька; участок обратной последовательности, комплементарной исследуемой ДНК. Блок секвенатора содержит камеру, заполненную жидкостью и разделенную графеновой мембраной, в которую встроено множество белковых пор. Через камеру с жидкостью пропускается электрический ток, под действием которого фрагменты ДНК, добавленные с одной стороны мембраны, проходят через поры белка на другую сторону мембраны. Одноцепочечная ДНК, проходя через пору, препятствует току ионов водорода, что обнаруживается по изменению напряжения. По мере того как ДНК проходит через белковую пору, изменение напряжения происходит специфично для каждого нуклеотида, находящегося в отверстии поры, что позволяет его идентифицировать. В результате продуцируется серия изменений напряжения во времени, которая преобразуется в последовательность нуклеотидов. Принцип шпильки позволяет повысить точность секвенирования, так как каждый фрагмент ДНК прочитывается дважды: один раз — как прямая одноцепочечная последовательность и еще раз — как обратная комплементарная одноцепочечная последовательность.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.4. Молекулярно-биологические методы в диагностике опухолей

Преобразование нормальной (здоровой) клетки в опухолевую осуществляется в результате изменения генов, приводящих к мутациям. В основе развития опухоли во всех без исключения случаях лежит изменение структуры последовательности нуклеотидов, которые приводят к активации онкогенов и инактивации (дисфункции) супрессорных генов. В дополнение к качественным изменениям генетического аппарата клетки геном опухолевых клеток может подвергаться значительной дисрегуляции уровня экспрессии генов, то есть количественному изменению уровня пептидов (белков). Как качественные нарушения (мутации), так и количественные особенности (изменения уровня экспрессии) могут достоверно выявляться современными методами молекулярной генетики. Молекулярно-генетические исследования в онкодиагностике представлены в следующих вариантах:

- 1) молекулярно-генетические исследования, основанные на ПЦР и ее модификациях;
- 2) молекулярно-генетические исследования, основанные на технологии секвенирования по Сенгеру;
- 3) молекулярно-генетические исследования, основанные на технологии фрагментного анализа;
- 4) молекулярно-генетические исследования, основанные на технологии NGS;
- 5) молекулярно-генетические исследования, основанные на технологиях масс-спектрометрии;
- 6) молекулярно-генетические исследования, основанные на технологиях микроматричного анализа;
- 7) другие молекулярно-генетические исследования, основанные на технологиях количественного и качественного анализа НК и их модификациях.

Примечательно, что две самые известные технологии — ПЦР и NGS — характеризуются двумя крайне важными характеристиками. Во-первых, ПЦР и NGS обладают универсальностью — их можно использовать для анализа любой генетической последовательности. Во-вторых, ПЦР и NGS обладают высокой ДЧ, ДС и межлабораторной воспроизводимостью. Соответственно, сфера медицинского применения ДНК- и РНК-тестов постоянно расширяется: современную онкологию невозможно представить без диагностики наследственных опухолевых синдромов, выявления предиктивных мутаций, анализа экспрессионных характеристик опухоли.

В настоящее время большая часть клинического анализа последовательностей охватывает панель из 50–500 генов, включая известные «горячие точки» и гены, участвующие в развитии рака. Более широкие панели включают гены, о которых известно меньше, и поэтому могут генерировать варианты неопределенного значения (от англ. *variants of uncertain significance* — VUS), что представляет проблему интерпретации для клинических лабораторий. Помимо клинической полезности, на выбранный размер панелей диагностики влияют вопросы стоимости и размещения. По мере расширения наших знаний и снижения стоимости анализа ожидается, что широкий геномный анализ станет более рутинным.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.4.1. Генетическая характеристика наследственного рака

Существует несколько отдельных направлений молекулярной диагностики. Одним из первых значимых достижений молекулярной диагностики была идентификация основных генов наследственного рака (**табл. 9.3**).

**Таблица 9.3.** Генетическая характеристика наследственного рака

Опухоли	Гены	Синдром	Комментарий
Рак МЖ, яичника ( <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> ), рак ПЖ ( <i>PALB2</i> ), рак предстательной железы ( <i>BRCA2</i> )	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i>	Семейный рак МЖ, ПЖ, простаты	Опухоли характеризуются наличием мутации в гомологичной рекомбинации ДНК
Рак МЖ с умеренной пенетрантностью	<i>CHEK2</i> , <i>ATM</i> , <i>BARD1</i> , <i>BLM</i> , <i>BRIP1</i> , <i>NBS/NBM</i> , <i>MRE11</i> , <i>RAD50</i> , <i>RAD51C</i> , <i>RAD51D</i> , <i>FANCC</i> , <i>FANCM</i>	Семейный рак МЖ	—
Карциномы толстой кишки, рак яичников, желудка, эндометрия, тонкой кишки	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>EPCAM</i>	Синдром Линча (наследственный неполипозный рак толстой кишки, эндометрия, в меньшей степени — других органов)	—
Колоректальный рак, полипоз толстой кишки	<i>POLE</i> , <i>POLD1</i>	Наследственный рак толстой кишки	Очень высокая мутационная нагрузка в опухолевых клетках
Множественный аденоматоз толстой кишки, десмоидные опухоли, рак толстой кишки	<i>APC</i>	Семейный аденоматозный полипоз	—
Гамартомы, опухоли ЖКТ	<i>STK11</i>	Синдром Пейтца–Егерса	Преимущественно выявляются точковые мутации, редко — большие делеции
Рак желудка	<i>CDH1</i>	Наследственный рак желудка	—
Меланомы	<i>CDKN2A</i> , <i>CDK4</i>	Семейная меланома	—

Особенностями наследственных опухолей является то, что они проявляются в раннем возрасте (до 40 лет) и достаточно дискретны в группе новообразований. Например, *BRCA1/2*-ассоциированный рак характеризуется дефектом репарации ДНК по механизму гомологичной рекомбинации, поэтому он демонстрирует очень высокую чувствительность к производным платины и PARP-ингибиторам. Наследственный неполипозный рак толстой кишки сопровождается накоплением избыточного количества мутаций в опухолевой ткани — это приводит к повышенной антигенности новообразований и предопределяет их чувствительность к иммунотерапии. Спектр наследственного рака в значительной мере зависит от этнических факторов. Большинство исследований семейных опухолевых синдромов проведено в США или Западной Европе, что не всегда может быть применено в отношении нашей страны. Знание мутационного статуса позволяет этиопатогенетически проводить лекарственную терапию при злокачественных новообразованиях; сегодня имеются схемы базовой и резервной терапии по наличию мутаций в опухолевых тканях (табл. 9.4).

**Таблица 9.4.** Молекулярно-генетические маркеры для выбора терапии злокачественных новообразований

Лабораторный маркер	Препарат
Мутация <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAness</i>	Ингибиторы PARP
Мутация <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAness</i>	Препараты платины, митомицин
Мутации <i>EGFR</i>	EGFR-специфическая терапия (чувствительность)
Транслокация <i>ALK/ROS1</i>	Ингибиторы <i>ALK/ROS1</i>
Мутации <i>KRAS/NRAS/BRAF</i>	EGFR-специфическая терапия (резистентность)
Мутации <i>BRAF</i>	Ингибиторы <i>BRAF</i>
Высокая экспрессия PD-L1	Антагонисты PD1 и PD-L1
Совокупное количество мутаций ( в том числе опухоли с микросателлитной нестабильностью)	Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа
Амплификация и гиперэкспрессия HER2	HER2-специфическая терапия
Экспрессия ER	Тамоксифен, ингибиторы ароматазы
Мутации <i>TSC1/2</i> , мутации <i>mTOR</i>	Ингибиторы <i>mTOR</i>
Мутации <i>MET</i> , сопровождающиеся отсутствием экзона 14 в составе транскрипта	Ингибиторы <i>MET</i>
Мутации <i>PIK3CA</i>	Ингибиторы <i>PI3K</i>
Мутации <i>NTRK</i>	Ингибиторы <i>TrkA/B/C</i> и <i>ROS1</i>



## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Выявление мутаций, определяющих дальнейшую стратегию лечения, не всегда является залогом эффективного лечения, что связано с чувствительностью опухоли к терапии.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.4.2. Использование полимеразной цепной реакции в диагностике опухолей

ПЦР вошла в рутинную практику диагностики опухолей в связи с универсальностью методологии. Она направлена на определение наиболее часто встречающихся мутаций генов, связанных с опухолевым процессом. Информация о мутациях в наиболее распространенных генах (чаще всего *BRAF*-мутации, а также *BRCA1/BRCA2*, *EGFR*, *HRAS*, *KRAS*, *MET*) стала основой развития технологий таргетной терапии и иммунотерапии. **Биоматериалом** для исследований методом ПЦР могут быть все клетки, содержащие ДНК или ее фрагменты.

**Опухолевая ткань** — наиболее информативный и предпочтительный тип биоматериала. Взятие материала происходит путем биопсии, хирургического вмешательства или пункции опухолевого очага, это обеспечивает наиболее точные и надежные результаты исследования, позволяет оценить гетерогенность мутации в разных частях опухоли.

**Мазки с поверхности опухоли** — менее инвазивный метод получения опухолевого материала для ДНК-диагностики по сравнению с биопсией, применяется для диагностики меланомы. ДЧ и ДС метода ниже, чем при исследовании опухолевой ткани, и требует более сложных методов диагностики при обнаружении мутации.

**Цельная венозная кровь** — в большинстве случаев наиболее доступный вид биоматериала, используемый для мониторинга ответа на терапию и выявления рецидивов заболевания. Чувствительность диагностики при использовании цельной крови ниже, чем при исследовании опухолевой ткани, требует использования более сложных методов диагностики, таких как цифровая ПЦР.

**Жидкая биопсия** — новый и перспективный метод исследования, основанный на анализе циркулирующей в крови ДНК опухоли, позволяет неинвазивно диагностировать заболевание, отслеживать его течение и выявлять рецидивы для определения тактики лечения после исчерпания возможностей той или иной схемы терапии. ДЧ и ДС метода находятся в стадии активного исследования и требуют дальнейшей валидации перед широким клиническим применением. Ограничением является частая низкая доля циркулирующей ДНК опухоли в крови. На основе жидкостной биопсии не устанавливают диагноз злокачественных новообразований.

**Условия хранения, влияние внешних факторов на результат исследований.** Сохранение биологического материала в надлежащих условиях является абсолютным требованием для обеспечения его пригодности к молекулярно-генетическим исследованиям. Несоблюдение рекомендаций может привести к необратимой деградации НК.

**Опухолевая ткань, фиксированная в формальдегиде (Формалине<sup>▲</sup>) и заключенная в парафиновые блоки.** Оптимальная температура: от +15 до +25 °С (комнатная температура). Допустимая температура: от +4 до +37 °С. Рекомендуемая относительная влажность: 30–50%. Обязательно необходимо хранить парафиновые блоки в защищенном от прямого солнечного света месте. При соблюдении рекомендованных условий хранения парафиновые блоки могут быть пригодны для молекулярно-генетических исследований в течение нескольких лет.

**Мазки с поверхности опухоли.** Оптимальная температура: +4 °С. Рекомендуемая относительная влажность: 30–50%. Обязательно необходимо хранить мазки в защищенном от прямого солнечного света месте. Образцы мазков могут быть пригодны для молекулярно-генетических исследований в течение нескольких недель.

**Цельная венозная кровь.** Оптимальная температура крови, собранной в вакуумные пробирки с ЭДТА: +4 °С. Срок хранения: до 7 дней. При замораживании при –70 °С: до 6 мес.

**Жидкая биопсия (цДНК).** Оптимальная температура: –20 °С. Срок хранения: в течение 10 лет.

**Преимущества и ограничения ПЦР.** Дешевизна, доступность, возможно тестирование только отдельных вариантов мутаций. Пересадка костного мозга теоретически может влиять на результат теста, в этом случае будут необходимы дополнительные исследования. Обнаружение мутаций методом ПЦР зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптической плотности (A260/280 нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4.

Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования, должна составлять 1–50 нг/мкл. В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 1,0 нг на одну реакцию) после завершения реакции амплификации регистрируется недостоверный результат. Результаты ПЦР не всегда имеют клинические подтверждения в текущем времени и служат ориентиром для дальнейшей тактики в совокупности клинико-диагностических подходов конкретного пациента. Зачастую наборы для ПЦР ориентированы на наиболее часто встречающиеся варианты мутаций, и редкие формы не определяются, что может приводить к ложноотрицательной интерпретации изменения гена в целом. Для исключения таких ситуаций врачу необходимо комплексно оценивать результат и рассматривать последовательность алгоритмов диагностики с применением подтверждающих (уточняющих) методов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.4.3. Молекулярные маркеры онкогенных мутаций

**Мутация *BRAF V600E*** обусловлена заменой валина на глутаминовую кислоту в 600-м положении белка BRAF. Эта мутация — одна из наиболее значимых онкогенных мутаций при разных типах злокачественных новообразований. Ее выявление имеет критическое значение для диагностики, стратификации риска, прогнозирования и подбора таргетной терапии опухолей ЩЖ, рака легкого, меланомы.

Ген *BRAF* находится на длинном плече хромосомы 7 в локусе 7q34.1.



Материалом для исследований мутации BRAF V600E могут служить опухолевая ткань, мазки с поверхности опухоли, цельная венозная кровь, жидкая биопсия. Молекулярно-генетическое исследование мутаций в 600-м кодоне гена *BRAF* может проводиться различными методами, однако наиболее распространенным является аллель-специфическая ПЦР-РВ.

#### Клиническое значение.

- Мутация V600E является специфическим маркером для меланомы с мутацией BRAF, папиллярного рака ЩЖ, некоторых подтипов колоректального рака и немелкоклеточного рака легкого (HMPJL).
- Статус мутации V600E является прогностическим фактором, позволяющим оценить риск рецидива и прогрессирования опухоли. Опухоли с мутацией BRAF V600E чаще характеризуются агрессивным течением, метастазированием и более низкой выживаемостью.
- Наличие мутации V600E является биомаркером таргетной терапии. Первой линией терапии для пациентов с подтвержденной мутацией BRAF V600E при меланоме, HMPJL, папиллярном раке ЩЖ и колоректальном раке выступают ингибиторы мутантного белка BRAF, блокирующие сигнальный путь MAPK, который в норме стимулирует рост и прогрессирование опухоли.
- При отсутствии BRAF-мутации (в меланоме кожи и слизистых оболочек) возможно проведение молекулярно-генетического исследования мутаций в генах *NRAS* и *KIT*. При аденокарциноме целесообразны определение мутаций в генах *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и транслокаций гена *ALK*; оценка экспрессии TS, TP, DPD, BRCA1,  $\alpha$ -тубулина, рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (Human epidermal growth factor receptor 2 oncogene — HER2).

**Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*** были идентифицированы в рамках исследований синдрома наследственного рака МЖ и яичника. Белковые продукты этих генов играют важную роль в устранении двунитевых разрывов ДНК посредством гомологичной рекомбинации. *BRCA1* также участвует в регуляции клеточного цикла, транскрипции, ремоделирования хроматина и, возможно, входит в комплекс белков РНК-полимеразы II. Для обоих генов описаны варианты нуклеотидной последовательности, влияющие на нормальную функцию их белковых продуктов. Изменения в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводят к раку МЖ у женщин и мужчин, раку яичников у женщин; идентифицированы при онкологических заболеваниях предстательной железы, яичек, ПЖ, кишки, гортани, кожи и эндометрия. Частота встречаемости BRCA-мутаций в популяции — 1:800–1:1000, при этом она зависит от географической локализации и этнической группы.

Гены *BRCA1* и *BRCA2* кодируют аминокислотные последовательности ядерных белков, которые участвуют в регуляции восстановления ДНК и деления клеток. В интактном (немутантном) состоянии оба гена выступают в качестве супрессоров опухоли и обеспечивают целостность генома. Кроме того, белковые продукты генов репрессируют транскрипционную функцию гена *ER*, сдерживая таким образом избыточную пролиферацию клеток МЖ и других эстрогензависимых органов, в частности при половом созревании и беременности. Наличие клинически значимых мутаций в генах *BRCA1* или *BRCA2* вызывает потерю функции белков, кодируемых этими генами, в результате нарушается основной механизм репарации двунитевых разрывов ДНК. На сегодняшний день известно более 1000 различных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2*, связанных с повышением риска развития рака МЖ, яичников, предстательной железы и др. Для реализации онкогенного эффекта достаточно, чтобы мутация присутствовала хотя бы в одном аллеле. При обнаружении мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у женщины риск развития рака МЖ и/или яичников составляет от 50 до 80%.

Основные критерии для включения пациентов в группы риска с целью определения герминальных мутаций *BRCA1/2* методом ПЦР:

- онкологически отягощенный семейный анамнез (два и более случая рака МЖ/рака яичника у родственников первой и второй линии родства);
- рак МЖ в молодом возрасте (до 45 лет);
- двусторонний (синхронный, метасинхронный) рак МЖ;
- первично-множественные злокачественные новообразования, в том числе сочетание рака МЖ и яичников;
- рак яичников, фаллопиевых труб, метастатические поражения брюшины в любом возрасте;
- рак ПЖ, рак предстательной железы;
- рак МЖ у мужчин в личном и семейном анамнезе;
- морфологические особенности рака МЖ: трижды негативные опухоли (ER-, PR-, HER2/neu-) и медулярный рак.

#### Клиническое значение.

- Наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* влияет на прогноз и выбор тактики лечения. У пациентов с раком МЖ повышен риск возникновения второй злокачественной опухоли в той же или другой МЖ, поэтому зачастую хирурги рекомендуют двустороннюю мастэктомию.
  - Опухоли МЖ с дефектами в генах *BRCA1* и *BRCA2* часто являются тройными негативными, то есть у них отсутствуют рецепторы к ER, PR и белку-рецептору HER2. Такой рак сложнее лечить, против него неэффективны гормональные и некоторые таргетные препараты. Прогноз для здоровья менее благоприятный. Так как гены *BRCA* участвуют в репарации ДНК, то опухолевые клетки, в которых их функция нарушена, более чувствительны к химиопрепаратам, повреждающим ДНК, таким как цисплатин. Если опухолевые клетки имеют рецепторы к половым гормонам, они чувствительны к химиопрепаратам из группы таксанов. Рост опухоли могут остановить ингибиторы PARP — препараты,

которые нарушают восстановление поврежденной ДНК. В результате в раковых клетках накапливается еще больше мутаций, что и приводит к их гибели. К этой группе относятся препараты *олапариб*, *рукапариб*<sup>69</sup>.

- Отрицательный результат теста на частые мутации не гарантирует отсутствие других мутаций в этих генах, которые могут быть выявлены при секвенировании генов. Лицам с вышеперечисленными факторами риска при отсутствии мутаций *BRCA1/2* по данным ПЦР показано выполнение NGS. Для лиц неславянской этнической группы предпочтительным методом определения мутаций *BRCA* является NGS, что обосновано распространенностью нетипичных изменений в генах *BRCA*.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

**Мутации гена *EGFR* (рецептора эпидермального фактора роста).** Рецепторы эпидермального фактора роста служат молекулярными маркерами разных видов рака, в первую очередь НМРЛ. *EGFR* — трансмембранный белок, локализованный на поверхности клеток и являющийся мишенью для внеклеточных сигналов. Он выполняет функции связывания с лигандами (эпидермальный фактор роста, TGF $\alpha$  и др.) на поверхности клетки; активации каскада внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к стимуляции пролиферации, ингибированию апоптоза, ангиогенезу. Из многочисленных типов мутаций *EGFR* наиболее распространенными являются делеции в экзоне 19, приводящие к утрате части гена *EGFR*, обуславливающие образование гиперактивного белка, и точковые мутации, связанные с заменой одной аминокислоты в белке *EGFR* другой, способствующей его гиперактивности. Мутации гена *EGFR* могут спровоцировать неконтролируемый рост и деление клеток, что, в свою очередь, может привести к развитию злокачественных новообразований. Тестирование на мутации гена *EGFR* рекомендуется:

1) всем пациентам с НМРЛ для определения возможности таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы *EGFR*;  
2) пациентам с другими типами рака, при которых одобрена таргетная терапия ингибиторами тирозинкиназы. Таргетная терапия ингибиторами тирозинкиназы *EGFR* демонстрирует высокую эффективность при лечении пациентов с мутациями *EGFR* в НМРЛ, что приводит к значительному улучшению показателей выживаемости. Присутствие мутаций *EGFR* является прогностическим фактором в некоторых других типах рака, таких как рак МЖ и колоректальный рак.

*Клиническое значение.*

- Пациенты с мутациями в гене *EGFR* во многих случаях демонстрируют высокую чувствительность к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ *EGFR*, специфически блокирующих активность *EGFR*. Эффективность терапии значительно выше у пациентов с мутациями в гене *EGFR*. Отсутствие мутаций *EGFR* не всегда является абсолютным противопоказанием к применению таргетной терапии. В некоторых случаях таргетная терапия может продемонстрировать определенную эффективность и у пациентов без мутаций *EGFR*.
- При НМРЛ наличие мутаций в гене *EGFR* обуславливает выбор в качестве препаратов первой линии таргетной терапии *гефитиниба*, *эрлотиниба*, *афатиниба*, демонстрирующих высокую эффективность. В случае отсутствия мутаций в гене *EGFR* у пациентов с НМРЛ химиотерапия является стандартным подходом.
- HER2-негативный статус рака МЖ в совокупности с обнаружением мутации в гене *EGFR* позволяет применять таргетную терапию *лапатинибом* в комбинации с химиотерапией. Если нет мутаций в гене *EGFR*, у пациентов с раком МЖ таргетную терапию обычно не применяют.
- У пациентов с метастатическим колоректальным раком при наличии мутаций в гене *EGFR* могут применяться *цетуксимаб* и *панитумумаб* в комбинации с химиотерапией. В отсутствие мутаций в гене *EGFR* при колоректальном раке таргетную терапию обычно не применяют. Важно учитывать, что не при всех мутациях *EGFR* злокачественные новообразования одинаково чувствительны к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ.

**Мутации в гене *KRAS*** сопровождают большинство случаев аденокарциномы легкого, муцинозной аденомы, протоковой карциномы ПЖ и колоректальной карциномы. Активирующие мутации в гене *KRAS* меняют ГТФазную активность белка и блокируют возможность его деактивации, что ведет к гиперактивации ряда внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих рост и пролиферацию клеток. Формы рака, связанные с геном *KRAS*, отличаются агрессивностью — быстрым распространением метастазов, а также малой эффективностью проводимой терапии. Молекулярно-генетическое исследование на определение мутаций гена *KRAS* показано при раке легкого, колоректальном раке и меланоме и используется для выявления статуса и подбора терапии, правильного планирования дальнейшей тактики лечения. Образующийся трансформирующий белок участвует в различных злокачественных новообразованиях, включая аденокарциному легкого, муцинозную аденому, протоковую карциному ПЖ и колоректальный рак.

Фактор, который оказывает решающее влияние на достоверность и точность результата исследования, — это условия обработки, которую претерпел материал перед тем, как из него выделили ДНК. *Фиксация ткани формальдегидом (Формалином<sup>▲</sup>) обеспечивает сохранность биологического материала.* Молекулярно-генетическое исследование биопсийного материала для определения мутаций в гене *KRAS* может проводиться разными методами, каждый из которых обладает преимуществами и ограничениями:

- ПЦР в режиме реального времени на определение мутаций в кодонах 12, 13, 59, 61, 117 и 146;
- секвенирование по Сенгеру в 2, 3, 4-м экзонах;
- секвенирование методом NGS.

Метод секвенирования ДНК по Сенгеру является универсальным, но имеет существенное ограничение в виде низкой чувствительности. Для достоверного определения последовательности нуклеотидов методом Сенгера количество мутантной ДНК в образце должно составлять по меньшей мере 20–25%. В большинстве случаев участок опухолевой ткани невозможно отделить от нормальной ткани и участков воспалительной инфильтрации, что в процессе секвенирования может привести к ложноотрицательным результатам. ПЦР в режиме реального времени является высокочувствительным и специфичным методом, который позволяет определить наличие 5% мутантной ДНК в опухоли, что гораздо выше чувствительности секвенирования ДНК по Сенгеру.

**Клиническое значение.** Наличие мутации в гене *KRAS* (gly12asp, gly12ala, gly12arg, gly12val, gly12ser, gly12cys, gly13asp) — положительный результат, который считается неблагоприятным прогнозом при онкопатологии. Проведение лечебных мероприятий требует персонализированного подхода. Наличие в опухолевых клетках активирующих мутаций гена *KRAS* является главным противопоказанием к применению лекарственных препаратов — ингибиторов EGFR [эрлотиниб (Тарцева<sup>▲</sup>), цетуксимаб (Эрбитукс<sup>▲</sup>), гефитиниб (Иресса<sup>▲</sup>), панитумумаб (Вектибикс<sup>▲</sup>)].

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

**Мутации в гене *NRAS*.** Ген *NRAS* кодирует внутриклеточные белки сигнальных путей RAS-MAPK и RAS-MEK-ERK, контролирующие пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы. Активирующие соматические мутации гена *NRAS* приводят к постоянной гиперактивации внутриклеточных сигнальных путей. Наиболее часто встречаются мутации 61-го кодона гена *NRAS*, более редко — мутации 12-го и 13-го кодонов. Совокупно мутации в 12, 13 и 61-м кодонах гена *NRAS* составляют 90% всех мутаций, или 99% клинически значимых мутаций этого гена. Мутации *NRAS* могут быть обнаружены при разных типах рака. Наиболее распространенные виды рака, связанные с мутациями *NRAS*: меланома (около 15–20% меланом содержат мутации *NRAS*); колоректальный рак (2–5% случаев колоректального рака, наиболее распространенной из которых является аденокарцинома); ОМЛ (около 10–15% случаев ОМЛ имеют мутации *NRAS*), рак ЩЖ (редко); *рак легкого* (менее распространены, чем другие мутации); *рак яичников* (относительно редки при этом типе рака).

Диагностика мутаций в гене *NRAS* проводится для прогнозирования течения заболевания и выбора терапии при меланоме, колоректальном раке, ОМЛ. Регулярное тестирование на мутации *NRAS* может использоваться для отслеживания ответа на лечение и раннего выявления рецидивов. Это позволяет своевременно корректировать терапию.

**Клиническое значение.** Результат одного исследования не может служить достаточным основанием для постановки диагноза или назначения лечения. Решение об этом должен принимать лечащий врач на основании всех имеющихся у него данных клинического, лабораторного, инструментального обследования.

*NRAS* принадлежит к классу онкогенов, это означает, что мутации данного гена могут спровоцировать запуск злокачественной патологии. Он находится в семействе онкогенов Ras, в котором, кроме него, еще три гена: *KRAS*, *HRAS* и *RIT1*. Эти белки играют важную роль в делении, дифференцировке (развитии) и саморазрушении клеток (апоптозе).

Две мутации в гене *NRAS* вызывают гигантский врожденный меланоцитарный невус. Это состояние характеризуется большим неопухолевидным участком аномально темной кожи, который присутствует с рождения, связан с повышенным риском развития меланомы. Мутации в *NRAS*, вызывающие это состояние, являются соматическими, присутствуют только в определенных клетках и не передаются по наследству. Данные мутации происходят во время эмбрионального развития в клетках, которые в дальнейшем дифференцируются в пигментпродуцирующие клетки кожи (меланоциты). Мутации, которые вызывают это заболевание, влияют на единичную аминокислоту в белке *NRAS*. В частности, они заменяют аминокислотный глутамин в положении 61 либо лизином, либо аргинином (Gln61Lys, или Q61K и Gln61Arg, или Q61R) и приводят к образованию белка *NRAS*, который постоянно включается (конститутивно активен). Вместо того чтобы запускать рост клеток в ответ на определенные сигналы извне, сверхактивный белок направляет клетки к росту и делению постоянно. Неконтролируемый рост клеток ранних меланоцитов приводит к большому участку темно-пигментированной кожи, характерной для гигантского врожденного меланоцитарного невуса. Гигантский врожденный меланоцитарный невус встречается примерно у 1 из 20 000 новорожденных по всему миру. Невус может быть небольшим у младенцев, но он, как правило, растет с той же скоростью, что и тело.

Люди с гигантским врожденным меланоцитарным невусом имеют риск развития меланомы на 5–10% больше, чем лица без этого заболевания, и при этом меньшую выживаемость. Другие типы опухолей также могут развиваться у лиц с гигантским врожденным меланоцитарным невусом, включая опухоли мягких тканей (саркомы), жировые опухоли (липомы) и опухоли нервных клеток (шванномы). Мутации гена *NRAS* распространены при агрессивной меланоме, включая людей без гигантского врожденного меланоцитарного невуса. Иногда они вызывают кератиноцитарный эпидермальный невус.

Мутации в гене *NRAS* были обнаружены при аутоиммунном лимфопролиферативном синдроме (ALPS), синдроме Нуна, могут вместе с другими генами увеличивать риск развития рака легких.

Для комплексной диагностики в дополнение к диагностике на мутации *NRAS* часто используют диагностику мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*: эти гены часто анализируются вместе с *NRAS*, так как они также играют ключевую роль в сигнальном пути MAPK/ERK, который часто изменен в опухолях.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.4.4. Определение микросателлитной нестабильности

Микросателлитная нестабильность (MSI) характеризует генетическую изменчивость опухолей, которая развивается вследствие сбоя репарации ДНК. MSI является важным биомаркером в онкологии, так как ассоциируется с определенными типами рака, включая рак толстой кишки. Опухоли с MSI — это особый подтип злокачественных новообразований, характеризующийся высокой чувствительностью к ингибиторам контрольных точек иммунитета, они чувствительны к иммунотерапии, важна их идентификация в выборе оптимального лечения, имеют благоприятный прогноз. Согласно клиническим рекомендациям МЗ РФ, оценка статуса MSI рекомендована пациентам с колоректальным и эндометриальным раком для определения прогноза, тактики лечения, повышения выявляемости пациентов с синдромом Линча. Чрезвычайно важно исследовать MSI при аденокарциномах желудка и толстой кишки на биопсийном материале до принятия решения о назначении химиотерапии. Особенно это значимо для рака желудка, когда назначение предоперационной химиотерапии необходимо начинать с 1b-стадии, и выявления пациентов, которым химиотерапия противопоказана.

Микросателлитом, или микросателлитным локусом, называют участок ДНК, расположенный в конкретной хромосоме и содержащий короткие tandemные повторы. Микросателлитные локусы [короткие tandemные повторы (STR), или простые повторяющиеся последовательности (SSR)] — короткие некодирующие последовательности ДНК длиной 1–6 нуклеотидов, повторяющиеся до нескольких десятков раз. В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотидными повторами. Микросателлиты расположены в основном вблизи концов хромосом, преимущественно в некодирующих регионах. Каждый микросателлит состоит из двух частей: центральной и периферической, при этом специфичность микросателлита в основном обусловлена изменением количества повторов в центральной части.

**Определение MSI** в лабораторной диагностике широко проводится двумя методами определения дефектов в работе системы репарации неспаренных оснований — ИГХ и ПЦР-РВ.

**ИГХ** использует антитела для обнаружения экспрессии белков микросателлитов (MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2) в опухолевых клетках. Отсутствие экспрессии одного или нескольких белков MMR указывает на MSI. ИГХ используется для скрининга на MSI, особенно при колоректальном и эндометриальном раке.

**ПЦР-РВ** использует флуоресцентные зонды для амплификации и количественного определения микросателлитных маркеров. Различия в длине ампликонов между опухолевой ДНК и контрольной ДНК указывают на MSI.

Приняты следующие результаты оценки статуса MSI:

- MSI-стабильный/MSI-S — нет локусов с нестабильностью;
- MSI-низкий/MSI-L;
- MSI-высокий (нестабильный)/MSI-H.

Методы ИГХ и ПЦР обладают примерно одинаковой ДС и ДЧ при выявлении MSI-H опухолей. Обоим присуща частота ложноотрицательных результатов 5–10%. При этом ИГХ отличают низкая стоимость, простота и легкая воспроизводимость методики, анализ можно провести достаточно быстро. Самое главное, ИГХ позволяет определить причинно-значимый ген. Однако существенным недостатком методики является фоновое окрашивание нормальной ткани, которое обуславливает трудности при подсчете. Нельзя приравнивать результат, полученный с помощью ИГХ, к результату, полученному с помощью ПЦР. С помощью ИГХ оценивают наличие или отсутствие экспрессии белка системы MSI, в то время как с помощью ПЦР — дисфункцию этой системы, ее неспособность найти и исправить ошибку в последовательности ДНК. Иногда могут возникать расхождения между этими двумя методами, когда экспрессия белков уже функционирует некорректно: она еще не выявляется с помощью ИГХ, поэтому опухоль относят к стабильным, а ПЦР уже обнаруживает MSI, так как оценивает дисфункцию генов, и опухоль является нестабильной. В рутинной диагностике сочетанное использование обоих методов имеет смысл только в том случае, когда есть расхождения между полученным результатом теста и клинической картиной.

**Клиническое значение.** Выявление MSI имеет значение не только для диагностики, но и для определения тактики лечения рака. Опухоли с высокой степенью MSI часто хорошо реагируют на таргетную терапию, которая нацелена на конкретные генетические изменения в раковых клетках. Основными таргетными препаратами для лечения MSI-высоких опухолей являются ингибиторы рецептора PD-1 *пембролизумаб* и *ниволумаб*. Они помогают иммунной системе распознавать и уничтожать раковые клетки. Выявление MSI помогает оценить чувствительность опухолей к:

- *5-фторурацилу* — препарату, который используется для лечения разных видов рака, включая колоректальный рак и рак МЖ;
- алкилирующим агентам — группе препаратов, которые повреждают ДНК раковых клеток, вызывая их гибель;
- производным платины — повреждают ДНК раковых клеток, используются для лечения различных видов рака.

Исследование MSI позволяет врачам выбрать наиболее эффективное лечение для каждого конкретного пациента, что увеличивает шансы на успешный исход. Таргетная терапия и другие препараты, к которым чувствительны MSI-высокие опухоли, могут помочь контролировать рост опухоли, продлить и улучшить качество жизни пациентов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.5. Методы флуоресцентной гибридизации в диагностике опухолей

FISH используют для выявления специфических последовательностей в образце ткани. В последнем случае метод FISH позволяет установить особенности экспрессии генов в клетках и тканях. Объектом исследования при этом является гистологический материал в парафиновом блоке.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.5.1. Оценка рецептора эпидермального фактора роста человека 2

Ген человека *ERBB2* кодирует HER2 (или HER2neu) — это мембранный белок, тирозинкиназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста *EGFR/ErbB*. Амплификация гена *ERBB2* приводит к повышению рецептора на клеточной мембране примерно с 20 000 в нормальной клетке до 2 300 000 в опухоли, что вызывает самоактивацию и активацию нескольких сигнальных путей (PI3K/AKT/mTOR, MAPK, STAT, Scr), играющих важную роль в росте, делении и выживании клеток. В норме ген *HER2* активируется лигандами, такими как эпидермальный фактор роста (EGF) и нейрегулин-1 (NRG1), которые связываются с рецепторами HER2 на поверхности клетки. Связывание лиганда с рецептором HER2 активирует внутриклеточные сигнальные пути, которые передают сигнал в ядро, где регулируется экспрессия генов, связанных с ростом, делением и выживанием клетки. Мутации гена *ERBB2* могут привести к постоянной активации HER2, даже без лиганда. В свою очередь, неконтролируемая активация HER2 может привести к развитию рака.

В РФ тестирование на *HER2* указано в официальных клинических рекомендациях для следующих типов рака.

- Рак МЖ (Международная классификация болезней 10-го пересмотра: C50). Рекомендации подчеркивают необходимость тестирования на *HER2* для всех случаев инвазивного рака МЖ.
- Рак желудка (Международная классификация болезней 10-го пересмотра: C16). В рекомендациях для рака желудка указано, что тестирование на *HER2* рекомендуется для пациентов с аденокарциномой, особенно при метастатическом или локально-распространенном заболевании.

**Биоматериал для исследований.** Использование гистологических материалов для детекции *HER2* методом FISH является предпочтительным выбором благодаря удобству хранения и обработки, а также возможности проведения комплексного анализа на одних и тех же тканевых срезах. Фиксированные формальдегидом (Формалином<sup>†</sup>) парафиновые блоки являются стандартом для FISH благодаря их способности обеспечивать долгосрочную стабильность и сохранность морфологической структуры тканей.

**Цитологический материал** может быть представлен окрашенными гистологическими стеклами (только предметные стекла, без покровных), цитологическими блоками (цитоблоками), цитоспинами. Не принимаются на анализ БАЛ, смывы, мокрота в необработанном (жидком) виде. Материал на стеклах должен содержать не менее 200 опухолевых клеток; доля опухолевых клеток среди всех клеток образца — не менее 30%. Если эти условия не удается соблюсти в препарате на одном цитологическом стекле, то рекомендуется направить на анализ два и более стекла данного пациента. К препарату должны быть приложены комментарии цитолога о количестве и проценте опухолевых клеток на стекле. Фиксация и окраска препарата не препятствуют осуществлению теста, когда они проведены согласно установленным технологиям и выполнены без нарушений, ведущих к деградации генетического материала.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.5.2. Определение транслокации гена ALK

Белок ALK, кодируемый геном *ALK*, — инсулинзависимый мембранный рецептор, содержащий внутриклеточный тирозинкиназный домен. В норме он активно экспрессируется в нервной ткани только во время эмбриогенеза, регулируя пролиферацию нейронов. Этот ген играет важную роль в развитии мозга. При передаче сигнала с помощью рецепторной тирозинкиназы ALK активируются сигнальные пути PI3K/ERK и RAS/MAPK. Эти сигнальные пути входят в состав основных путей передачи митогенных сигналов в клетке.

Перестройки, мутации, амплификации гена *ALK* были найдены в различных типах раковых опухолей, включая НМРЛ, нейробластому и анапластическую крупноклеточную лимфому. Ген *ALK* может быть онкогенным тремя способами — путем образования гена слияния с любым из нескольких других генов, путем получения дополнительных копий гена или с мутациями фактического кода ДНК самого гена.

**Транслокация гена ALK** — это внутриврохромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча 2-й хромосомы, ведущая к образованию химерного онкогена *EML4/ALK*.

Цель тестирования перестроек гена *ALK* методом FISH заключается в идентификации генетических аномалий в гене *ALK*, чтобы определить подходящую таргетную терапию для пациентов с НМРЛ и другими заболеваниями, где такие перестройки имеют терапевтическое значение. Тест на наличие транслокации гена *ALK* показан больным распространенным НМРЛ с отрицательным статусом EGFR-мутации для отбора пациентов на таргетную терапию. Частота встречаемости транслокации *ALK* составляет около 5% с разбросом в разных исследованиях от 3 до 13%, что связано с особенностями анализируемых выборок и популяционными различиями. Прослеживается четкая ассоциация транслокации *EML4/ALK* со следующими характеристиками опухоли и больного:

- гистологически — аденокарцинома, более 94%;
- отсутствие конкурирующих мутаций (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*);
- некурящие, более 67%.

Все клинические рекомендации говорят о необходимости исследовать наличие транслокации гена *ALK* у всех пациентов с распространенным неплоскоклеточным НМРЛ вне зависимости от пола, национальности и статуса курения. Ограничение по этим параметрам может привести к потере до 50% пациентов с транслокацией.

Для определения перестроек гена *ALK* методом FISH используются двойные зонды, созданные для идентификации перестроек в гене *ALK*. Эти зонды состоят из пары флюоресцентно меченных ДНК-проб, каждая из которых нацелена

на разные части гена *ALK*, расположенного на коротком плече хромосомы 2 в локусе 2p23. Проба представляет собой два флюоресцентных зонда, конъюгированных с красителями разного цвета (оранжевым и зеленым) и комплементарных расположенным рядом последовательностям гена *ALK*. В норме оба зонда гибридизуются рядом и формируют сигнал желтого цвета или расположенные вплотную два сигнала красного и зеленого цвета. При перестройке гена и перемещении одной из его последовательностей сигналы расходятся и видны как лежащие раздельно. Такая методика позволяет распознать все виды перестройки гена *ALK* вне зависимости от партнера транслокации, что и является ее основным преимуществом. Недостатки метода — его высокая стоимость и высокие требования к качеству образца и количеству опухолевых клеток в нем, поскольку для получения достоверного результата необходимо просмотреть не менее 50 ядер. Преимущество метода FISH заключается в возможности распознавать практически все виды перестроек гена *ALK*, пригодности для исследования архивных блоков, цитологических препаратов, отпечатков.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.5.3. Определение перестройки гена *ROS1*

Онкоген *ROS1* (протоонкогенный белок, рецептор тирозинкиназы) кодирует рецепторную тирозинкиназу, родственную киназе анапластической лимфомы (*ALK*). *ALK* и *ROS1* отвечают за синтез взаимосвязанных тирозинкиназ. Химерный ген *ROS1*, образующийся в результате перестройки (реаранжировки) хромосом, содержит несколько различных генов-партнеров. Несмотря на вариативность генов-партнеров химерного гена *ROS1* (*SDC4*, *EZR*, *CD74*, *CCDC6*, *TPM3*, *LRIG3*, *KDELR2* и др.), он имеет консервативные точки разрыва, обеспечивающие сохранение интактности тирозинкиназного домена. Наиболее часто в качестве партнера слияния при *ROS1*-положительном НМРЛ выступает ген *CD74* (в 40–45% случаев) (Gainor J.F., Davies K.D., Park S.).

Активация тирозинкиназного домена приводит к неконтролируемой пролиферации клеток и ингибированию апоптоза, что является основой развития *ROS1*-положительного НМРЛ. Важно отметить, что мутации в тирозинкиназном домене *ROS1*, а также некоторые варианты транслокаций могут приводить к снижению чувствительности опухоли к таргетной терапии. В настоящее время ингибиторы тирозинкиназы *ROS* демонстрируют высокую эффективность в лечении *ROS1*-положительного НМРЛ.

Для более точной диагностики и выбора оптимальной терапевтической стратегии необходимо проводить молекулярно-генетическое исследование опухолевой ткани на наличие транслокаций гена *ROS1*.

*ROS1*-положительный НМРЛ — это редкий подтип рака. Перестройка *ROS1* обнаруживается у 0,9–2,6% людей с НМРЛ. Чаще всего *ROS1*-положительный НМРЛ развивается в аденокарциноме легкого, особенно у людей молодого возраста, некурящих или никогда не куривших. FISH является «золотым стандартом» диагностики перегруппировок *ROS1*. Для FISH-анализа перестроек гена *ROS1* используется конструкция пробы (зонда) разделения с двумя зондами (3' и 5'), что может обнаруживать ≥50 опухолевых клеток; результат считается положительным, если более 15% клеток демонстрируют разделение 3'- и 5'-зондов или отдельные 3'-сигналы. FISH-анализ гена *ROS1* позволяет провести точную молекулярно-цитогенетическую диагностику НМРЛ, обусловленного реаранжировками гена *ROS1*, с целью стратификации пациентов по риску прогрессирования и подбора таргетной терапии, основанной на ингибиторах тирозинкиназы *ROS1*.

**Локализация гена (фрагмента) в геноме.** Ген *ROS1* (ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase) находится на 6-й хромосоме человека в локусе 6q23.3. Он кодирует белок, состоящий из 31 экзона и простирающийся на около 200 000 пар оснований. Важно отметить, что точное местоположение точки разрыва хромосомы, приводящей к образованию химерного гена *ROS1*, может отличаться в зависимости от конкретного случая.

**Биоматериал для исследований.** Требования к материалу включают: операционный и биопсийный материал (первичную опухоль или метастазы), залитый в парафин; цитоблоки. Производится фиксация материала 10% нейтральным формальдегидом (Формалином<sup>▲</sup>) в течение 6–72 ч. Длительная холодовая ишемия приводит к значительному снижению качества реакции. Белок *ALK* более чувствителен к преаналитическому этапу, чем другие маркеры рака легкого. Фиксация менее 6 ч недопустима. Время хранения готовых срезов — не более 3 мес в условиях комнатной температуры.

Методология проведения FISH для генов *ROS1* и *ALK* схожа, основное различие заключается в используемых ДНК-пробах (зондах) и специфичности интерпретации результатов согласно инструкции производителя наборов. Для тестирования перестроек *ROS1* методом FISH используются специфические ДНК-зонды, которые позволяют выявить наличие генетических изменений на уровне хромосом. В методе FISH для выявления перестроек гена *ROS1* применяются так называемые break-apart-зонды, состоящие из двух флюоресцентно меченных последовательностей ДНК, которые связываются с разными частями гена *ROS1*; у разных производителей наборов мечение 3'конца и 5'конца гена *ROS1* может отличаться. Поэтому для точной диагностики обязательным условием является изучение инструкции к конкретной пробе. Например, ДНК-зонд для определения перестроек гена *ROS1*, при этом 6q22 *ROS1* (Cen) Spectrum Green — этот зонд связывается с центромерной частью гена *ROS1* и окрашен зеленой меткой; 6q22 *ROS1* (Tel) Spectrum Orange — этот зонд связывается с теломерной (концевой) частью гена *ROS1* и окрашен оранжевой/красной меткой. Анализ: образцы анализируются под флюоресцентным микроскопом. Нормальные клетки показывают перекрытие зеленого и оранжевого сигналов (желтый цвет — fusion), тогда как разделенные сигналы (зеленый и оранжевый по отдельности) указывают на перестройку гена *ROS1*.

**Интерпретация результата (применение результатов для ведения пациента).** При проведении FISH-анализа для выявления перестроек гена *ROS1* используются следующие инструкции и критерии интерпретации результатов.

1. Количество оцениваемых клеток. Необходимо проанализировать минимум 50 интерфазных ядерных клеток. Это обеспечивает статистическую значимость результатов и минимизирует вероятность ошибки.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

2. Пороговый процент. Пороговым значением для положительного результата является наличие разделенных сигналов в 15% и более оцененных клеток. Разделение сигналов зеленого (центромерного) и оранжевого (теломерного) зондов на расстояние, превышающее один диаметр сигнала, указывает на наличие перестройки гена *ROS1*.

3. Пограничные значения (менее 25%). Если процент клеток с разделенными сигналами составляет менее 25%, но более 15%, результат считается пограничным. В этом случае рекомендуется проведение повторного анализа для подтверждения результатов, привлечение к выполнению тестирования образца второго специалиста, возможно проведение дополнительного тестирования и рассмотрение полученных результатов.

4. Отрицательный результат. Если процент клеток с разделенными сигналами составляет менее 15%, результат теста считается отрицательным, что указывает на отсутствие перестройки гена *ROS1*. Тестирование на перестройку гена *ROS1* методом FISH имеет большое клиническое значение для пациентов с НМРЛ. Положительный результат теста может означать чувствительность опухоли к ингибиторам тирозинкиназы, что может существенно повлиять на выбор терапии и прогноз пациента.

Примеры сигналов.

- Нормальный паттерн: перекрывающиеся сигналы зеленого и оранжевого цвета, которые видны как желтые точки, указывают на отсутствие перестроек.
- Перестроенный паттерн: отдельные зеленые и оранжевые сигналы, разделенные на расстояние более одного диаметра сигнала, указывают на наличие перестройки.
- Реже встречаются перестройки гена *ROS1* с делецией красного штрих-конца от гена *ROS1* (теломерной части гена), при этом сохраняются не менее одного сигнала с перекрывающимися сигналами (fusion) и зеленый сигнал от центромерной части локуса гена *ROS1*.

**Преимущества и ограничения метода.** На тестирование реаранжировки гена *ROS1* методом FISH влияет качество образцов: образцы тканей должны быть надлежащего качества и подготовлены в соответствии с установленными протоколами. Также большое значение имеет квалификация персонала. При пограничных значениях рекомендуется повторное тестирование или использование дополнительных методов диагностики.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.5.4. Определение мутаций гена *MYC*

Ген *MYC*, или *c-MYC* (myelocytomatosis viral oncogene homolog), расположен на хромосоме 8 в регионе 8q24.21. Кодированный этим геном белок *MYC* имеет  $\alpha$ -спиральную многодоменную структуру, в которой выделены участки связывания с ДНК и другими белками. *MYC* имеет рецептор ядерной локализации, за счет чего он всегда находится в клеточном ядре. В составе функционально активного белка также имеется специальный домен, который позволяет *MYC* образовывать как гомодимеры (*MYC/MYC*), так и гетеродимеры (например, *MYC/MAX*). Для нормального функционирования белок *MYC* должен быть фосфорилирован. В норме этот белок присутствует в клетках всех типов тканей, где осуществляет регуляторные функции. Основная функция *MYC* — модуляция экспрессии генов. Считается, что под непосредственным контролем *MYC* находится экспрессия около 15% всего человеческого генома. В нетрансформированных клетках *MYC* участвует практически во всех каскадах, передающих пролиферативные или антипролиферативные сигналы. Ген *MYC* является геном раннего ответа на воздействие митогенов, активация его экспрессии необходима и достаточна для вхождения клетки в S-фазу клеточного цикла (G1/S). Кроме того, *MYC* играет важную роль при переходе клетки из G2- в M-фазу клеточного цикла. Как *c-MYC*, мРНК, так и считываемый с нее белок характеризуются коротким временем жизни (примерно 0,5–1 ч), что, вероятно, необходимо для быстрой и точной регуляции экспрессии данного гена.

Онкогенные свойства *MYC* сбалансированы его способностью вызывать апоптоз. Ген *c-MYC* кодирует белок *MYC*, отвечающий за транскрипцию — процесс, необходимый для правильной «работы» и деления клеток. При перестройке гена *MYC* запускается процесс избыточного образования белка *MYC*. Клетки, в которых произошла такая перестройка, начинают бесконтрольно делиться и затем превращаются в опухоль.

Определение мутаций гена *MYC* используется для точной диагностики и выбора оптимальной терапевтической стратегии при лимфомах. Прямым показанием к исследованию являются лимфомы Беркитта (С83.7) и другие неходжкинские лимфомы в рамках комплексной диагностики диффузной В-крупноклеточной лимфомы (С88).

Пробами для FISH являются 1–2 мл костного мозга; 5–10 мл крови; 0,5–1,0 см<sup>2</sup> биопсийного материала (костная сердцевина; ЛУ) или фиксированные в формальдегиде (Формалине<sup>▲</sup>) парафинизированные образцы.

Принцип метода заключается в гибридизации — связывании ДНК-зонда (*c-MYC/8q24.21*) с хромосомной ДНК исследуемого образца пациента. Зонд представляет собой небольшой фрагмент ДНК, помеченный флюоресцентным красителем, который связывается с участком q24.21 8 хромосомы. Далее образцы исследуются с помощью флюоресцентной микроскопии при использовании подходящих для зондов светофильтров.

Для тестирования реаранжировок гена *c-MYC/8q24.21* методом FISH используются специфические ДНК-зонды, которые позволяют выявить наличие генетических изменений на уровне хромосом. В методе FISH для выявления перестроек гена *c-MYC/8q24.21* применяются так называемые break-apart-зонды, состоящие из двух флюоресцентно меченных последовательностей ДНК, которые связываются с разными частями гена *MYC*; у разных производителей наборов мечение 3'конца и 5'конца гена *MYC* может отличаться. Поэтому для точной диагностики обязательным

условием является изучение инструкции к конкретной пробе. Образцы анализируются под флюоресцентным микроскопом.

В нормальных клетках будут видны два слитных красно-зеленых сигнала. В аберрантной диплоидной клетке, где одна хромосома из пары вовлечена в транслокацию, будут видны два отдельных красных и зеленых сигнала в дополнение к одному слитному. В наборе (break-apart-зонд *c-MYC/8q24.21*) используется технология FISH для обнаружения перестройки гена *c-MYC*, набор нельзя использовать для обнаружения других генных мутаций.

Агрессивные В-клеточные лимфомы, включая такие диагнозы ВОЗ, как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с реаранжировками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности и лимфома Беркитта вместе составляют примерно 40% В-клеточных неходжкинских лимфом. Идентификация перестроек *MYC*, *MYC/IGH*, *BCL2* и *BCL6* в этих новообразованиях имеет решающее значение для диагностических, прогностических и терапевтических целей. Скрининг только с помощью *MYC*-зонда на разрыв слитного сигнала (FISH) является широко используемым методом при лимфомах, полагают, что дорогостоящие зонды следует использовать только в том случае, если *MYC*-проба на разрыв показывает положительный результат.

Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

9.6. Генетические исследования в репродуктивной медицине и неонатологии

Генетические исследования стали широко применяться для оценки рисков репродуктивных проблем в процессе подготовки к беременности и на всех ее этапах. Генетическое тестирование будущих родителей позволяет выявить бессимптомное носительство мутаций, которые могут проявиться у детей, а также оценить риски развития осложнений при беременности и выявить возможные факторы бесплодия. Во время беременности возможно раннее определение пола и Rh плода по крови матери, а также проведение скрининга на анеуплоидии и другие хромосомные аномалии. Современные молекулярно-генетические методы позволяют проводить преимплантационное генетическое тестирование — выявление хромосомных аномалий в единичных клетках эмбриона до имплантации при проведении вспомогательных репродуктивных технологий. Генетические исследования применяются и в неонатальном скрининге для своевременного выявления заболеваний и раннего назначения соответствующего лечения.

Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

9.6.1. Прегравидарная подготовка

Прегравидарная подготовка на этапе планирования беременности позволяет у будущих родителей выявить мутации, которые могут проявиться у детей, и полиморфизмы, влияющие на течение беременности. Это особенно важно в случае наличия семейного анамнеза наследственных заболеваний. Метод ПЦР-РВ широко используется в рутинной практике. В качестве биоматериала для генетических исследований используются венозная кровь, сухие пятна крови и буккальные соскобы.

**Определение полиморфизмов генов, ассоциированных с нарушениями свертывающей системы крови.**

Беременность и послеродовой период являются физиологическими состояниями гиперкоагуляции, поскольку в этот период происходит смещение баланса между про- и антикоагуляционными факторами. Повышенные уровни эстрогена и прогестерона приводят к повышению концентрации фибриногена и факторов свертывания VII, VIII, IX, X и XII и снижению уровня антикоагулянтов. Эти изменения позволяют снизить риск кровотечения при родах, но повышают риск развития венозных тромбоэмболических осложнений, который сохраняется и в первые 6 нед послеродового периода. Наследственная тромбофилия представляет один из факторов риска репродуктивных нарушений. Не менее половины венозных тромбоэмболических осложнений происходит в первых двух триместрах беременности, что подчеркивает важность раннего консультирования и оценке факторов риска на ранних сроках беременности у всех женщин. К наследственным факторам риска относятся генетические мутации, аномалии и дефекты факторов свертывания крови: Лейденская мутация фактора V, дефициты AT, протеинов C и S, мутация G20210A гена протромбина. Провести диагностику генетических факторов развития тромбофилии возможно в любое время независимо от приема антикоагулянтных препаратов, наличия у пациента острого тромбоза и различной сопутствующей патологии. Показания к проведению молекулярно-генетического исследования полиморфизмов, ассоциированных с риском развития тромбофилии:

- планирование беременности, если у женщины или в семье были случаи тромбозов в молодом возрасте без большого провоцирующего фактора (операция, травма);
- осложненный акушерский анамнез;
- применение гормональной контрацепции или гормональной заместительной терапии у женщин, имеющих тромбозы в анамнезе или семейный анамнез тромбозов.

**Генетические факторы риска развития тромбофилий** связаны с дефектами генов *F2, F5, F7, F13, FGB*, в сосудисто-тромбоцитарном звене — с генами *ITGA2, ITGB3*, в системе фибринолиза — с геном *PAI-1*. Генетический анализ позволяет выявить полиморфизмы генов факторов и компонентов системы гемостаза, которые приводят к их аномальному синтезу или нарушению функциональной активности (табл. 9.5).

**Таблица 9.5.** Наследственные геномные полиморфизмы, приводящие к возможным функциональным изменениям белков системы гемостаза

Причины тромбофилии	Ген	Белковый продукт	Полиморфизм	Клиническое значение
---------------------	-----	------------------	-------------	----------------------



Дефицит или аномалии плазменных факторов свертывания крови	<i>F2</i>	Протромбин	20210 G > A	При активации превращается в тромбин
	<i>F5</i>	Фактор V Лейдена	1691 G > A	Участвует в превращении протромбина в тромбин
	<i>F7</i>	Фактор VII	10976 G > A	Активирует фактор X, запускает каскад свертывания крови
	<i>F13</i>	Коагуляционный фактор XIII	G > T	Участвует в образовании фибрина и стабилизирует фибриновый сгусток
	<i>FGB</i>	Фибриноген, $\alpha$ -субъединица	–455 G > A	Под действием тромбина превращается в нерастворимый фибрин
Нарушения системы фибринолиза	<i>PAI-1</i>	PAI-1	–675 5G > 4G	Ингибитор фибринолиза
Нарушение тромбоцитарного звена гемостаза	<i>ITGA2</i>	Гликопротеин Ia	807 C > T	Опосредует адгезию тромбоцитов к внеклеточному матриксу
	<i>ITGB3</i>	Интегрин $\alpha$ -3	1565 T > C	Участвует в агрегации тромбоцитов

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Примечание. К тромбофилии умеренного риска относят генетические варианты генов *F2*, *F5* в указанных позициях. Остальные полиморфизмы могут быть исследованы, но трактовка результатов неоднозначна. Вероятно, наиболее значим для акушерской патологии *PAI-1* 4G/5G и 4G/4G. Однако дискуссии на эту тему продолжаются.

**Определение полиморфизмов в генах, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла.** Одним из важных аспектов подготовки к беременности является прием фолиевой кислоты. Ее соединения важны для нормальной беременности, включая антиоксидантную защиту, ангиогенез и эндотелиально-зависимую сосудистую релаксацию, что определяет развитие хориона и плаценты, плацентарное кровообращение, обеспечение роста и развития плода. Низкий уровень фолиевой кислоты во время беременности может увеличить вероятность развития преэклампсии и является потенциальной причиной возникновения дефектов нервной трубки.

Дефицит фолиевой кислоты в большинстве случаев возникает из-за недостаточного поступления с пищей, однако он может быть ассоциирован с генетическими дефектами в генах ферментов метаболизма фолатов.

Фолатный цикл — каскадный процесс превращения фолиевой кислоты в доступное для усваивания организмом производное — 5-метилтетрагидрофолат. Процесс контролируется ферментом *MTHFR*. С фолатным циклом сопряжен цикл образования метионина из гомоцистеина, который происходит при участии витамина  $B_{12}$  и двух ферментов: метионинсинтазы (*MTR*) и метионинсинтаза-редуктазы (*MTRR*). *MTR* обеспечивает превращение гомоцистеина в метионин, для поддержания активности фермента необходимо восстановительное метилирование с помощью фермента *MTRR*.

К наиболее распространенным мутациям, влияющим на фолатный обмен, относятся мутации в гене *MTHFR*: C677T и A1298C. Генотип *MTHFR* 677TT имеет распространенность до 15–20% в некоторых популяциях, и метаанализ подтверждает его связь с пониженным уровнем фолиевой кислоты в сыворотке, повышенным уровнем гомоцистеина и отсутствием ответа на краткосрочное добавление фолиевой кислоты. У лиц с генотипом 677TT активность фермента *MTHFR* примерно на 30% ниже, чем у лиц с генотипом 677CC, тогда как у гетерозигот 677CT активность фермента составляет около 65%. Двойная гетерозиготность по полиморфизмам 677C > T и 1298A > C *MTHFR* приводит к более низкой активности *MTHFR* по сравнению с гетерозиготностью по каждому варианту *MTHFR* по отдельности. Полиморфизмы C677T гена *MTHFR*, A1298C гена *MTHFR* и A66G гена *MTRR* ассоциированы с повышением риска дефектов нервной трубки. При генетически обусловленных дефектах фолатного цикла профилактической терапии фолиевой кислотой может быть недостаточно для коррекции фолатдефицитных состояний. При наличии мутаций в гене *MTHFR* следует делать выбор в пользу добавок, содержащих активную форму — 5-тетраметилгидрофолат. Показания к проведению молекулярно-генетического исследования полиморфизмов генов метаболизма фолатов:

- невынашивание беременности;
- рождение ребенка с пороками развития.

Генетический анализ позволяет выявить полиморфизмы генов фолатного цикла (табл. 9.6).

**Таблица 9.6.** Геномные полиморфизмы фолатного цикла

Ген	Белковый продукт	Полиморфизм	Роль в метаболизме фолатов
<i>MTHFR</i>	Метилентетрагидро-фолат-редуктаза	677 C > T (Ala222Val)	Превращение тетрагидрофолата в доступный для усвоения 5-метилтетрагидрофолат
		1298 A > C (Glu429Ala)	
<i>MTR</i>	$B_{12}$ -зависимая метионинсинтаза	2756 A > G (Asp919Gly)	Образование метионина из гомоцистеина

MTRR	Метионинсинтаза-редуктаза	66 A > G (Ile22Met)	Образование гомоцистеина в процессе восстановительного метилирования
------	---------------------------	---------------------	--

**Оценка мужского бесплодия путем определения делеций локуса AZF («фактора азооспермии»).** Мужское бесплодие — неспособность к зачатию ребенка после 12 мес регулярной половой жизни без использования методов контрацепции. Факторами, ассоциированными с развитием мужского бесплодия, являются генетические и эндокринные нарушения, инфекционно-воспалительные заболевания урогенитального тракта, нарушения эрекции или эякуляции, врожденные или приобретенные нарушения развития органов мочеполовой системы, злокачественные новообразования, иммунологические нарушения.

Основным методом оценки мужской фертильности является спермограмма, этот метод не позволяет установить конкретный этиологический фактор. Причиной нарушения сперматогенеза могут быть генетические дефекты. Согласно клиническим рекомендациям МЗ РФ «Мужское бесплодие» (2021), пациентам с азооспермией и олигозооспермией для выявления генетических дефектов рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование микроделеции локуса AZF Y-хромосомы. Локус AZF находится в области эухроматина длинного плеча Y-хромосомы, картирован на хромосомном сегменте Yq11.22-23 и включает гены, ответственные за образование и развитие сперматозоидов. Делеции локуса AZF по частоте встречаемости занимают второе место среди всех генетических причин мужского бесплодия (после нарушений кариотипа). Микроделеции локуса Y-хромосомы выявляются в 10–15% случаев азооспермии и в 5–10% случаев олигозооспермии тяжелой степени. Локус AZF содержит три субрегиона (AZFa, AZFb, AZFc), в каждом из которых локализованы гены, ответственные за сперматогенез (табл. 9.7).

Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Таблица 9.7. Структура локуса AZF

Субрегион	Гены	STS-маркеры	Тип азооспермии
AZFa	UTY, USP9Y, DBY	sY84, sY86, sY615	Синдром «только клетки Сертоли» 1-го типа
AZFb	RBMY	sY127, sY134, sY142, sY1197	Остановка мейоза, высокий риск синдрома «только клетки Сертоли», олигозооспермия
AZFc	Семейство DAZ	sY254, sY255, sY1291	Синдром «только клетки Сертоли» 2-го типа, олигозооспермия

Делеции в субрегионе AZFa составляют примерно 5% всех микроделеций Y-хромосомы. При делеции генов USP9Y и DBY возникает азооспермия с синдромом «только клетки Сертоли» 1-го типа, которая характеризуется полным отсутствием клеток сперматогенного ряда в семенных канальцах. Для повышения точности диагностики рекомендуется использовать как минимум два маркера — sY84 и sY86. Отсутствие обоих маркеров свидетельствует о полной делеции AZFa-субрегиона.

Делеции субрегиона AZFb составляют примерно 16% среди всех микроделеций Y-хромосомы. В данном субрегионе локализован высококопийный ген RBMY. При делеции одной или нескольких копий гена RBMY у пациентов развивается азооспермия или тяжелая олигозооспермия. В большинстве случаев при отсутствии sY127 и sY134 выявляется полная делеция субрегиона AZFb. У мужчин с отсутствием субрегиона AZFb наблюдаются тяжелые нарушения сперматогенеза с высоким риском развития синдрома «только клетки Сертоли».

Делеции субрегиона AZF составляют до 60% всех микроделеций Y-хромосомы. В этом субрегионе локализовано семейство генов DAZ (Deletedin Azoospermia — гены, делетированные при азооспермии). STS-маркеры sY254 и sY255 являются высокоспецифичными для делеции b2/b4 субрегиона AZFc, при которой происходит потеря всех копий гена DAZ. У пациентов может наблюдаться синдром «только клетки Сертоли» 2-го типа, характеризующийся присутствием незначительного числа клеток сперматогенного ряда в семенных канальцах.

В субрегионе AZFc описана gr/gr-делеция (маркер sY1291), при которой выпадает половина субрегиона AZFc. У носителей gr/gr-делеций в 7 раз повышен риск развития олигозооспермии, также есть данные, что наличие этой делеции повышает риск развития герминогенных опухолей яичка.

Среди микроделеций Y-хромосомы в 15% случаев встречаются микроделеции сразу нескольких субрегионов. Анализ состояния репродуктивной системы по показателям спермограммы подтвердил, что при наличии микроделеций, затрагивающих больше одного субрегиона, практически в 100% случаев наблюдаются азооспермия и синдром «только клетки Сертоли».

Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

**9.6.2. Генетический скрининг на моногенные заболевания**

Моногенные наследственные заболевания, характеризующиеся аутосомно-рецессивным характером наследования, такие как муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия, нейросенсорная несиндромальная тугоухость, имеют большое социальное и экономическое значение и оказывают существенное влияние на качество жизни больных и их родственников. У двух здоровых родителей, которые являются гетерозиготными носителями мутации, с вероятностью 25% может родиться ребенок, гомозиготный по рецессивному признаку. Частота встречаемости каждого из перечисленных заболеваний составляет от 1 на тысячу до 1 на 20 тысяч новорожденных. Традиционно считается, что первичная профилактика моногенных заболеваний невозможна.

В РФ с 2023 г. была введена программа расширенного неонатального скрининга, включающая 36 нозологий, в рамках которой проводится неонатальный биохимический скрининг на пять подобных заболеваний, включая муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию, также проводятся аудиометрический скрининг и оценка зрения у новорожденного. Данный подход позволяет выявлять заболевания на ранних стадиях и в ряде случаев назначать компенсирующее лечение (диеты), однако носители наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным характером наследования остаются вне поля зрения системы здравоохранения.

Генетический скрининг — иной подход к проблеме моногенных заболеваний. Носители рецессивных мутаций не имеют проявлений болезни и остаются вне поля зрения медицины, выявить их может только генетическое тестирование. Так, здоровые гетерозиготные носители, планирующие беременность, будут предупреждены о возможных рисках и будут иметь возможность воспользоваться вспомогательными репродуктивными технологиями. Внедрение в практику скрининга с применением молекулярно-генетических тест-систем, в том числе генетического неонатального скрининга и скрининга в ходе прегравидарной подготовки, может стать эффективным способом определения носительства моногенных заболеваний. Применение современных вспомогательных репродуктивных технологий, в свою очередь, может способствовать появлению здорового потомства у носителей наследственных заболеваний.

К наиболее значимым моногенным наследственным заболеваниям, характеризующимся аутосомно-рецессивным характером наследования, относятся муковисцидоз, галактоземия, фенилкетонурия и нейросенсорная несиндромальная тугоухость.

**Муковисцидоз или кистозный фиброз** — наследственное заболевание, связанное с нарушением ионного транспорта в эпителии и вызываемое мутациями в гене трансмембранного регулятора ионной проводимости (CFTR). Кодруемый этим геном белок функционирует как зависимый от циклического аденозинмонофосфата хлорный канал, встроенный в мембрану клетки. Муковисцидоз — тяжелое системное заболевание, при котором поражаются многие органы, особенно выделяющие слизистый секрет: верхние и нижние дыхательные пути, ПЖ, желчевыводящая система, кишечник, мужские половые органы, потовые железы. У некоторых больных при рождении возникает меконияльный илеус. У мужчин с муковисцидозом практически всегда отмечают азоосперию и бесплодие из-за двусторонней аплазии семявыносящего протока. Считается, что более 50% мужчин, страдающих бесплодием и имеющих азоосперию или олигозоосперию тяжелой степени, являются носителями мутаций в гене *CFTR*.

В зависимости от степени повреждения белка мутации гена *CFTR* подразделяют на классы (**табл. 9.8**). Наибольшие повреждения соответствуют мутациям I–III класса, приводящим к синтезу укороченного белка, нарушению его созревания (фолдинга) или нарушению ответа хлорного канала на стимуляцию циклическим аденозинмонофосфатом. Степень повреждения белка определяет тяжесть фенотипических проявлений заболевания. К фенотипически тяжелым относят мутации I–III класса. Случаи муковисцидоза, вызванные этими мутациями, чаще имеют тяжелое течение, характеризуются ранним развитием серьезных осложнений и внешнесекреторной недостаточностью ПЖ. Определение конкретных мутаций, в том числе фенотипически тяжелых мутаций, может являться основанием для коррекции тактики ведения пациентов.

**Таблица 9.8.** Классы мутаций в гене *CFTR* и их фенотипические проявления

Класс	Степень повреждения белка	Фенотипические проявления	Основные мутации
I	Синтез усеченного белка в результате сдвига рамки считывания, нонсенс мутаций	Преимущественно тяжелые	G542X, W1282X, R553X, 621+1C-T, 2143delT, 1677delTA
II	Нарушение созревания (фолдинга) белка		F508del, N1303K
III	Нарушение ответа хлорного канала на стимуляцию циклическим аденозинмонофосфатом		В России не зарегистрирован
IV	Снижение проводимости хлорного канала	Варьирующие/мягкие	R334W, R117H
V	Снижение количества функционально активного белка, нарушение транспорта белка к мембране клетки	Преимущественно мягкие	3849+10kbC-T

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

**Фенилкетонурия** — наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии фенилкетонурия сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов в организме, что приводит к тяжелому поражению ЦНС и нарушению умственного развития. В России частота рождения детей с фенилкетонурией составляет примерно один случай на 10 000 новорожденных. Заболевание связано с мутациями в гене *PAH*, кодирующем фенилаланингидроксилазу. Ген локализован на длинном плече хромосомы 12. На сегодняшний день в гене фенилаланингидроксилазы описано свыше 400 мутаций, частота и встречаемость которых характеризуются существенными межпопуляционными различиями, однако лишь несколько из них встречаются с частотой более 1%. Среди жителей России наиболее распространена миссенс-мутация в 12-м экзоне гена *PAH* — R408W.

**Нейросенсорная несиндромальная тугоухость** — наследственное заболевание, чаще всего встречается аутосомно-рецессивная нейросенсорная несиндромальная тугоухость, связанная с мутацией в гене *GJB*, кодирующем белок коннексин 26. Известно более 90 мутаций гена *GJB2*, ассоциированных с тугоухостью, однако для популяций России и Европы наиболее значимой является мутация 35delG, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона. Частота носительства мутации *GJB2*:35delG для некоторых российских популяций может варьировать от 1:50 до 1:25.

**Галактоземия** — наследственное заболевание, обусловленное пониженной активностью ферментов, участвующих в превращении галактозы в глюкозу. Галактоза поступает в организм с пищей в составе дисахарида — лактозы. Патологические повреждения обусловлены накоплением в клетках больших количеств галактозо-1-фосфата, что приводит к нарушению клеточного метаболизма. Наибольшие изменения возникают в печени, почках, хрусталике глаза, мозге. Без лечения больные погибают в первые месяцы жизни от инфекций, сепсиса или печеночной недостаточности, у всех больных развивается умственная отсталость с характерными нарушениями речи. При раннем назначении диеты дети могут развиваться нормально. В основе патогенеза болезни — снижение активности фермента галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, обусловленное мутациями в гене *GALT*. В норме фермент катализирует продукцию глюкозо-1-фосфата и уридилдифосфат-галактозы из галактозо-1-фосфата и уридилдифосфата-глюкозы. Галактоземия в российской популяции встречается в среднем у 1:20 000 новорожденных. Найдено более 180 различных мутаций в гене *GALT*, но наиболее часто встречаются Q188R и K285N. В совокупности они составляют около 70% случаев заболевания классической формой галактоземии. Описана мутация N314D в этом же гене, приводящая к галактоземии Дуарте. Этот вид галактоземии отличается относительно мягким течением, уровень фермента снижается незначительно, что приводит к стертой клинике. Галактоземию Дуарте можно выявить только путем молекулярно-генетического скрининга.

**Показания к проведению исследования на моногенные заболевания:**

- молекулярно-генетический скрининг в ходе прегравидарной подготовки;
- молекулярно-генетический скрининг доноров спермы и ооцитов;
- неонатальный молекулярно-генетический скрининг;
- подтверждение и расшифровка результатов биохимического скрининга;
- в ходе медико-генетического консультирования семей, где выявлен больной ребенок.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.6.3. Неонатальный скрининг новорожденных

Самым эффективным способом для раннего обнаружения наследственных заболеваний является массовое обследование новорожденных, или неонатальный скрининг. С 2023 г. в России была введена программа расширенного неонатального скрининга, включающая 36 наследственных заболеваний, в том числе спинальную мышечную атрофию (СМА) и первичные иммунодефициты.

**Проксимальная СМА** — тяжелое аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся прогрессирующими симптомами вялого паралича и мышечной атрофии вследствие дегенерации  $\alpha$ -мотонейронов передних рогов спинного мозга. Наиболее частой причиной проксимальной СМА являются мутации гена *SMN1*, кодирующего белок выживаемости мотонейронов (survival motor neuron protein — SMN). Гомозиготные делеции экзонов 7 или 7–8 представляют наиболее распространенный вариант мутаций гена *SMN1*, выявляются у 95% пациентов СМА. СМА входит в число частых наследственных заболеваний. По данным ФГБНУ МГНЦ имени академика Н.П. Бочкова, частота носительства мутации в гене *SMN1* в России составляет 1 на 36 случаев, официальные данные по распространенности заболевания в РФ отсутствуют, расчетная частота рождения ребенка со СМА — 1 на 5184 новорожденных. Для диагностики СМА используется комплекс методов обследования, включающий генеалогический анализ, неврологический осмотр, электронейромиографию. Приоритетным диагностическим методом при подозрении на СМА является генетическое тестирование. Рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *SMN1* всем пациентам с подозрением на СМА. Диагноз СМА подтверждается при обнаружении делеции экзонов 7 или 7–8 в гомозиготном состоянии.

В настоящее время существует два направления терапии СМА: патогенетическая, направленная на коррекцию дефицита белка SMN, и симптоматическая — устранение отдельных симптомов заболевания. Для достижения пациентом лучшего клинического ответа рекомендуется начинать патогенетическую терапию в самый короткий срок после постановки диагноза. *Нусинерсен* — первый препарат для лечения всех видов СМА, одобренный Комитетом по контролю за лекарственными веществами и пищевыми добавками США (FDA) в 2016 г., в РФ зарегистрирован с 2019 г. При условии своевременного назначения проявляется терапевтический эффект — двигательное развитие пациентов и увеличение выживаемости.

В большинстве случаев заболевание диагностируется только после появления первых симптомов, когда в организме ребенка уже произошли необратимые изменения. В результате СМА является главной причиной генетически обусловленной смертности детей до 1 года. Генетический скрининг позволяет обнаружить наличие мутации *SMN1* уже в первую неделю жизни ребенка, до появления первых симптомов, и начать лечение, избежав инвалидизации.

**ПИДС** — гетерогенная группа врожденных нарушений иммунитета, большинство из которых проявляется в младенчестве и раннем детском возрасте и приводит к высокой заболеваемости и смертности. Типичными проявлениями ПИДС являются тяжелые инфекции, а также повышенная склонность к развитию опухолей. Распространенность различных форм ПИДС варьирует, а общая встречаемость составляет 1:10 000 рождений. Наиболее опасной формой является тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН) (или тяжелая комбинированная недостаточность клеточного и гуморального звена иммунитета). В эту группу входят заболевания, обусловленные нарушением пролиферации дифференцировки Т- и В-лимфоцитов. ТКИН характеризуется низким количеством (лимфопения) или полным отсутствием Т-лимфоцитов при наличии или отсутствии В- и NK-лимфоцитов, что приводит к раннему развитию рецидивирующих инфекционных заболеваний.

ТКИН является неотложным состоянием в педиатрии. Если ТКИН диагностирована в первые месяцы жизни, терапия и проведение аллогенной HLA-идентичной или гаплоидентичной трансплантации стволовых клеток обеспечивают выживание более 80% пациентов независимо от формы иммунодефицита. В случае более поздней диагностики

развиваются тяжелые инфекции, плохо поддающиеся терапии, выживаемость пациентов резко падает. В настоящее время большее количество детей с ТКИН в РФ погибает на первом году жизни от генерализованных вирусно-бактериальных инфекций из-за отсутствия диагноза и своевременной патогенетически обоснованной терапии. До недавнего времени было практически невозможно идентифицировать детей с ПИДС до их манифестации. Открытие внехромосомных кольцевых структур ДНК, образующихся во время дифференцировки TCR (TREC) и B-клеточного (KREC) рецептора лимфоцитов и содержащих константные последовательности нуклеотидов, по которым их можно обнаружить, позволило разработать перспективную технологию раннего обнаружения ПИДС (ТКИН), применимую для массового тестирования. Созревание функциональных Т- и В-клеток человека сопровождается рекомбинацией и перестройками в генах, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы. Во время этих процессов вырезаемые участки образуют эксцизионные кольца ДНК, получившие название TREC. TREC образуется на конечном этапе дифференцировки Т-клеток, встречается в 70% всех тимоцитов, экспрессирующих  $\alpha\alpha$ -TCR, стабильна и не реплицируется во время митоза, что позволяет использовать ее в качестве суррогатного маркера адекватной пролиферации Т-лимфоцитов. KREC — аналог кольцевой молекулы TREC, образующийся в процессе созревания В-клеток в костном мозге. Как и в случае TREC, KREC не может реплицироваться в клетке, является стабильной структурой и встречается более чем в 50% В-лимфоцитов. Низкие уровни несущих эти молекулы лимфоцитов в периферической крови указывают на Т- и/или В-клеточную лимфопению.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Проблема раннего диагностирования ПИДС решена включением генетического тестирования на ТКИН и другие формы первичных иммунодефицитов в национальные программы скринирования новорожденных. Методом выбора неонатального скрининга ПИДС является мультиплексный анализ количества TREC и KREC в сухих клетках крови на картах неонатального скрининга. Такая комбинация тестов позволяет обнаруживать суммарно больше первичных иммунодефицитов, чем при отдельном тестировании TREC или KREC, благодаря чему возрастает количество больных детей, получивших возможность своевременно начать адекватную патогенетически обоснованную терапию, что в итоге ведет к снижению общей заболеваемости и младенческой смертности, обусловленных данными нозологиями.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.6.4. Оценка рисков анеуплоидий и хромосомных аномалий при преимплантационном генетическом тестировании и беременности

Одно из ведущих мест в структуре причин репродуктивных потерь, неонатальной смертности и детской инвалидности занимают хромосомные анеуплоидии. Они представляют собой генетические нарушения, при которых число хромосом в клетках не кратно основному набору. Анеуплоидии являются основной причиной спорадических неразвивающихся беременностей и выкидышей, а у новорожденных встречаются с частотой до 1:300. Наиболее частыми хромосомными анеуплоидиями у родившихся детей являются трисомии по хромосомам 21, 18 и 13, приводящие к проявлениям синдромов Дауна, Эдвардса и Патау. Анеуплоидии по другим аутосомам крайне редко встречаются у родившихся детей, так как приводят к прерыванию беременности на ранних сроках.

В целях профилактики наследственных и врожденных заболеваний у детей и предупреждения детской инвалидности в России внедрено обязательное пренатальное обследование беременных, которое включает два этапа: скрининг и уточнение характера патологии. На первом этапе в рамках массового комбинированного скрининга беременных пациенток в 11–14 нед (I триместр) беременности направляют на УЗИ толщины воротникового пространства и на исследование содержания в крови  $\alpha$ -хорионического гонадотропина человеческого и РАРР-А (белка А, связанного с беременностью) с последующим программным расчетом индивидуального риска рождения ребенка с хромосомной патологией. Скрининг основан на косвенных маркерах и имеет ограничение по чувствительности и специфичности, поскольку колебания биохимических показателей зависят не только от хромосомного статуса плода, но и от гормонального фона беременной женщины и ряда других факторов. В результате комбинированный скрининг I триместра позволяет отнести в группу риска для последующего проведения инвазивной диагностики лишь около 80% беременностей плодами с трисомией по 21-й хромосоме.

Для определения хромосомного статуса плода требуется проведение подтверждающей диагностики инвазивными методами (биопсия хориона, амниоцентез или кордоцентез), что может привести к потере беременности в 0,5–2% случаев, противопоказано женщинам с риском прерывания беременности. При массовом комбинированном скрининге в группу риска попадает много женщин, вынашивающих здоровый плод. Наличие анеуплоидий по данным скрининга подтверждается примерно в 1 из 8 случаев высокого риска. Высокая вероятность ложноположительного результата скрининга приводит к снижению доверия к нему и, как следствие, к значительному количеству отказов от верификации методами инвазивной диагностики. От нее отказываются около половины женщин из группы высокого риска по рождению ребенка с хромосомной патологией, которые действительно вынашивают плод с трисомией по 21-й хромосоме. Согласно клиническим рекомендациям МЗ РФ по нормальной беременности (2023 г.), для дополнительной оценки риска хромосомных аномалий плода пациентке после 10 нед беременности может быть дополнительно предложено проведение неинвазивного пренатального тестирования — определение внеклеточной ДНК плода по крови матери.

Для проведения неинвазивного пренатального тестирования существуют два разных подхода. Первый — полногеномный, при котором секвенируется вся ДНК, которая есть в плазме крови беременной женщины. Второй подход — таргетный, который позволяет при секвенировании использовать заранее определенные локусы в качестве мишеней. Неинвазивное пренатальное тестирование обладает высокой ДЧ и ДС и позволяет с высокой точностью

выявлять беременных с риском хромосомных нарушений, однако выявление высокой вероятности анеуплоидии у плода по результатам неинвазивного пренатального тестирования не является достаточным аргументом в пользу принятия решения о прерывании беременности. Для проведения консилиума по вопросу о прерывании беременности при обнаружении хромосомных нарушений у плода требуется подтверждение анеуплоидии данными УЗИ, кариотипированием или с помощью методов молекулярной диагностики.

**Инвазивное тестирование для диагностики анеуплоидий.** «Золотым стандартом» для выявления хромосомных нарушений в последние десятилетия являлся метод классического цитогенетического кариотипирования с дифференциальной окраской хромосом. Этот метод позволяет анализировать кариотип в целом и выявлять крупные (начиная с 5 млн пар нуклеотидов) делеции и дупликации, а также перестройки хромосом (транслокации различного типа). Однако у классического кариотипирования есть целый ряд ограничений — это длительность выполнения анализа (от 2 нед), высокие требования к квалификации и опыту специалиста-цитогенетика, сложности с качеством и количеством материала для исследования.

Как альтернатива цитогенетическим методам все большее распространение получают методы молекулярной диагностики хромосомных нарушений. В последние годы молекулярное кариотипирование на микроматрицах признано ведущими мировыми специалистами по пренатальной диагностике как равнозначная альтернатива классическому кариотипированию цитогенетическим методом. Основным преимуществом молекулярно-генетических методов является быстрота получения результата (несколько дней). Однако стоимость молекулярного кариотипирования, чаще всего выполняемого методом хромосомного микроматричного анализа, гораздо выше, чем обычного анализа.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

Уже более 10 лет в практике многих зарубежных и некоторых российских лабораторий для диагностики наиболее частых трисомий, а также нарушений количества половых хромосом и полиплоидий применяется метод количественной флюоресцентной ПЦР (QF-PCR). Данный метод основан на амплификации, детекции и анализе коротких tandemных повторов ДНК, специфичных для каждой хромосомы (STR-маркеров).

Для ПЦР-амплификации используются флюоресцентно меченные специфические праймеры для отдельных STR-маркеров, расположенных на хромосомах 13, 18, 21, X и Y. Каждая пара специфических праймеров позволяет в результате реакции амплификации получить специфические продукты (флюоресцентно меченные ампликоны) определенной длины. Полученный набор продуктов амплификации затем анализируется методом фрагментного анализа на секвенаторе. По количеству и соотношению высоты пиков, выдаваемых оборудованием для фрагментного анализа, производится оценка числа копий каждой таргетной хромосомы в анализируемом образце ДНК. Результат анализа позволяет подтвердить или опровергнуть данные других методов анализа (УЗИ, биохимический анализ, неинвазивный скрининг) в пользу наличия у плода анеуплоидий по 13, 18 и 21-й хромосоме, а также полной триплоидии. Также можно выявить часть патологий, связанных с половыми хромосомами, — синдром Клайнфельтера и трипло-Х.

**Преимплантационное генетическое тестирование.** До недавнего времени вопрос дородовой диагностики хромосомных и генных заболеваний проводился исключительно на пренатальном этапе. В настоящее время преимплантационное генетическое тестирование проводят для выявления хромосомных нарушений у эмбриона (преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии и на структурные перестройки и для выявления моногенной патологии). Проведение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии и на структурные перестройки возможно с помощью разных технологических платформ, позволяющих исследовать весь хромосомный набор (полнохромосомные методы). В число наиболее популярных методик входят сравнительная геномная гибридизация на чипах и NGS. Существенными преимуществами подхода NGS являются гибкая глубина исследования (в зависимости от количества прочтений на образец можно менять разрешение — от анеуплоидий до небольших инсерций/делеций), скорость получения результата (некоторые платформы позволяют выдать ответ за 1–2 рабочих дня). Высокая процессивность метода, позволяющая в один запуск проводить исследование несколько десятков образцов, а также умеренная стоимость анализа привели к тому, что данный метод вытесняет метод сравнительной геномной гибридизации на биологических чипах в области преимплантационного генетического тестирования.

В РФ применение преимплантационного генетического тестирования регламентируется клиническими рекомендациями «Женское бесплодие», утвержденными МЗ РФ в 2021 г. В этих рекомендациях вводится термин «преимплантационное генетическое тестирование», а также приводится информация о том, что частота наступления беременности снижается с увеличением возраста матери, а после 40 лет достигает минимальных значений, причем связано это именно с увеличением доли анеуплоидных эмбрионов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.6.5. Неинвазивная пренатальная диагностика

В акушерско-гинекологической практике часто возникает необходимость определения генотипа плода на ранних сроках беременности. До недавнего времени материал для таких исследований получали инвазивно, при хорион-, плацентобиопсии в ходе амнио- и кордоцентеза. Риск самопроизвольного прерывания беременности в этом случае составляет 2–3%. Открытие наличия фетальных клеток, а затем и ДНК, и РНК в материнской крови послужило основой для развития неинвазивной пренатальной диагностики, которая не представляет угрозы течению беременности, так как материалом для исследования служит кровь матери. Фрагменты фетальных ДНК, то есть ДНК из клеток плода, обнаруживаются в крови беременной женщины, их количество возрастает с увеличением срока

гестации, зависит от состояния плаценты и особенностей течения беременности. Начиная с 8–10 нед беременности методы неинвазивной пренатальной молекулярно-генетической диагностики позволяют проводить исследование фетальной ДНК с точностью 96–98%.

**Неинвазивное определение пола плода** в начале II триместра может предотвратить случаи рождения больных детей в семьях с отягощенной наследственностью. Возможно прерывание беременности по медицинским показаниям при наличии у родителей носительства генов заболеваний, сцепленных с полом (например, гемофилия или прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера). Врачу важно знать пол плода для принятия решения о возможности гормональной терапии беременной при гиперандрогении надпочечникового генеза (врожденной дисплазии коры надпочечников). Основным методом пренатального установления пола будущего ребенка сейчас является ультразвуковая диагностика, однако на ранних сроках беременности этот метод не всегда корректен и часто субъективен. Показания к проведению исследования:

- коррекция лекарственной терапии при врожденной дисплазии коры надпочечников;
- возможное носительство гена гемофилии и других заболеваний, сцепленных с полом (умственная отсталость, связанная с X-хромосомой; миодистрофия; адренолейкодистрофия; синдром Альпорта; иммунодефицит, связанный с X-хромосомой; пигментный ретинит; гидроцефалия, связанная с X-хромосомой; синдром Лоу; X-связанный ихтиоз);
- предполагаемое нарушение детерминации пола плода по результатам УЗИ.

**Определение Rh плода.** Сенсибилизация матери к D-антигену и риск развития Rh-конфликта возрастают с каждой последующей беременностью Rh+-плодом независимо от того, прервалась ли беременность или прошло родоразрешение. Для выявления Rh-конфликта беременной и плода применяется комплекс клинических исследований, включающий:

- измерение специфичных материнских антител к D-антигену плода;
- инвазивные мероприятия, основанные на получении плодного материала при хорион-, плацентобиопсии в ходе амнио- и кордоцентеза;
- доплерометрические исследования скоростей кровотока в средней мозговой артерии плода и его аорте.

Всем беременным Rh-женщинам проводят динамический контроль уровня антител к D-антигену плода. Отсутствие антител не гарантирует, что плод Rh–, так как даже при Rh+ у плода антитела у матери могут не вырабатываться по причине целостности плаценты или слабого иммунного ответа. В этой ситуации есть опасность, что Rh-конфликт может возникнуть в любой момент беременности, кроме того, что во время родов произойдет сенсибилизация матери. Определение Rh методом ПЦР-РВ заключается в выявлении гена *RHD*, кодирующего D-антиген. Чаще всего отрицательный Rh обусловлен полным отсутствием гена *RHD*. В этом случае Rh определяется как отрицательный серологическим методом и методом ПЦР, то есть результаты исследований совпадают. У 1% серологически Rh–лиц определяется наличие гена *RHD*. Это происходит в следующих случаях:

- ген *RHD* присутствует, и генотипически Rh будет положительным, но в результате мутаций D-антиген не синтезируется и серологическим методом определяется Rh–;
- ген *RHD* присутствует полностью или частично, и генотипически Rh будет положительным, но в результате мутаций синтезируется измененный D-антиген, что серологически определяется как нестабильно отрицательный Rh.

Такие пациентки являются генотипически Rh+, и определить Rh плода методом ПЦР невозможно. Однако наблюдение за течением беременности необходимо проводить по схеме ведения Rh–пациенток с возможностью развития Rh-конфликта. Показания к проведению определения Rh плода:

- ведение беременности у женщины с Rh– для своевременного расчета риска развития Rh-конфликта;
- отсутствие в крови беременной женщины с Rh– антител к D-антигену плода перед профилактическим введением Ig;
- хирургическое прерывание беременности у женщины с Rh– с целью прогнозирования развития Rh-конфликта при последующих беременностях.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.7. Особенности РНК в качестве биомаркера

#### 9.7.1. Виды РНК

Молекулярно-биологические исследования связаны с изучением типов ДНК и РНК. ДНК — консервативная молекула с долгим временем жизни. ДНК человека содержит 3 млрд пар оснований. Средний период полураспада митохондриальной ДНК для последовательности из 242 пар нуклеотидов оценивается в 521 год. Короткие фрагменты ДНК могут присутствовать в течение очень длительного времени: при –5 °C предсказательный период полураспада для фрагмента мтДНК длиной 30 пар нуклеотидов в кости оценивается в 158 000 лет, при 15 °C для фрагмента 500 пар нуклеотидов — 180 лет, при 25 °C для 500 пар нуклеотидов — 30 лет.

РНК — короткоживущая молекула. Средний период полураспада мРНК, определенный методом генного контроля, составляет 3,4 и 1,5 мин при 20 и 42 °C соответственно, что указывает на очень быстрый оборот мРНК. В целом время

жизни эукариотических мРНК составляет от нескольких минут до нескольких дней, хотя и может сохраняться в РНК-стабилизирующем растворе при 45 °С в течение 4,5 мес.

Деградиация РНК играет важную роль в диагностике и судебно-медицинской экспертизе. Это связано с тем, что 5'-конец транскрипта мРНК разлагается в высушенных пятнах быстрее, чем 3'-конец. Статистический анализ кинетики деградации показывает, что в зависимости от возраста образца возраст пятен крови может быть оценен с точностью до 2–4 нед для пятен возрастом менее 6 мес и 4–6 нед — для пятен возрастом от 6 мес до 1 года. Этими особенностями обусловлен поиск новых биомаркеров, новых методов молекулярно-генетических исследований, новой интерпретации получаемых данных для диагностики и возможной терапии, в том числе с применением машинного обучения искусственного интеллекта.

Исследования сосредоточены на видах РНК: транспортная РНК, рибосомная РНК, малая ядерная РНК, микроРНК, мРНК.

Проект «Геном человека» показал, что менее 2% генома человека составляют гены, кодирующие белок. Тем не менее бо́льшая часть геномной ДНК представляет собой транскрипционную матрицу, что указывает на то, что транскриптом человека преимущественно содержит некодирующие РНК (нкРНК). Было продемонстрировано, что нкРНК играют решающую роль в регуляции экспрессии генов, влияя на транскрипцию генов-мишеней или посттранскрипционные модификации. НкРНК можно разделить на две основные категории: длинные нкРНК и малые нкРНК. Длинные нкРНК имеют длину более 200 нуклеотидов и составляют бо́льшую часть некодирующего транскриптома у млекопитающих. Отдельно обозначают кольцевые РНК (circРНК, >200 нуклеотидов). Малые нкРНК имеют длину менее 200 нуклеотидов. Более подробная дифференцировка по длине: тРНК (74–95 нуклеотидов), рРНК (121–5000 нуклеотидов), snРНК (100–300 нуклеотидов), snoРНК (100–300 нуклеотидов), gРНК (55–70 нуклеотидов), miРНК или микроРНК (19–23 нуклеотидов), piРНК (24–30 нуклеотидов), малая интерференционная РНК (siRNA) (21–25 нуклеотидов).

НкРНК — circРНК, микроРНК и длинные нкРНК — играют жизненно важную роль в качестве регуляторов заболеваний, включая онкологические и сердечно-сосудистые патологии, СД, остеопороз.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.7.2. Ультраконсервативные РНК

В подмножестве длинных некодирующих РНК выделяют ультраконсервативные РНК (укРНК) длиной более 200 нуклеотидов, транскрибируемые из 481 консервативного фрагмента ДНК генома. УкРНК обладают высокой степенью консервации не только среди видов, но и на протяжении всей эволюции. Наличие эволюционной консервации указывает на то, что укРНК могут выполнять критические физиологические функции, в том числе как положительную, так и отрицательную регуляторную роль в экспрессии генов во время канцерогенеза. Аберрантно экспрессируемая укРНК (uc.63+) может действовать как канцероген, способствуя инвазии опухоли и миграции раковых клеток в различные ткани. Являясь разновидностью длинной некодирующей РНК, укРНК регулируют экспрессию генов-мишеней как конкурентные за связывание с микроРНК, что приводит к стабилизации мРНК. Другой механизм функционирования укРНК заключается в регуляции альтернативного сплайсинга — процесса, посредством которого из одного и того же гена могут быть получены разные транскрипты мРНК, приводящие к образованию различных изоформ белка. Было показано, что некоторые укРНК связываются как с ДНК-, так и с РНК-связывающими белками, это позволяет предположить, что они могут играть роль в регуляции экспрессии генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровне.

укРНК.98 приводит к аномальной пролиферации эндотелиальных клеток аорты, усиленной адгезии и значительно повышает уровни факторов воспалительной транскрипции за счет активации внутриклеточного фосфатидилинозитольного пути и увеличения экспрессии рецепторов к факторам роста эндотелия и инсулиноподобному фактору, тем самым ускоряя процесс атеросклероза. укРНК.323 может предотвращать гипертрофию миокарда путем экспрессии предсердного натрийуретического пептида (ANP) и BNP, уменьшающих объемную нагрузку на сердечную мышцу.

С точки зрения перспектив применения укРНК потенциально могут быть использованы в качестве диагностических маркеров и новых терапевтических мишеней для лечения заболеваний.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

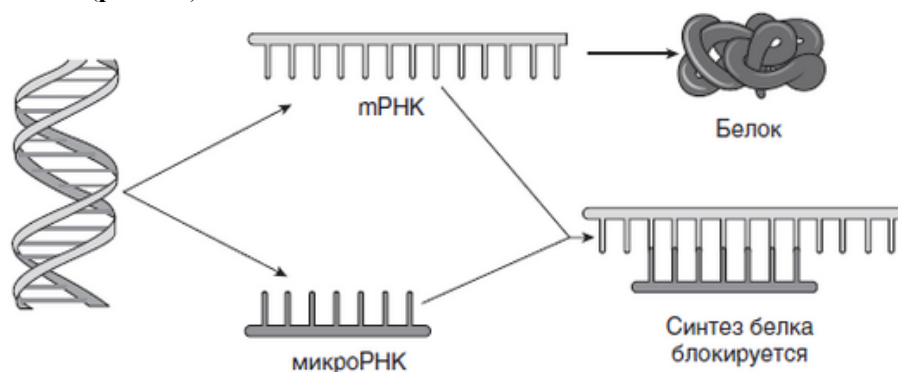
### 9.7.3. МикроРНК

МикроРНК — короткие нкРНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционной стадии, то есть на уровне мРНК. На сегодняшний день в базах данных анонсировано более 2600 микроРНК человека, каждая из которых способна регулировать множество генов-мишеней. МикроРНК играют важную регуляторную роль в разных биологических процессах, включая пролиферацию, дифференцировку клеток, контроль клеточного цикла, апоптоз, ангиогенез.

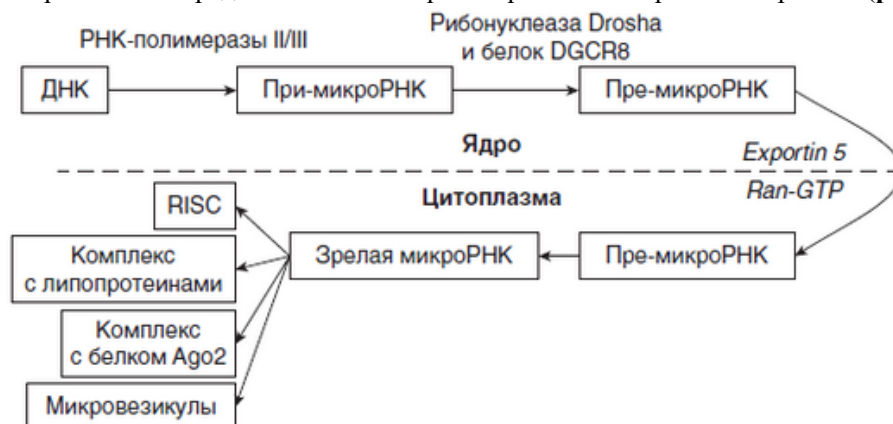
Благодаря биологическим и функциональным свойствам микроРНК их исследование считается перспективным с точки зрения диагностики. Дело в том, что для многих тканей профили экспрессии микроРНК достаточно специфичны, что позволяет дифференциально выявлять как здоровую ткань, так и патологические изменения в ней. Вторая уникальная особенность микроРНК — их длина, которая обычно не превышает 24 нуклеотидов. Это сильно увеличивает их стабильность, в частности делает их устойчивыми к расщеплению эндонуклеазами. Благодаря стабильности микроРНК можно надежно выявлять в разных биологических образцах, включая образцы, фиксированные формальдегидом (Формалином<sup>▲</sup>) и залитые парафином, или цитологические мазки, а также в плазме крови.



МикроРНК кодируются не-белок-кодирующими генами, то есть их синтез не связан с процессом образования белка. Изменение экспрессии отдельных микроРНК ассоциируется с рядом патологических процессов. При многих болезнях наблюдаются отклонения в работе микроРНК, поэтому сейчас разрабатывается терапия анти-микроРНК, например от рака. Молекулы микроРНК можно использовать в качестве лекарства, так как с их помощью можно подавить синтез белков (рис. 9.4).



**Рис. 9.4.** Схематическое представление блокирующего эффекта микроРНК на синтез белка. Подобным образом микроРНК может блокировать гены, участвующие в пролиферации, дифференцировке клеток. Нарушение функции микроРНК может быть причиной неконтролируемой опухолевой пролиферации. Часть генов микроРНК располагается в интронах и, в редких случаях, в экзонах белок-кодирующих генов, но большая часть находится в межгенных областях и регулируется собственными промоторами. Промоторы микроРНК подобны промоторам белок-кодирующих генов. Зрелая микроРНК состоит из 18–24 нуклеотидов, формируется путем многоступенчатого процесса с участием многочисленных ферментов: ДНК → первичные «при-микроРНК» → предшественники «пре-микроРНК» → зрелые микроРНК (рис. 9.5).



**Рис. 9.5.** Процессинг микроРНК. С помощью РНК-полимеразы II/III выделяется первичный транскрипт («при-микроРНК»), который затем расщепляется с участием ферментов Drosha и DGCR8, образуя предшественник «пре-микроРНК». Пре-микроРНК экспортируется из ядра в цитоплазму с помощью белков внутриядерного транспорта Exportin 5 и Ran-GTP. В цитоплазме под действием рибонуклеазы Dicer происходит образование зрелых микроРНК, которые, формируя РНК-опосредованные блокирующие комплексы (RISC), могут непосредственно воздействовать на специфические мишени. МикроРНК могут экспортироваться из клетки в комплексе с белком Ago2, липопротеинами и в составе микровезикул.

Процессинг микроРНК происходит при помощи РНК-полимеразы II (Pol II), транскрибируется при-микроРНК с последующим преобразованием в премикроРНК-комплекс за счет рибонуклеаз DGCR8 и Drosha. Затем образовавшаяся РНК в виде шпильки длиной примерно 70 нуклеотидов (пре-микроРНК) экспортируется в цитоплазму при помощи комплекса, в который входят белки Exportin 5/RanGTP. Далее эндонуклеаза Dicer удаляет концевую петлю, что приводит к формированию зрелой микроРНК. Далее она попадает в состав комплекса RISC, непосредственно участвующего в регуляции генов-мишеней. В большинстве случаев комплекс «микроРНК–RISC» взаимодействует с мРНК-мишенью за счет полного либо частичного комплементарного связывания особой seed-области. У одной микроРНК может быть множество генов-мишеней, при этом после связывания микроРНК с РНК-мишенью может происходить либо ингибирование трансляции, либо Ago2-зависимое расщепление мРНК-мишени. При расщеплении мРНК происходит полное комплементарное подавление синтеза белка, которое обеспечивала данная мРНК.

**МикроРНК при раке.** МикроРНК рассматриваются как одни из молекулярных маркеров канцерогенеза. Они участвуют в апоптозе, пролиферации, дифференцировке, ангиогенезе, что может быть решающим в патогенезе канцерогенеза. Более того, микроРНК не только ассоциированы с разными видами опухолей, но могут сами быть онкогенами или супрессорами опухолей. При злокачественной трансформации всегда происходит изменение уровня экспрессии определенных микроРНК. Данные о нарушении содержания микроРНК при раке впервые появились в 2002 г., когда кластер из двух микроРНК, miR-15 и miR-16, был картирован в длинном плече хромосомы 13 (13q14.3), то есть в области, которая часто подвергается делеции при ХЛЛ. Было показано, что делеция микроРНК влияет на экспрессию белка BCL2, подавляющего апоптоз.

Функции микроРНК делятся на две основные функциональные категории: 1) гомеостатическая регуляция экспрессии генов посредством «тонкой настройки» трансляции в соответствии с потребностями клетки; 2) устойчивость клеточных ответов, которая важна для решения клеточной судьбы, то есть группы микроРНК могут определять клеточную дифференцировку, часто через сложные отрицательные обратные связи. Это наблюдается при некоторых видах рака, при которых микроРНК, связанные с конечной дифференцировкой, экспрессируются слабо, что способствует дедифференцировке и активации пролиферации. В ответах на стрессовые факторы микроРНК могут функционировать как «переключатели», позволяющие клеткам адаптироваться к временным изменениям в их микросреде.

Каждый тип опухоли имеет свой отличительный профиль микроРНК, который отличает его от нормальных тканей и других типов рака. Экспрессия микроРНК, как и экспрессия генов, связанных с раком, может меняться в результате хромосомных амплификаций/делеций, метилирования промотора или активации специфических факторов транскрипции. Важность альтераций, связанных с микроРНК при раке, дополнительно подчеркивается наблюдением, что многие раковые клетки имеют генетические изменения, специфичные для механизма действия микроРНК, то есть модификации связывания мишени, процессинга и посттранскрипционного редактирования.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

*Боковой амиотрофический склероз* — наиболее распространенное заболевание двигательных нейронов, характеризующееся сложной генетической структурой, не имеющее единого диагностического теста, способного поставить окончательный диагноз. Профилирование микроРНК может служить дополнительным диагностическим инструментом, дополняющим клиническую картину и помогающим в раннем распознавании.

Как биомаркер мРНК применяется в нефрологии, трансплантологии, онкогематологии, для первичного скрининга рака ШМ, в диагностике туберкулеза, оценке местной воспалительной реакции, связанной с дисбиотическими состояниями влагалища. МикроРНК участвуют в регуляции метаболизма ХС, регуляции функции сосудов, развитии артериальной гипертензии, атеросклероза, хронического пародонтита, бокового амиотрофического склероза, эпилепсии. В онкологии — при метастазировании в мозг, глиобластоме, феохромоцитоме, мезотелиоме, хондросаркоме, плоскоклеточном раке языка, гепатоцеллюлярной карциноме, раке мочевого пузыря, колоректальном раке, раке желудка, яичников, МЖ, ШМ, предстательной железы.

Поскольку одобренные в настоящее время препараты могут воздействовать только на небольшое количество белков в организме человека, вопрос о том, можно ли использовать микроРНК в качестве биомаркеров для диагностики, лечения и прогноза заболеваний человека, стал новой темой исследований. На данном этапе был сгенерирован большой объем данных, связанных с микроРНК, включая некоторые экспериментально подтвержденные ассоциации микроРНК с заболеванием. С использованием этих данных разработаны вычислительные модели для прогнозирования большего количества ассоциаций микроРНК с заболеваниями. Самая полная общедоступная база данных последовательностей и аннотаций микроРНК — *miRBase* — содержала в 2002 г. всего 218 *miRНК*. В последнюю версию (*miRBase* v22.1) внесено 1917 предшественников микроРНК на основе анализа данных глубокого секвенирования РНК.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.7.4. Кольцевые РНК

*CircРНК* представляют собой новый класс эндогенных РНК, в изобилии экспрессирующихся в эукариотических клетках. Эти молекулы образуются из мРНК-предшественников и широко экспрессируются у различных видов. Широкое присутствие *circРНК* в эукариотических клетках указывает на то, что они являются важным компонентом семейства нкРНК. *CircРНК* функционируют как губки (резервуары) микроРНК и каркасы РНК-связывающего белка. В отличие от линейных РНК, *circРНК* образуют ковалентно замкнутую структуру без 5'- или 3'-конца и имеют гораздо более длительный период полураспада. Достижения высокопроизводительной технологии секвенирования показали, что *circРНК* связаны со многими клиническими характеристиками и могут служить для точной диагностики и лечения рака.

*CircРНК* представляют собой высокостабильную форму нкРНК, поскольку они естественным образом устойчивы к РНК-нуклеазам. Примечательно, что многие *circРНК* демонстрируют измененные уровни экспрессии в ответ на специфические болезненные состояния или инфекции патогенами, что подразумевает связь между *circРНК* и возникновением и прогрессированием заболеваний человека и животных. Предполагается участие *circРНК* во врожденном противовирусном иммунном ответе за счет влияния на репликацию вируса.

Остеопороз — хроническое заболевание, практически не поддающееся лечению. Существующие препараты имеют очевидные побочные реакции и не подходят для длительного применения. Избыточная экспрессия ключевых *circРНК*-микроРНК может быть новой терапевтической стратегией при остеопорозе.

*CircРНК* все чаще участвуют в развитии и прогрессировании рака легких. Одним из ключевых механизмов, с помощью которых *circРНК* оказывают свое влияние, является их способность действовать как резервуары микроРНК, изолируя микроРНК и предотвращая их действие на другие молекулы РНК. Нарушение регуляции конкурирующих сетей эндогенных РНК, включающих *circРНК*, микроРНК и мРНК, приводит к экспрессии онкогенов и опухолевых супрессоров, участвующих в патогенезе рака легкого. Понимание динамического взаимодействия и молекулярных механизмов циркулярных РНК, микроРНК и мРНК открывает перспективы для ранней диагностики, персонализированных терапевтических вмешательств и улучшения результатов лечения пациентов при раке легкого. Обработка данных о связи *circРНК* с заболеванием имеет решающее значение для изучения клинической значимости *circРНК*. База данных тканеспецифичных *circРНК* (TSCD) содержит информацию, относящуюся к систематическому

анализу тканеспецифичных *circ*РНК, может быть использована для идентификации новых биомаркеров органогенеза и развития заболеваний. Быстрое развитие вычислительных алгоритмов облегчило построение новых вычислительных моделей для прогнозирования ассоциаций *circ*РНК с заболеванием.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.8. Применение молекулярно-биологических методов

#### 9.8.1. Специфика молекулярно-биологических исследований

ДНК становится одной из основных аналитических мишеней в КЛД. Молекула ДНК обладает стабильностью, относительной простотой восстановления; прогрессивно увеличиваются знания о мутациях и изменениях, имеющих клиническое значение. Эти изменения включают SNP, варианты числа копий, делеции, транслокации и другие хромосомные перестройки. Аналитические подходы и конкретные платформы различаются по способности обнаруживать эти отклонения, поэтому выбор подхода к исследованиям требует понимания аналитических и диагностических возможностей методов.

Хотя ДНК является наиболее часто анализируемой молекулярной мишенью, мРНК также может быть чрезвычайно полезной, так как предлагает потенциальное преимущество меньшего аналитического размера. Это может обеспечить более упрощенный подход к анализу генов со многими экзонами или обнаружению транслокаций или делеций. Однако мРНК лабильна и будет быстро разрушаться после сбора образцов или деваскуляризации тканей; поэтому преаналитические проблемы с возможностью ишемии образца, времени доставки и обработки могут оказывать существенное влияние на качество результатов.

Более мелкие некодирующие молекулы РНК, известные как микроРНК, были изучены на предмет потенциального клинического использования. Преимущество микроРНК заключается в высокой стабильности в тканевых и других биологических образцах, в эффективном извлечении из образцов разной экспрессии в тканях и опухолях, что позволяет использовать микроРНК в качестве исследовательского и клинического инструмента. МикроРНК использовалась для оценки рисков, прогнозирующих прогрессирование опухолей, в диагностике и прогнозировании ССЗ, эндокринных заболеваний, в молекулярных исследованиях трансплантации органов и тканей. Транскриптомный анализ с помощью NGS является важным подходом к изучению экспрессии сложных генов и играет все более важную роль в анализе и открытии биомаркеров.

Учитывая постоянное развитие базы молекулярных знаний, диагностические лаборатории должны быть готовы соответствующим образом корректировать лабораторные анализы, их внедрение в клиническую практику и обеспечивать качество проведения анализов.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.8.2. Взаимозависимость геномики и протеомики

«Омиксными» принято называть технологии, основанные на достижениях геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, то есть наук, которые изучают, как устроен геном, как реализуется закодированная в нем информация, как она преобразуется в структуру белков и в дальнейшем в какие-то признаки организма, которые могут иметь значение для диагностики и лечения заболеваний. Омиксные технологии являются одним из главных инструментов геномной и постгеномной медицины.

Подходы, ориентированные на белки, могут дополнять геномные исследования, поскольку геномные и транскриптомные изменения в конечном итоге влияют на структуру и экспрессию белка. Углубленный анализ этих биомолекул может обеспечить улучшенный и ускоренный путь для расшифровки патофизиологического процесса различных заболеваний, а также для открытия биомаркеров.

Метаболом, относительно недавнее появление в спектре омиков, представлен метаболитами. Эти молекулярные химические образования выходят за пределы генома и протеома, представляя собой самую нижнюю стадию динамической системы, определяемой как метаболизм. Информационный поток через различные «омические» уровни биохимической организации описывается как центральная догма молекулярной биологии. В рамках этой концепции метаболом — это совокупность метаболитов, получил широкое признание как динамическая и чувствительная мера фенотипа на молекулярном уровне, ставящая метаболомику на передний план биомаркерных и механистических открытий, связанных с патофизиологическими процессами. Восприятие метаболитов главным образом как последующих продуктов — биомаркеров (активности генов и белков) — свело к минимуму понимание их далеко идущей регуляторной активности. Активность метаболитов является интересным аспектом метаболизма, учитывая, что метаболом взаимодействует со всеми другими «омными» уровнями и активно их модулирует. Метаболиты активно контролируют активность белка посредством аллостерической регуляции трансмембранных рецепторов и факторов транскрипции, выступая в качестве кофакторов и косубстратов ферментов в катализе биохимических реакций, а также посредством посттрансляционных модификаций. Они также существенно влияют на метаболизм РНК посредством сенсорных (малые молекулы-лиганды воспринимаются рибопереклечателями) и посттранскрипционных модификаций. Более того, хорошо известно, что метаболиты служат сигнальными молекулами для контроля факторов транскрипции и, следовательно, экспрессии генов. Наконец, как кофакторы и косубстраты ферментов, модифицирующих хроматин, они активно участвуют в эпигенетической регуляции.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

### 9.8.3. Аналитические методы обработки данных

Лаборатории используют разные молекулярно-биологические технологии для обнаружения мутаций и других геномных аномалий. Для пользования большинством методов необходима обработка больших массивов данных, чтобы получить клинически значимый результат. Одновременное прочтение нескольких генов с помощью целевых генных панелей или более широкого анализа является эффективным и экономически выгодным способом профилирования и диагностики клинически значимых патологий в онкологии, трансплантологии, микробиологии, генетике и других отраслях медицины.

Внутренняя среда организма состоит из большого количества метаболитов и белков, использование высокопроизводительных технологий для метаболомно-протеомного анализа представляется ближайшим будущим лабораторной медицины. Основные аналитические подходы, используемые в этом направлении, включают спектроскопию ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрию, сочетающиеся с другими методами разделения в зависимости от физико-химических свойств исследуемых аналитов. Без анализа массива данных в этом направлении продвинуться невозможно. Развиваются такие направления, как спектроскопия ядерного магнитного резонанса, предлагающая быструю высокопроизводительную неразрушающую платформу для анализа метаболома пота с количественным представлением данных. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией применялась для анализа летучих органических соединений пота, для оценки биомаркеров рака, для различения половых различий летучих веществ пота человека. Капиллярный электрофорез — технология, которая может сочетаться с масс-спектрометрией, нацелена на полярные метаболиты. Методы жидкостной хроматографии, например обращенно-фазовый, аффинный, ионный обмен, исключение размера, используются при разделении метаболитов. Эти технологии не лишены недостатков для диагностического применения, однако специалистам лабораторной службы предстоит в ближайшее время освоить и оценить эти технологии в практическом применении.

Огромный объем сложных данных, генерируемых приборами для секвенирования, представляет проблему для лабораторий и МО, требующую инвестиций, достижений в области информатики и анализа данных. Интерпретация данных является сложной задачей, требующей нескольких шагов и использования информационных инструментов для получения окончательного результата на основе необработанных данных. В совокупности эти программные инструменты называются «конвейером биоинформатики» (от англ. *bioinformatics pipeline*) и являются важной частью анализа образцов и получения результатов.

Однако полностью полагаться на представленные разработчиками программы, заканчивающиеся интерпретацией лабораторных данных, не следует. Свой вклад в сложность диагностики вносит эволюция молекулярных и протеомных паттернов. В частности, геномы опухолей эволюционируют, особенно под давлением избирательного лечения. Сложности аналитических технологий, зачастую авторский алгоритм исследований, трудности обработки данных и их интерпретации не позволяют в настоящее время предлагать рекомендации по стандартам диагностики в области молекулярно-биологических исследований, хотя стандартизация лабораторных методов и методов обеспечения качества разрабатывается. Очевидно, что для обоснования данного подхода активно развивается направление персонализированной медицины, которая рассматривает молекулярные технологии не только в диагностике, но и в лечении, использовании ЛС на основе геномных полиморфизмов.

#### Рекомендуемая литература

1. Бородин А.Г., Манойлов В.В. и др. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) // Научное приборостроение. 2020. Т. 30. № 4. С. 3–20.
2. Корсунский И.А., Продеус А.П., Румянцев А.Г. и др. Скрининг новорожденных на первичные иммунодефициты и группу риска иммунорегуляторных расстройств, требующих диспансерного наблюдения // Педиатрия. 2019. Т. 98. № 3. С. 49–54.
3. Лапосота М., Маккэффри П. Клинические лабораторные методы. Атлас наиболее часто выполняемых исследований / пер. с англ. под ред. В.В. Долгова, М.А. Годкова, А.В. Бугрова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 224 с.
4. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS высокопроизводительное секвенирование. М.: БИНОМ, 2014. 232 с.
5. Шубина Е. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования для неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий. Дисс. ... канд. биол. наук. М., 2017. 115 с.
6. Chen C., Wang J., Pan D. et al. Applications of multi-omics analysis in human diseases // MedComm. 2023. Vol. 4. N. 4. P. e315. doi: 10.1002/mco2.315.
7. Hassan M., Awan F.M., Naz A. et al. Innovations in Genomics and Big Data Analytics for Personalized Medicine and Health Care: A Review // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. N. 9. P. 4645. doi: 10.3390/ijms23094645.
8. Hu F., Peng Y., Fan X. et al. Circular RNAs: implications of signaling pathways and bioinformatics in human cancer // Cancer Biol. Med. 2023. Vol. 20. N. 2. P. 104–128. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2022.0466.
9. Khan S., Jha A., Panda A.C., Dixit A. Cancer-associated circRNA–miRNA–mRNA regulatory networks: A Meta-Analysis // Front. Mol. Biosci. 2021. Vol. 8. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671309.

## Глава 9. Молекулярно-биологические исследования

10. Liu C.X., Chen L.L. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications // Cell. 2022. Vol. 185. N. 12. P. 2016–2034. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.001.
11. Macvanin M., Obradovic M., Zafirovic S. et al. The role of miRNAs in metabolic diseases // Curr. Med. Chem. 2023. Vol. 30. P. 1922–1944. doi: 10.2174/0929867329666220801161536.
12. Pei X.M., Yeung M.H.Y., Wong A.N.N. et al. Targeted Sequencing Approach and Its Clinical Applications for the Molecular Diagnosis of Human Diseases // Cells. 2023. Vol. 12. N. 3. P. 493. doi: 10.3390/cells12030493.
13. Rameshwar L. Kumawat, Milan Kumar Jena et al. Advancement of Next-Generation DNA Sequencing through Ionic Blockade and Transverse Tunneling Current Methods // Small. 2024. P. e2401112. doi: 10.1002/sml.202401112.

14. Santorelli L., Caterino M., Costanzo M. Proteomics and Metabolomics in Biomedicine // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. N. 23. P. 16913. <https://doi.org/10.3390/ijms242316913>.

15. Scarano C., Veneruso I. et al. The Third-Generation Sequencing Challenge: Novel Insights for the Omic Sciences // Biomolecules. 2024. Vol. 14. N. 5. P. 568. doi: 10.3390/biom14050568.

16. Shademan B., Karamad V., Nourazarian A. et al. MicroRNAs as Targets for Cancer Diagnosis: Interests and Limitations // Adv. Pharm. Bull. 2023. Vol. 13. N. 3. P. 435–445. doi: 10.34172/apb.2023.047.

17. Tomoyoshi S. Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics // TrAC. Trends in Analytical Chemistry. 2023. Vol. 158. P. 116883. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116883>.

18. Xue C., Li G., Zheng Q. et al. The functional roles of the circRNA/Wnt axis in cancer // Mol. Cancer. 2022. Vol. 21. N. 1. P. 108–132. doi: 10.1186/s12943-022-01582-0.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Ревматические заболевания (РЗ) относятся к большой группе иммуновоспалительных заболеваний человека (ИВЗ), в патогенезе которых ключевую роль играют аутоиммунитет и аутовоспаление, связанные с генетически детерминированными и индуцированными факторами внешней среды, дефектами активации приобретенного и врожденного иммунного ответа. ИВЗ в зависимости от преобладающих механизмов активации иммунитета условно разделяются на две основные категории: аутоиммунные и аутовоспалительные. Между этими ведущими формами иммунопатологии много общего в отношении как спектра клинических проявлений, так и «триггерных» внешнесредовых и генетических факторов, биомаркеров и медиаторов воспаления, подходов к фармакотерапии. Аутоиммунитет и аутовоспаление — не взаимоисключающие, а взаимопотенцирующие процессы, эволюцию которых рассматривают в рамках «иммуновоспалительного» континуума (непрерывность при многообразии элементов), отражающего тесную патогенетическую взаимосвязь между врожденным и приобретенным иммунным ответом. В связи с этим большинство ИВЗ человека имеют черты как аутоиммунной, так и аутовоспалительной патологии. Согласно общепринятой классификации, в рамках континуума аутоиммунной и аутовоспалительной патологии выделяют группы заболеваний и синдромов (табл. 10.1).

Таблица 10.1. Непрерывный спектр (континуум) иммуновоспалительных заболеваний человека: аутовоспаление и аутоиммунитет

<input type="checkbox"/> Моногенные аутовоспалительные заболевания.
<input type="checkbox"/> Полигенные аутовоспалительные заболевания.
<input type="checkbox"/> Полигенные ИВЗ со «смешанным паттерном» (mixed pattern).
<input type="checkbox"/> Полигенные аутоиммунные заболевания: органонеспецифические (системные) и органоспецифические.
<input type="checkbox"/> Моногенные аутоиммунные заболевания

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.1. Задачи лабораторной диагностики в области иммуновоспалительных ревматических заболеваний  
Основные задачи лабораторной диагностики иммуновоспалительных ревматических заболеваний (ИВРЗ): подтверждение диагноза заболевания, оценка активности и характера иммунопатологического процесса и на этой основе прогнозирование исходов и характеристика эффективности проводимой терапии.  
Для ИВРЗ характерны хроническое, прогрессирующее течение и высокая распространенность среди лиц молодого и среднего возраста. Прогноз ИВРЗ, характеризующихся тяжелым течением и высокой летальностью, во многом зависит от возможности ранней диагностики, которая позволяет проводить активную противовоспалительную терапию.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.1.1. Лабораторные биомаркеры иммуновоспалительных заболеваний  
Полигенные аутовоспалительные РЗ включают: болезнь Стилла детей и болезнь Стилла взрослых (БСВ), ревматическую полимиалгию (РПМ), гигантоклеточный артериит (ГКА) и, возможно, артериит Такаясу. К классическим прототипам полигенных системных аутоиммунных РЗ относятся: РА, СКВ, ССД, БШ, идиопатические воспалительные миопатии (ИВМ) (ПМ/ДМ), АФС и системные васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА-СВ) (табл. 10.2).

Таблица 10.2. Спектр иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Рубрики классификации ИВЗ человека	Заболевание или синдром
Полигенные аутовоспалительные заболевания	Болезнь Стилла детей и БСВ, РПМ, ГКА, артериит Такаясу
Полигенные ИВЗ со «смешанным паттерном» (mixed pattern), связанные с МНС	АС, псориаз, псориатический артрит, болезнь Бехчета, увеит

Полигенные аутоиммунные заболевания: органонеспецифические (системные)

РА, СКВ, ССД, БШ, ИВМ, АФС, АНЦА-СВ

Полигенные ИВЗ со «смешанным паттерном» имеют черты как аутоиммунной, так и аутовоспалительной патологии. К ним можно отнести так называемые ГКГ-I-патии (главный комплекс гистосовместимости класса I), ассоциирующиеся с носительством HLA класса I и активацией оси IL-17/IL-23 (псориаз, псориатический артрит), АС, болезнь Бехчета, увеит. Поскольку гиперпродукция патогенетически значимых аутоантител нередко выявляется при аутовоспалительных болезнях (или «серонегативных» субтипах системных аутоиммунных РЗ), а черты аутовоспалительной патологии (полиморфизм генов врожденного иммунитета, активация инфламмасом) присутствуют при разных системных аутоиммунных РЗ, спектр заболеваний со «смешанным паттерном» («аутоиммuno-аутовоспалительная» патология) неуклонно расширяется.

Материалы международных (EULAR, ACR) и национальных рекомендаций по лабораторной диагностике ИВРЗ, основанных на принципах доказательной медицины, обеспечивают оптимальное применение лабораторных тестов для ранней диагностики, оценки активности, тяжести течения, прогноза болезни и эффективности терапии. Доказано, что среди лабораторных биомаркеров ИВРЗ наибольшее клиническое значение имеют аутоантитела и острофазовые биомаркеры. Однако в реальной практике показатели ДЧ и ДС лабораторных биомаркеров могут отличаться от таковых при исследовании специально отобранных групп пациентов и здоровых лиц. Поскольку большинство иммунологических лабораторных тестов имеют недостаточную специфичность, назначение и оценку результатов лабораторных исследований следует проводить в строгом соответствии с предполагаемым диагнозом и данными тщательного клинического исследования больных. Актуальной проблемой лабораторной диагностики ИВРЗ является стандартизация и клиническая валидация новых высокопроизводительных иммунологических и молекулярно-биологических методов определения биомаркеров, основанных на использовании автоматизированных систем и мультиплексных технологий.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.1.2. Лабораторные биомаркеры иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Наиболее характерными признаками ИВРЗ являются патологическая активация В-клеток и гиперпродукция органонеспецифических аутоантител. Основными диагностическими лабораторными маркерами ИВРЗ служат АНА, РФ, антитела к цитруллинированным белкам (АЦБ), аФЛ и антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА). Положительные или отрицательные результаты определения этих и ряда других антител, а также повышение уровней маркеров воспаления (СОЭ, СРБ, ферритина, КРП), снижение концентрации компонентов системы комплемента (СН50, С3, С4), гликозилированного ферритина, гематологические нарушения (гемолитическая анемия, лейкопения, лимфопения, тромбоцитопения, эозинофилия), биохимические изменения (повышение активности креатинфосфокиназы, альдолазы), криоглобулинемия и гипериммуноглобулинемия входят в число диагностических и классификационных критериев ИВРЗ и васкулитов (табл. 10.3).

**Таблица 10.3.** Лабораторные биомаркеры, включенные в диагностические и/или классификационные критерии иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Заболевание	Биомаркеры	Диагностические и/или классификационные критерии
РА	РФ, АЦБ, СОЭ, СРБ	Классификационные критерии ACR/EULAR 2010 г.
Болезнь Стилла	Нейтрофильный лейкоцитоз, СОЭ, СРБ, ферритин, гликозилированный ферритин, АНА, РФ, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП)	Классификационные критерии М. Yamaguchi и соавт. (1992), В. Fautrel и соавт. (2002)
СКВ	АНА, анти-дсДНК, анти-Sm, аКЛ (IgG, IgM, IgA), анти- $\alpha$ 2ГП-I (IgG, IgM, IgA), ВА, прямая проба Кумбса (в отсутствие гемолитической анемии), гипокомплементемия (СН50, С3, С4), гемолитическая анемия, лейкопения, лимфопения, тромбоцитопения	Классификационные критерии SLICC 2012 г.
ССД	АНА, анти-Scl-70, антицентромерные антитела (АЦА), антитела к РНК-полимеразе III	Классификационные критерии ACR/EULAR 2013 г.
БШ	Анти-SSA/Ro52, анти-SSA/Ro60, анти-SSB/La, РФ, АЦА	Классификационные критерии SICCA 2012 г.
ПМ/ДМ	Повышение активности креатинфосфокиназы и/или альдолазы в сыворотке крови, анти-Jo-1, СОЭ, СРБ	Диагностические критерии антисинтетазного синдрома 2003 г.
АФС	ВА, антитела к кардиолипину (аКЛ), анти- $\alpha$ 2ГП-I	Классификационные критерии (консенсус) 2006 г.
АНЦА-СВ	АНЦА, анти-ПРЗ, анти-МПО, эозинофилия	Классификационные критерии ACR/EULAR 2022 г.
ГКА	СОЭ $\geq 50$ мм/ч, СРБ $\geq 10$ мг/л	Классификационные критерии ACR/EULAR 2022 г.

Примечание. Анти-дсДНК — антитела, реагирующие с двуспиральной (нативной) ДНК.

Центральное место в лабораторной диагностике ИВРЗ занимают серологические тесты, направленные на обнаружение циркулирующих органонеспецифических аутоантител (АНА, РФ, АЦЦП, аФЛ, АНЦА) в сыворотках (или других биологических жидкостях) больных. Положительные результаты определения аутоантител:

- входят в число диагностических критериев системных ИВРЗ;
- играют важную роль в диагностике ИВРЗ на стадии предболезни и в дебюте заболевания;
- используются для оценки активности и прогноза;
- позволяют идентифицировать отдельные субтипы ИВРЗ;
- могут быть предикторами развития аутоиммунных РЗ у бессимптомных пациентов.

При ИВРЗ определение аутоантител проводится в первую очередь в целях подтверждения диагноза у пациентов, в том числе с недостаточным числом клинических критериев заболевания. Наличие аутоантител при отсутствии клинических признаков не является достаточным для определения диагноза ИВРЗ. Характерно нарастание частоты выявления аутоантител у лиц пожилого и старческого возраста, на фоне приема лекарственных препаратов, при вирусных и бактериальных инфекциях, злокачественных новообразованиях, у здоровых родственников больных аутоиммунными заболеваниями.

При оценке клинического значения аутоантител необходимо учитывать стойкость и выраженность их гиперпродукции. При большинстве инфекций, за исключением COVID-19, наблюдается умеренное транзиторное (3–6 мес) образование аутоантител. При ИВРЗ наблюдается их стойкая выраженная гиперпродукция.

Аутоантитела, специфичные только для одного ИВРЗ, встречаются очень редко. Для них характерна одномоментная гиперпродукция нескольких типов аутоантител, так называемый профиль аутоантител, который используется для диагностики ИВРЗ (табл. 10.4).

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

**Таблица 10.4.** Стандартные профили аутоантител для диагностики иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Заболевание	Профиль
СКВ	АНФ, анти-дсДНК, анти-Sm, анти-Ro/SS-A, анти-La/SS-B, антитела к рибонуклеопротеину (РНП), аФЛ, анти-C1q, проба Кумбса
РА	IgM/IgA РФ, АЦБ–АЦЦП, антитела к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ), антикератиновые антитела, антиперинуклеарный фактор, антифилагриновые антитела, анти-к Ra 33, BiP (P-68)
АФС	IgG/IgM аКЛ, IgG/IgM анти- $\alpha$ 2ГП-I, BA
ССД	Анти-Scl-70, АЦА, АНА (к анти-Th/To, аРНК-полимеразе III, аРМ-Scl, аU1 рНП, фибрилларину — аU3 рНП)
Синдром Шегрена	aSSA/Ro52, aSSA/Ro60, aSSB/La, РФ, АНА
ПМ/ДМ	Антитела к аминоксилсинтетазам тРНК — Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS; антитела к SRP (частицы сигнального распознавания), Mi-2, РМ-Scl, KJ
СВ	цАНЦА, пАНЦА, анти-РРЗ, анти-МПО

Примечание. цАНЦА — антинейтрофильные цитоплазматические антитела с цитоплазматическим типом иммунофлюоресцентного свечения; пАНЦА — антинейтрофильные цитоплазматические антитела с перинуклеарным типом свечения.

*Рекомендации по кратности определения аутоантител.* При определении кратности исследований лабораторных биомаркеров должны учитываться: стадия заболевания, уровни позитивности аутоантител, связь с активностью и участие в патогенезе заболевания, прогностическое значение обострения, тяжесть течения, прогрессирования заболевания, эффективность терапии, вероятность сероконверсии на фоне проводимой терапии.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2. Антитела при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Среди всех аутоантител, рассматриваемых в качестве маркеров ИВРЗ, основное место занимают АНА, которые уже более 60 лет широко используются в клинической практике. АНА — гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с разными компонентами ядра. АНА являются ключевым иммунологическим маркером СКВ, БШ, ССД, системные заболевания соединительной ткани (СЗСД), ИВМ.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.1. Антиядерный фактор

АНА могут выявляться методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием клеток линии HEp-2 (НРИФ-HEp-2) или SSA/Ro60-трансфицированных клеток HEp-2000 (НРИФ-HEp-2000). В качестве субстрата применяются криостатные срезы мышинной или крысиной печени (почек). В этом случае их традиционно обозначают как АНФ. НРИФ-HEp-2 обладает высокой ДЧ, но ДС. Данный метод считается «золотым стандартом» первичного скринингового определения АНА в крови больных ИВРЗ.

*Диагностический диапазон при определении АНФ и дифференциация типов свечения.* Согласно совместному предложению Института клинической и лабораторной стандартизации (CLSI) EASI и IUIS аномальным следует считать титр АНФ выше значения 95-го перцентиля в здоровой местной популяции. EASI/IUIS и методические рекомендации Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики предлагают считать базовым скрининговым разведением сыворотки для взрослых пациентов 1:160 как оптимально отражающее соотношение ДЧ и ДС метода определения АНФ с помощью НРИФ-HEp-2. В тесте используется линия клеток HEp-2, которая имеет большие, легко визуализируемые ядра и содержит почти все клинически важные аутоантигены, что делает эти клетки удобными для обнаружения соответствующих АНА.

Метод НРИФ-HEp-2 позволяет обнаружить АНА, связавшиеся со специфическими внутриклеточными структурами. Это было основой классифицировать окрашивания с использованием консенсусной номенклатуры и репрезентативных моделей, предложенных Международным консенсусом по моделям окрашивания АНА (ICAP), которые отражают степень связывания или титр по интенсивности флюоресценции. Характер типа свечения выявляет присутствие разных АНА в сыворотке крови. Тип свечения АНФ обусловлен аутоантигенами, которые реагируют с антигенами, расположенными в ядре и цитоплазме клеток линии HEp-2. Номенклатура типов ядерного, цитоплазматического и митотического свечения, разработанная ICAP, включает 30 вариантов с описанием их клинического значения. Информация об основных характеристиках, а также клинических ассоциациях типов свечения АНФ размещена на интернет-ресурсе [www.ANAPatterns.org](http://www.ANAPatterns.org). В классификационной схеме АНФ типы свечения обозначены буквенно-цифровым кодом #AC (anti-cell pattern) и подразделены на ядерные, цитоплазматические и митотические группы. В России под эгидой Российского научного общества иммунологов была проведена адаптация номенклатуры ICAP. Выделенные типы свечений могут быть правильно определены только экспертами, специализирующимися на диагностике аутоиммунных заболеваний, так как в рутинных лабораториях в связи с отсутствием должного опыта зачастую неверно интерпретируют результаты определения АНФ, в особенности цитоплазматические и митотические типы.

Среди ядерных свечений наибольшее диагностическое значение имеют типы AC-3 и ядерное гомогенное (AC-1), наименьшее — AC-2 (DFS-70). Наибольшее диагностическое значение при ИВРЗ имеют такие типы свечения ядра, как центромерный (AC-3), гомогенный (AC-1), мелкокрапчатый (AC-4), крупнокрапчатый (AC-5), нуклеолярный гомогенный, нуклеолярный глыбчатый, нуклеолярный точечный (AC-8, -9, -10), множественные точки в ядре (AC-6), а из цитоплазматических — плотный мелкокрапчатый (AC-19) и мелкокрапчатый (AC-20). Все типы свечения, кроме центромерного (AC-3), нуждаются в подтверждении антиген-специфичными тестами.

Отдельное внимание следует уделять типу AC-2 [плотное мелкокрапчатое (анти-DFS-70) свечение] в связи с крайней сложностью его визуальной верификации. Определение антител к DFS-70 должно в обязательном порядке подтверждаться антиген-специфичным тестом.

*Аналитические характеристики определения АНФ.* Результат исследования АНФ содержит информацию о конечном титре АНА, а также о типе свечения ядра. У пациентов с положительными результатами определения АНФ рекомендуется проведение подтверждающих тестов на специфические АНА и антитела к отдельным экстрагируемым ядерным антигенам. Экстрагируемые ядерные антигены — исторический термин, возникший в результате экстрагирования антигенов из клетки в изотонический раствор натрия хлорида перед тестированием. Для их определения необходимо использовать другие методы — ИФА, иммуноблот и мультиплексный иммунный анализ, которые позволяют обнаруживать как отдельные АНА, так и одновременно широкий спектр аутоантител, включенных в классификационные критерии СКВ [антитела, реагирующие с двуспиральной (нативной) ДНК — анти-дсДНК, анти-Sm], БШ (анти-SSA/Ro), ССД (анти-топоизомераза-I/ScI70, CENP-B, РНК-полимераза III), СЗСД (анти-U1-RNP) и ИВМ (анти-Jo1)].

Диагностическая точность ИФА, иммуноблота, мультиплексного анализа варьирует в зависимости от фирмы-производителя тест-системы, в ряде случаев результаты представлены полуколичественно. Данные методы показывают высокую ДС и низкую ДЧ по сравнению с НРИФ-HEp-2, они увеличивают процент ложноотрицательных и ложноположительных результатов и не могут заменить тестирование АНА с помощью НРИФ. Использование твердофазных анализов в качестве первоначального теста для обнаружения АНА имеет определенные ограничения, поскольку число аутоантигенов, включаемых в твердофазные анализы, ограничено по сравнению с количеством, присутствующим в HEp-2-клетках, что тем самым приводит к снижению ДЧ-теста.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Некоторые типы АНА — АЦА, антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen — PCNA), антитела к митотическому аппарату клетки (nuclear mitotic apparatus — NUMA) — обнаруживаются только методом НРИФ на HEp-2-клетках. Напротив, антитела к экстрагируемым ядерным антигенам, в частности



анти-SSA/Ro, рибосомальному белку Р и антиJo-1, не выявляются методом НРИФ-Нер-2. При отрицательных результатах определения данных антител в НРИФ-Нер-2, но высокой вероятности наличия у больного СКВ, БШ, неонатальной волчанки, врожденной поперечной блокады сердца или ПМ/ДМ следует использовать альтернативные иммунохимические методы их идентификации. Вероятность наличия ИВРЗ возрастает вместе со степенью позитивности результатов выявления АНА любым из методов. Поскольку ни один из методов определения АНА не обладает идеальными диагностическими характеристиками, для увеличения ДЧ и ДС оптимальным является использование НРИФ-Нер-2 и подтверждающих методик.

*Недостатками обнаружения АНФ* в НРИФ-Нер-2 являются трудоемкость, длительная подготовка специалистов, субъективность при распознавании титров и образов. Кроме того, картина окрашивания не идентифицирует ответственные аутоантитела.

*Автоматизированные диагностические платформы* для определения АНФ методом НРИФ показывают хорошую согласованность ( $\approx 94\%$ ) с визуальной интерпретацией результатов НРИФ-Нер-2. Эти системы достаточно стабильно определяют простые типы при высокой интенсивности свечения препарата, однако низкая флюоресценция АНФ заметно ухудшает качество диагностики с использованием автоматизированных платформ. Имеются существенные проблемы в распознавании отдельных ядерных и митотических паттернов, а также практически всех цитоплазматических и смешанных типов свечения. Возможностей автоматического анализа изображений недостаточно, чтобы заменить ручную микроскопическую интерпретацию. Данные методы целесообразно использовать на первичном этапе сортировки результатов определения АНФ на отрицательные и положительные.

*Клинико-диагностическое значение АНФ.* Тестирование АНФ высокоэффективно для диагностики СКВ и ССД, полезно для диагностики БШ, ассоциирующей с СКВ, менее эффективно для диагностики ПМ/ДМ. АНФ является очень полезным маркером для диагностики, оценки прогноза и мониторинга течения раннего ювенильного идиопатического артрита в сочетании с увеитом и вторичного феномена Рейно, ассоциирующегося с системными РЗ. Положительные результаты определения АНФ не имеют доказанного диагностического и прогностического значения при РА, рассеянном склерозе, заболеваниях ЩЖ, инфекциях, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и фибромиалгии. Изолированное обнаружение АНФ у здорового человека имеет низкую положительную прогностическую ценность, которую необходимо интегрировать с другими лабораторными параметрами и факторами риска пациента.

*Показаниями к определению АНФ* являются: артрит в сочетании с лихорадкой, гломерулонефрит, необъяснимое системное заболевание, цитопении, необъяснимая патология ЦНС, полисерозит, сухой кератоконъюнктивит и ксеростомия, феномен Рейно, пальпируемая пурпура.

Особенности выявления АНА.

1. Больным, имеющим высокую клиническую вероятность аутоиммунного заболевания, тестирование на АНА проводят:
  - а) один раз в жизни у лиц со стабильными симптомами;
  - б) повторное тестирование необходимо только в случае значительного изменения симптомов болезни.
2. При наличии у больных в сыворотке крови повышенного титра АНФ или аномальных иммунологических показателей, коррелирующих с клиническими проявлениями определенного ИВРЗ, проводится панельное тестирование на выявление специфических аутоантител к экстрагируемым ядерным антигенам.
3. У больных с первоначальным положительным АНФ и диагнозом СКВ определение анти-дсДНК проводится до 4 раз в год.
4. У больных с отрицательным или низкоположительным титром АНФ необходимо определение специфических аутоантител:
  - а) анти-Jo-1 при подозрении на ИВМ;
  - б) анти-SSA при подозрении на СКВ или БШ.
5. Мониторинг активности заболевания не проводится с помощью повторного определения АНФ или оценки его титра.
6. Исследование на АНФ или антитела к экстрагируемым ядерным антигенам не проводится у лиц без симптомов, характерных для аутоиммунных РЗ, а также при отсутствии отклонений от нормы при проведении общего осмотра.
7. Для всех остальных ситуаций, кроме описанных выше, при отсутствии АНФ тестирование специфических антител не проводится.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.2. Специфические антиядерные антитела

Специфические антиядерные антитела определяются иммунохимическими методами.

*Антитела к ДНК* подразделяются на два основных типа: анти-дсДНК и антитела, реагирующие с односпиральной (денатурированной) ДНК.

Анти-дсДНК являются серологическим маркером СКВ. Они более специфичны для диагностики СКВ, чем антитела к односпиральной ДНК, которые присутствуют в сыворотках больных при других ИВРЗ и не имеют существенного диагностического значения. Стандартными методами определения анти-дсДНК в сыворотке крови служат ИФА, НРИФ с использованием в качестве субстрата *Crithidia luciliae* и РИА. Скрининговым для анти-дсДНК является метод ИФА.

*Клиническое значение.* Тестирование анти-дсДНК значимо для диагностики СКВ у пациентов с положительными результатами определения АНФ. Наличие анти-дсДНК является обязательным диагностическим критерием СКВ. Их определение при СКВ полезно для оценки активности патологического процесса и поражения почек.

**Антитела к гистонам.** Гистоны — основные белковые компоненты ядра клетки, которые подразделяются на пять классов (H1, H2A, H2B, H3, H4). Стандартными методами определения антител к гистонам в сыворотке крови является ИФА. Определение антител к гистонам полезно для диагностики волчаночноподобного синдрома, связанного с приемом лекарственных препаратов.

**Антитела к нуклеосомам** (антихроматиновые антитела, антитела к дезоксирибонуклеопротеину) взаимодействуют с эпитопами комплекса H2A–H2B–ДНК. Стандартными методами определения антител к нуклеосомам в сыворотке крови являются ИФА, иммуноблот. Определение IgG-антител к нуклеосомам может быть полезно для диагностики СКВ и лекарственной волчанки, индуцированной прокаинамидом (Новокаинамидом<sup>▲</sup>). Обнаружение антител к нуклеосомам ассоциируется с поражением почек при СКВ и развитием АИГ 1-го типа.

**Антитела к Sm-антигену (Smith).** Sm-антиген состоит из пяти малых ядерных РНК (U1, U2, U4, U5, U6), связанных с 11 полипептидами и более (70 kD, A, B/B', C, C', D, E, F, G). При СКВ анти-Sm реагируют с B/B'- и D-полипептидами, общими для U1, U2, U4/U6 малых ядерных рибонуклеопротеинов (РНП), участвующих в сплайсинге предшественника мРНК. Стандартными методами определения анти-Sm в сыворотке крови являются ИФА, иммуноблот, двойная иммунодиффузия и капиллярный электрофорез. Положительные результаты определения анти-Sm являются специфичным серологическим маркером и диагностическим критерием СКВ. Не применяются для оценки активности и характеристики субтипов заболевания. Исследование проводят один раз в жизни.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.3. Склеродермические аутоантитела

Склеродермические аутоантитела — группа аутоантител, с высокой (80–90%) частотой выявляемых при различных вариантах ССД. К ним относятся АЦА, анти-Scl-70 и антинуклеоллярные антитела.

**АЦА** распознают более шести центромерных нуклеопротеинов (A–F). Стандартным методом определения АЦА в сыворотке крови является НРИФ с помощью Нер-2-клеток (дискретный крапчатый тип свечения).

Исследование АЦА методами ИФА не рекомендуется для широкого применения, так как диагностическая точность данных тестов недостаточно изучена. Выявление АЦА полезно для диагностики ССД. Исследование проводят один раз в жизни.

**Анти-Scl-70** реагируют с топоизомеразой I (основной негистоновый хромосомный белок с молекулярной массой 70 кДа). Стандартными методами определения анти-Scl-70 в сыворотке крови являются двойная иммунодиффузия и иммуноблот. ИФА имеет более низкую специфичность для диагностики ССД. Определение анти-Scl-70 является полезным тестом для диагностики ССД. Исследование проводят один раз в жизни.

**Антинуклеоллярные антитела** — гетерогенная группа аутоантител, характеризующихся нуклеоллярным типом свечения при исследовании методом НРИФ. Антинуклеоллярные антитела включают антитела к PM-Scl, U3-РНП, Th/To и семейству РНК-полимераз 1, 2, 3. Для выявления различных антинуклеоллярных антител в сыворотке крови используют методы иммунопреципитации, двойную иммунодиффузию и иммуноблот. Антинуклеоллярные антитела имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность при ССД. Исследование проводят один раз в жизни. Клиническое значение группы склеродермических аутоантител будет представлено в разделе, посвященном ССД.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.4. Ревматоидные факторы

РФ — аутоантитела классов IgM, IgA и IgG, реагирующие с Fc-фрагментом IgG. Наибольшее значение в клинической практике имеет определение IgM РФ. Стандартными методами определения IgM РФ служат реакция агглютинации сенсibilизированных IgG частиц латекса (латекс-тест) или эритроцитов барана (реакция Ваалера–Роузе), иммунотурбидиметрия, иммунонефелометрия и ИФА. Рекомендуются количественные методы измерения IgM РФ в международных единицах (МЕ/мл) в сыворотке крови (иммунотурбидиметрия, иммунонефелометрия, ИФА). Применение латекс-теста позволяет выявлять IgM РФ, присутствующий в сыворотке крови только в умеренной или высокой концентрации. Положительные результаты определения полуколичественными методами (латекс-агглютинация), даже в высоких титрах, всегда должны рассматриваться как низкوپоложительные. Клиническое значение данных аутоантител будет представлено в разделе, посвященном РА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.5. Антитела к цитруллинированным белкам

АЦБ — гетерогенная группа аутоантител, которые распознают антигенные детерминанты филлагрина и других белков, содержащих атипичную аминокислоту цитруллин, образующуюся в результате посттрансляционной модификации остатков аргинина под действием фермента пептидиларгининдеиминазы. Семейство АЦБ включает АЦЦП, антиперинуклеарный фактор, антикератиновые антитела, антифиллагриновые антитела, антитела к цитруллинированному фибриногену и АМЦБ. АЦБ обладают высокой ДС при РА. Среди АЦБ ведущую роль

в клинической практике имеет определение АЦЦП, которые являются наиболее стандартизованным маркером для ранней диагностики и оценки прогноза РА. Стандартными методами определения АЦЦП в сыворотке крови служит ИФА с использованием в качестве антигена синтетических циклических цитруллинированных пептидов II и III поколения, имеющих высокую связывающую активность в отношении широкого спектра антител, ассоциирующихся с РА (АЦЦП<sub>2</sub> и АЦЦП<sub>3</sub>), а также хемилюминесцентный анализ на основе микрочастиц и электрохемилюминесцентный анализ. В качестве скринингового теста может применяться полуколичественный иммунохроматографический экспресс-метод. Клиническое значение РФ и АЦБ будет представлено в разделе, посвященном РА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.6. Антифосфолипидные антитела

аФЛ — гетерогенная популяция аутоантител, распознающих антигенные детерминанты анионных и нейтральных фосфолипидов, и комплексные эпитопы, образующиеся в процессе взаимодействия фосфолипидов и фосфолипидсвязывающих белков плазмы крови. аФЛ являются серологическим маркером АФС и фактором риска развития тромботических осложнений и акушерской патологии. В число лабораторных диагностических критериев АФС входят положительные результаты обнаружения аКЛ классов IgG/IgM, антител к  $\beta$ 2ГП-I классов IgG/IgM и ВА. Стандартными методами определения аФЛ являются ИФА (аКЛ и анти- $\beta$ 2ГП-I) и фосфолипидзависимые коагуляционные тесты (ВА).

IgG/IgM аКЛ должны определяться в сыворотке в титрах, превышающих 40 GPL/MPL (1 единица GPL/MPL соответствует фосфолипидсвязывающей активности 1 мкг/мл IgG/IgM аКЛ) или 99-й перцентиль у здоровых доноров, в двух исследованиях и более с интервалом не менее 12 нед с помощью стандартного ИФА, позволяющего выявлять  $\beta$ 2ГП-I-зависимые аКЛ.

Верхний предел референсного интервала при определении IgG аКЛ в сыворотке крови варьирует от 4 до 30 GPL; IgM аКЛ — от 3 до 20 MPL в зависимости от изготовителя наборов реагентов. Рекомендуются верхний предел референсного интервала для аФЛ соответствует 95-му перцентилю. Рекомендуется выделение негативных ( $\leq$  верхнего предела референсного интервала), низкопозитивных (между 95-м и 99-м перцентильями), умеренно позитивных (99-й перцентиль — 80 GPL/MPL) и высокопозитивных ( $>80$  GPL/MPL) уровней аКЛ.

IgG/IgM анти- $\beta$ 2ГП-I должны определяться в сыворотке с помощью стандартного ИФА в титрах, превышающих 99-й перцентиль у здоровых доноров, в двух исследованиях и более с интервалом не менее 12 нед. Верхний предел референсного интервала при определении анти- $\beta$ 2ГП-I в сыворотке крови варьирует от 4 до 20 ЕД/мл в зависимости от производителя набора реагентов. Рекомендуются верхний предел референсного интервала для аФЛ соответствует 95-му перцентилю.

ВА должен определяться в плазме в двух исследованиях или более с интервалом не менее 12 нед в фосфолипидзависимых коагуляционных тестах стандартным методом, включающим несколько этапов:

- удлинение фосфолипидзависимого свертывания крови при использовании скрининговых коагуляционных тестов (АЧТВ, каолиновый тест, тест с ядом гадюки Рассела);
- отсутствие нормализации времени свертывания в скрининговых тестах при смешивании с нормальной, лишенной тромбоцитов плазмой;
- нормализация удлиненного времени свертывания крови при добавлении избытка фосфолипидов;
- исключение других коагулопатий (наличия в крови ингибиторов фактора VIII или гепарина).

Положительные результаты определения IgG аКЛ и IgM аКЛ имеют умеренную чувствительность, но низкую специфичность для диагностики АФС. ВА и IgG/IgM анти- $\beta$ 2ГП-I являются более специфичными, но менее чувствительными диагностическими маркерами АФС.

Клиническое значение аФЛ будет представлено в разделе, посвященном АФС.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.2.7. Антинейтрофильные цитоплазматические антитела

АНЦА — гетерогенная популяция аутоантител, реагирующих с ферментами цитоплазмы нейтрофилов. При использовании НРИФ выделяют АНЦА с цитоплазматическим типом иммунофлюоресцентного свечения, которые дают диффузный цитоплазматический гранулярный тип свечения с большей интенсивностью по направлению к ядру нейтрофилов, чем к периферии, и реагируют с протеиназой 3. АНЦА с перинуклеарным типом свечения характеризуются перинуклеарным типом свечения и, как правило, направлены против МПО. Перинуклеарный тип свечения расценивается как артефакт, связанный с фиксацией нейтрофилов этанолом, приводящей к перераспределению положительно заряженных белков (МПО, лизоцима, эластазы, катепсина G, лактоферрина) вокруг отрицательно заряженной мембраны ядра, что может давать свечение, напоминающее АНФ. При определении АНЦА с перинуклеарным типом свечения методом НРИФ необходимо исследование соответствующих контролей с фиксированными формальдегидом (Формалином<sup>▲</sup>) нейтрофилами и с Нер-2-клетками. На фиксированных формальдегидом (Формалином<sup>▲</sup>) нейтрофилах АНА дают характерное ядерное свечение, а АНЦА с перинуклеарным

типом свечения — цитоплазматическое гранулярное. Атипичные АНЦА характеризуются диффузным мелкокрапчатым, гомогенным или линейным цитоплазматическим типом свечения, направленным к неизвестным цитоплазматическим белкам.

АНЦА являются серологическим маркером СВ, поражающих сосуды среднего и мелкого калибра (АНЦА-СВ), к которым относятся гранулематоз с полиангиитом, микроскопический полиангиит и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом. Стандартными методами определения АНЦА являются ИФА и НРИФ с использованием фиксированных этанолом нейтрофилов. При подозрении на АНЦА-СВ метод НРИФ не рассматривается в качестве первичного скринингового теста. Рекомендуется сразу начинать исследование сывороток больных на наличие антител против протеиназы 3 и против МПО методом ИФА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.3. Лабораторные маркеры воспаления

Для оценки активности воспаления, характера прогрессирования и прогноза исходов ИВРЗ, а также эффективности противовоспалительной терапии чаще всего определяются СОЭ и концентрация СРБ.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.3.1. Скорость оседания эритроцитов при иммуновоспалительных заболеваниях

СОЭ — чувствительный, но неспецифичный и нестабильный маркер системного воспаления. Рекомендуется международный метод определения СОЭ по Вестергрену. Увеличение СОЭ служит лабораторным классификационным критерием РА. Повышение СОЭ более 35 мм/ч является диагностическим признаком РПМ; повышение более 50 мм/ч является классификационным критерием ГКА. Определение СОЭ может быть полезно для оценки активности воспаления: используется при подсчете индекса SDAI PMR (simplified disease activity index polymyalgia rheumatica), индекса DAS28 при РА. На фоне терапии иИЛ6 или ирИЛ6 использование индекса DAS28-СОЭ представляется более предпочтительным, чем DAS28-СРБ.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.3.2. С-реактивный белок при иммуновоспалительных заболеваниях

СРБ — классический острофазовый белок плазмы крови, который рассматривается как наиболее чувствительный лабораторный маркер инфекции, воспаления и тканевого повреждения. В зависимости от цели исследования определение концентрации СРБ проводится классическими или высокочувствительными методами. Методы количественного анализа СРБ в сыворотке крови, включая радиальную иммунодиффузию, иммунотурбидиметрию и иммунонефелометрию, предназначены для выявления повышенного уровня СРБ при остром воспалении и тканевом повреждении в пределах диапазона концентраций 5–500 мг/л. Анализ высокочувствительного СРБ, основанный на усилении аналитической чувствительности иммунохимических методов, позволяет измерять концентрации СРБ ниже 5 мг/л и используется для оценки базального уровня СРБ и связанного с ним кардиоваскулярного риска. В норме у здоровых доноров концентрация СРБ в сыворотке крови составляет у 50% до 0,8 мг/л, у 90% — до 3 мг/л, у 99% — до 10 мг/л. При этом индивидуальная базальная концентрация СРБ достаточно стабильна и не подвержена циркадным колебаниям. Нормальный уровень СРБ у взрослых составляет менее 5 мг/л, однако значения, превышающие 3 мг/л, могут указывать на риск развития кардиоваскулярной патологии.

*Клиническое значение.* СРБ является лабораторным классификационным критерием РА. Определение уровня СРБ — полезный тест для оценки активности патологического процесса у больных ИВРЗ, в том числе при подсчете индексов активности DAS28-СРБ и SDAI. Повышение уровня СРБ более 10 мг/л является классификационным критерием ГКА. СРБ используется при мониторинговании и контроле за эффективностью терапии интеркуррентных инфекций при СКВ, ССД, ДМ и других РЗ с незначительным повышением или нормальным уровнем СРБ.

Увеличение базальной концентрации СРБ является предиктором развития деструктивных поражений суставов при раннем РА. При АС рекомендуется использовать высокочувствительный СРБ, коррелирующий с клиническими параметрами воспалительной активности заболевания. Увеличение сывороточной концентрации СРБ отмечено у 50–54% больных АС и входит в число классификационных критериев ASAS для аксиального спондилоартрита. Базальный уровень СРБ, определяемый высокочувствительным методом, имеет большое значение для стратификации больных ИВРЗ по степени кардиоваскулярного риска. Базальная концентрация СРБ, определяемого высокочувствительным методом, менее 1 мг/л соответствует низкому, 1–3 мг/л — среднему, более 3 мг/л — высокому кардиоваскулярному риску. Уровень СРБ, определяемого высокочувствительным методом, от 3 до 10 мг/л ассоциируется с субклиническим воспалением, а более 10 мг/л — с системным персистирующим воспалением. В реальной клинической практике ревматологов в терапии РА, ГКА широко применяются генно-инженерные биологические препараты (ириЛ6, иИЛ6) и таргетные противовоспалительные препараты (ингибиторы янус-киназы), противовоспалительный эффект которых реализуется через подавление провоспалительных свойств ИЛ-6. Это накладывает определенные ограничения на использование для мониторинга эффективности проводимой терапии

реагентов острой фазы, в основном СРБ и в меньшей мере — СОЭ. С этой целью рассматривается применение других биологических маркеров — КП, пентраксина-3, белка S100, независимых от влияния IL-6.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.3.3. Кальпротектин

КП — нековалентный гетеродимер с молекулярной массой 36,5 кДа, состоящий из двух белковых кальцийсвязывающих молекул S100A8 и S100A9 (MRP14/MRP8, кальгранулин А/В). КП содержит цинксвязывающие домены, благодаря чему обладает антимикробной активностью. MRP14/MRP8 — основной внутриклеточный белок нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, в цитозоле которых его содержание составляет 40–60% общего количества протеинов. Он практически отсутствует в цитоплазме лимфоцитов. КП является эндогенным лигандом TLR-4; способствует развитию воспалительного процесса. КП — важный медиатор многих регуляторных функций, таких как хемотаксис, активация дегрануляции и фагоцитоза нейтрофилов, ингибция синтеза Ig, пролиферации и дифференцировки клеток.

Уровень КП в СЖ пациентов с РА выше по сравнению с больными остеоартрозом. Учитывая низкую молекулярную массу молекулы КП (36,5 кДа), он может легко диффундировать из мест воспаления и определяться в периферическом кровотоке. Период полураспада КП в плазме составляет около 5 ч. Предполагается, что КП является потенциально более чувствительным биомаркером активности заболевания при РЗ, чем СОЭ и СРБ, поскольку он непосредственно отражает воспаление в синовиальной оболочке. Продемонстрирована роль КП в мониторинге активности РА, выявлении субклинического воспаления и прогнозировании обострений заболевания, а также оценке эффективности терапии генно-инженерными и таргетными противовоспалительными препаратами. Мониторирование уровня КП может быть полезным для выявления «остаточного» воспаления у пациентов в состоянии ремиссии / низкой активности болезни.

При АС уровень сывороточного КП положительно коррелирует со значениями СОЭ и СРБ, но не с индексами активности заболевания BASDAI и ASDAS. Повышение базального уровня сывороточного КП служит независимым предиктором быстрого рентгенологического прогрессирования псориатического артрита. Показано снижение его концентрации на фоне терапии АС. КП может служить предиктором ответа на лечение моноклональными антителами к ИЛ17А (секукинумаб).

Другие лабораторные биомаркеры ИВРЗ (цитокины, маркеры активации эндотелия, Ig, иммунные комплексы, криоглобулины, компоненты системы комплемента, субпопуляции лимфоцитов, генетические маркеры, показатели метаболизма костной и хрящевой ткани, маркеры апоптоза) имеют меньшее клиническое значение по сравнению с аутоантителами и показателями острой фазы воспаления. Они могут быть полезными для мониторингирования активности заболевания и прогнозирования эффективности проводимой терапии, но пока нет рекомендаций по их использованию в клинической практике.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.4. Ревматоидный артрит

РА — аутоиммунное ИВРЗ неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением внутренних органов, приводящее к ранней инвалидности и сокращению продолжительности жизни пациентов. РА является частым и одним из наиболее тяжелых ИВРЗ с распространенностью в разных географических зонах от 0,5 до 2%. Пик заболеваемости приходится на возраст 40–55 лет, соотношение женщин и мужчин — 3:1.

Для постановки диагноза применяются классификационные критерии ACR/EULAR 2010 г., среди которых важное место занимают данные лабораторных методов исследования (табл. 10.5).

Таблица 10.5. Классификационные критерии ревматоидного артрита (ACR/EULAR, 2010)

Результаты обследования	Баллы
А. Клинические признаки поражения суставов (припухлость и/или болезненность при объективном обследовании) (0–5 баллов): <input type="checkbox"/> 1 крупный сустав; <input type="checkbox"/> 2–10 крупных суставов; <input type="checkbox"/> 1–3 мелких сустава (крупные суставы не учитываются); <input type="checkbox"/> 4–10 мелких суставов (крупные суставы не учитываются); <input type="checkbox"/> >10 суставов (как минимум 1 мелкий сустав)	0 1 2 3 5
В. Результаты лабораторных методов определения РФ и АЦЦП (0–3 балла; требуется положительный результат как минимум одного метода): <input type="checkbox"/> отрицательные; <input type="checkbox"/> слабоположительные для РФ или АЦЦП (превышают верхнюю границу референтного диапазона, но не более чем в 3 раза); <input type="checkbox"/> высокоположительные для РФ или АЦЦП (превышают верхнюю границу референтного диапазона более чем в 3 раза)	0 2 3

С. Результаты лабораторных методов определения острофазовых показателей (0–1 балл; требуется положительный результат как минимум одного метода): <input type="checkbox"/> нормальные значения СОЭ и СРБ; <input type="checkbox"/> повышение СОЭ или СРБ	0 1
Д. Длительность артрита (0–1 балл): <input type="checkbox"/> <6 нед; <input type="checkbox"/> ≥6 нед	0 1

Для поставки диагноза РА необходимо выявить не менее шести признаков из 10 возможных по четырем позициям (6 из 10 баллов), характеризующих поражение суставов, и лабораторные нарушения, характерные для РА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.4.1. Лабораторное исследование

РФ и АЦЦП — основные диагностические лабораторные биомаркеры РА. Повышение СОЭ и СРБ отражает локальный и системный воспалительный процесс при РА. Эти показатели входят в число классификационных критериев РА (ACR/EULAR, 2010) (см. табл. 10.5), в сумме могут составлять до 4 баллов из необходимых 6 баллов для постановки диагноза. СОЭ и СРБ являются также компонентами индексов активности РА (DAS28-СОЭ, DAS28-СРБ, SDAI). На основании выявления IgM РФ и АЦЦП в сыворотке крови принято подразделение РА на два субтипа — серопозитивный и серонегативный, которые имеют определенные различия в продукции цитокинов как на ранней, так и на развернутой стадии болезни.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.4.2. Аутоантитела при ревматоидном артрите

В сыворотке и СЖ больных РА выявляют широкий спектр аутоантител с разной специфичностью, объединенных показателем РФ классов IgM, IgA и IgG:

- АЦБ — антиперинуклеарный фактор, антикератиновые антитела, антифиллагриновые антитела, антитела к цитруллинированному фибриногену, АЦЦП, АМЦВ, антитела к цитруллинированной  $\alpha$ -энолазе;
- антитела к карбамилированным белкам (анти-Карб);
- антитела к пептидил-аргинин-деаминазе (ПАД);
- другие антитела (к RA-33/hnRNP-A2, Ig-связывающему белку Vир/p68, глюкозо-6-фосфат-изомеразе, кальпастину, коллагену типа II, негистоновым хромосомальным белкам HMG1/2).

*Клиническое значение.* IgM РФ и АЦЦП являются основными диагностически значимыми лабораторными маркерами РА.

**IgM РФ** — чувствительный, но недостаточно специфичный показатель, так как может обнаруживаться в сыворотках при других РЗ, хронических инфекциях, болезнях легких, злокачественных новообразованиях, первичном билиарном циррозе и в пожилом возрасте. Определение IgM РФ в высоких концентрациях полезно для прогнозирования быстро прогрессирующего деструктивного поражения суставов и системных проявлений при РА. Тестирование IgM РФ позволяет прогнозировать эффективность терапии генно-инженерными препаратами у больных РА. Серопозитивность по IgM РФ и высокий уровень этого маркера в крови до начала лечения рассматриваются в качестве предиктора эффективности терапии при РА. Наличие в сыворотке крови больных РА изотипа IgM РФ имеет наивысшее диагностическое отношение шансов выявления именно РА (21,7; 95% диагностический интервал — от 16,1 до 29,3).

**IgA РФ** часто обнаруживается при РА с полиартикулярным вариантом начала заболевания и внесуставными (системными) проявлениями. Обнаружение IgA РФ может обладать определенной прогностической ценностью в отношении развития тяжелой эрозивной деструкции суставов. Выявление изотипа IgA обладает наибольшей специфичностью и положительным коэффициентом правдоподобия для диагностики РА.

При РА одновременное обнаружение любого изотипа РФ имеет самую высокую ДЧ по сравнению с выявлением любой другой патологии, при которой может быть повышен РФ.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.4.3. Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

**АЦЦП** — более высокоспецифичный, чем IgM РФ, серологический маркер РА, особенно на ранней стадии болезни. Определение АЦЦП полезно для диагностики раннего РА, дифференциальной диагностики с другими РЗ, прогнозирования тяжелого эрозивного поражения суставов. Определение АЦЦП имеет важное значение для диагностики серонегативного по IgM РФ РА (частота обнаружения АЦЦП у IgM РФ-отрицательных больных РА составляет 20–40%), прогнозирования тяжелого эрозивного поражения суставов и риска кардиоваскулярных

осложнений. Тестирование АЦЦП позволяет прогнозировать эффективность терапии у больных РА. Серопозитивность по АЦЦП и высокий уровень этого маркера в крови до начала лечения рассматриваются в качестве предиктора хорошего ответа на терапию при РА.

Проспективные исследования показывают, что IgM РФ и АЦЦП могут быть предикторами развития РА, обнаруживаясь в сыворотках у 28–50% здоровых лиц за 10–14 лет до появления первых клинических симптомов заболевания, что расширяет перспективы ранней диагностики РА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.4.4. Антитела к модифицированному цитруллинированному виментину

АМЦВ имеют достаточно высокую чувствительность для диагностики РА, при этом более низкую специфичность по сравнению с АЦЦП. Положительные результаты определения АМЦВ в сыворотке крови служат дополнительным диагностическим маркером РА при отрицательных результатах определения IgM РФ и АЦЦП. АМЦВ являются полезным маркером для прогнозирования тяжелого эрозивного поражения суставов у больных РА.

Основные диагностические характеристики IgM РФ, АЦЦП и АМЦВ представлены в **табл. 10.6**. Диагностическая эффективность лабораторного теста, оцениваемая на основе ДЧ и ДС, выражается в площади, ограниченной характеристической ROC-кривой. Качество теста оценивается как «отличное», если этот показатель находится в диапазоне 0,9–1,0, и как «очень хорошее», если он в диапазоне 0,8–0,9. Исходя из данных **табл. 10.6**, IgM РФ и АЦЦП — очень хорошие тесты, АМЦВ — отличный тест для диагностики РА.

**Таблица 10.6.** Диагностические характеристики иммуноглобулин М-ревматоидного фактора, антител к циклическому цитруллинированному пептиду и антител к модифицированному цитруллинированному виментину при ревматоидном артрите

Показатель	IgM РФ	АЦЦП	АМЦВ
Диагностическая чувствительность, %	67	71	83
Диагностическая специфичность, %	79	87	81
Интервал площади, ограниченной ROC-кривой	0,8	0,8	0,9

IgM РФ и АЦЦП рассматриваются как разные группы аутоантител. В зависимости от иммунологических нарушений (наличия РФ и АЦЦП) выделяют два подтипа заболевания — серонегативный и серопозитивный РА.

Иммунологические субтипы различаются по факторам риска, иммунопатогенезу и характеру течения заболевания. Повышение концентрации IgM РФ коррелирует с острофазовыми показателями СОЭ и СРБ и в большей степени отражает активность воспаления, чем АЦЦП. В свою очередь, АЦЦП в меньшей степени зависит от клинической и лабораторной активности заболевания и ассоциируется с более тяжелым течением заболевания, а также ускоренным прогрессированием деструктивных изменений суставов. Иммунопатогенетические особенности АЦЦП-негативного варианта РА мало изучены из-за гетерогенности его подтипов и сложности выявления единого механизма развития патологии.

Оценка уровня аутоантител имеет большое значение для прогнозирования эффективности терапии современными генно-инженерными биологическими препаратами. При отсутствии терапии базисными противовоспалительными препаратами в эффективных дозах серопозитивность по РФ и АЦЦП (особенно высокие уровни аутоантител и одномоментное обнаружение РФ и АЦЦП в сыворотках больных) считается наиболее важным фактором неблагоприятного прогноза РА.

При этом серопозитивность по IgM, IgA и IgG РФ и АЦЦП до начала лечения является предиктором хорошего ответа на терапию генно-инженерными биологическими препаратами. Прогностическая ценность IgM РФ и АЦЦП зависит от исходного уровня этих аутоантител в сыворотке крови и повышается при более высоких базовых значениях. Исходная серопозитивность по IgM РФ также ассоциируется с эффективностью терапии *тоцилизумабом*.

При применении современных подходов к ведению больных РА (стратегия до достижения цели — Treat to target) в клиническую практику введено понятие иммунологической ремиссии, которое расценивается как состояние без клинических и инструментальных признаков воспаления при отсутствии IgM РФ и АЦЦП или задокументированной сероконверсии по ним. Показания к определению РФ и АЦЦП представлены в **табл. 10.7**.

**Таблица 10.7.** Показания и особенности определения ревматоидного фактора и антител к цитруллинированным белкам

Показания к определению РФ
Ранний артрит. Подтверждение диагноза РА (критерии ACR/EULAR, 2010). У пациентов с сухим кератоконъюнктивитом и ксеростомией. У детей с хроническим полиартритом
Показания к определению АЦЦП
Ранний артрит (неизвестной этиологии). Подтверждение диагноза РА (критерии ACR/EULAR, 2010). До назначения терапии генно-инженерными биологическими препаратами
Особенности выявления РФ и АЦЦП

Определение РФ и/или АЦЦП показано пациентам с болезненными и припухшими суставами и высокой вероятностью развития РА:

- а) один раз в жизни при стабильных симптомах;
- б) повторное тестирование необходимо только в случае значительного изменения симптомов болезни

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Существует единое мнение относительно ценности серологического тестирования в диагностических целях.

- Тесты на РФ и АЦЦП имеют диагностическую ценность у пациентов с подозрением на РА, но не у бессимптомных пациентов в качестве скрининга.
- Диагностическое тестирование с применением РФ следует ограничить лицам с умеренной или высокой предтестовой вероятностью РА.
- РФ-тестирование не следует проводить у пациентов с болью в суставах при отсутствии синовита (неспецифических артралгий, фибромиалгии, остеоартрита), поскольку положительный результат теста с большей вероятностью будет представлять собой ложноположительный результат.
- АЦЦП полезны в качестве диагностического теста у пациентов с умеренной или высокой предтестовой вероятностью РА, но аналогичным образом его не следует использовать у пациентов с низкой предтестовой вероятностью.
- Для пациентов с воспалительным артритом мелких суставов и претестовой вероятностью РА от умеренной до высокой наличие АЦЦП подтверждает диагноз РА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.4.5. Новые антителные маркеры ревматоидного артрита

Известно, что 20–30% пациентов РА остаются негативными по IgM РФ и АЦЦП. При этом для постановки диагноза серонегативного РА по критериям ACR/EULAR (2010) у пациентов должны быть более выраженные клинические признаки поражения суставов и показатели воспаления, чем при серопозитивном РА, что приводит к неоправданной задержке при серонегативном РА назначения базисных противовоспалительных, генно-инженерных биологических и таргетных базисных противовоспалительных препаратов и негативно отражается на прогнозе заболевания. В связи с этим продолжается поиск биомаркеров, позволяющих поставить диагноз при серонегативном варианте РА в максимально короткие сроки от начала болезни. Среди них перспективными являются выявление анти-Карб- и анти-ПАД-аутоантител.

**Анти-Карб** являются одними из разновидностей аутоантител, синтезирующихся к «неоэпитопам», формирующимся в процессе посттрансляционной модификации (карбамилирование) белков. В отличие от АЦЦП, представляющих собой антитела к продуктам ферментной конверсии аргинина в цитруллин, карбамилирование — неферментная посттрансляционная модификация, при которой в результате реакции цианата с α-аминогруппой боковой цепи лизина происходит образование гомоцитруллина.

В процессе воспаления продукция МПО нейтрофилами стимулирует процесс карбамилирования за счет окисления тиоцианата водорода пероксидом (Перекисью водорода<sup>★</sup>). Развитие иммунного ответа на карбамилированные белки сопровождается синтезом не только анти-Карб, но и IFNα, IL-10 и IL-17, хемотаксисом и пролиферацией CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, ассоциирующихся с развитием эрозивного артрита. По данным метаанализа, при РА чувствительность анти-Карб составляет 43%, специфичность — 94%. Позитивность по анти-Карб, IgM РФ и АЦЦП позволяет лучше прогнозировать развитие РА, чем оценка уровней IgM РФ и АЦЦП (критерии ACR/EULAR, 2010). Анти-Карб обнаруживаются в 8–24% случаев у пациентов, негативных по АЦЦП, что важно для ранней диагностики РА (табл. 10.8).

**Таблица 10.8.** Диагностические параметры выявления аутоантител при ревматоидном артрите

Показатель	Чувствительность, %	Специфичность, %	Чувствительность при серонегативном РА, %
АЦЦП	67,0	95,0	—
IgM РФ	69,0	85,0	—
IgM РФ + АЦЦП	78,0	82,0	—
АМЦВ	71,0	89,0	7,9
Анти-Карб	41,1	94,4	8–23,6
Анти-ПАД-4	38,0	96,0	15,8–19,2

**Анти-ПАД-4** направлены против ПАД — группы кальцийзависимых ферментов, включающих пять изоформ, катализирующих конверсию аргинина в цитруллин. В качестве аутоантигенов при РА идентифицированы ПАД-2, ПАД-3 и ПАД-4, которые экспрессируются преимущественно гранулоцитами, моноцитами и клетками синовиальной ткани. Опосредованное ПАД-4-цитруллинирование белков участвует в формировании NET, индуцирует синтез провоспалительных цитокинов, дифференцировку остеокластов и костную резорбцию. ДЧ анти-ПАД-4 составляет 38%, ДС — 96%. Анти-ПАД-4 могут выявляться до клинической манифестации РА. При этом чаще серопозитивны



по анти-ПАД-4 пациенты с развернутым РА (29–35%), чем с ранним РА (16–18%); анти-ПАД-4 чаще обнаруживаются у АЦЦП-позитивных, чем у АЦЦП-негативных пациентов. Изучение новых биомаркеров позволяет лучше понять иммунологические механизмы РА и идентифицировать особенности его подтипов. Однако для использования диагностических тестов в реальной клинической практике необходимы их валидация и стандартизация на основании результатов широкомасштабных клинических исследований.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.4.6. Острофазовые показатели  
Острофазовые показатели являются неспецифическими для диагностики РА. Однако СОЭ — компонент индекса DAS28, измерение данного показателя полезно для оценки активности РА, а также риска прогрессирования и развития деструктивных изменений в суставах. СРБ является «полезным» тестом для оценки активности РА, необходим для подсчета индексов активности (DAS28-СРБ, SDAI) прогнозирования тяжелого деструктивного поражения суставов. Продемонстрирована роль КП в мониторинге активности РА, выявлении субклинического воспаления и прогнозировании обострений заболевания, а также оценке эффективности терапии базисными противовоспалительными и генно-инженерными биологическими препаратами. Мониторирование уровня КП может быть полезно для выявления «остаточного» воспаления у пациентов в состоянии ремиссии / низкой активности болезни. Биологические маркеры могут обеспечить объективные измерения, отражающие основные патофизиологические процессы, патогенные процессы или реакцию на лечение. Большинство показателей мониторинга заболевания и прогресса лечения основаны на измерениях, поэтому биомаркеры могут быть полезным дополнением при ведении пациентов. Однако для оценки эффективности терапии РА исследование сывороточных биомаркеров практически не имеет преимуществ в сравнении со стандартными острофазовыми показателями и клиникой.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.5. Системная красная волчанка  
СКВ — системное аутоиммунное РЗ неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к разным компонентам клеточного ядра с развитием иммуновоспалительного повреждения тканей и внутренних органов. Заболеваемость СКВ колеблется в пределах 4–250 случаев на 100 000 населения в год. Болеют чаще женщины репродуктивного возраста, пик заболеваемости приходится на возраст 15–25 лет. Риск обострения СКВ возрастает во время беременности и в послеродовой период. Соотношение женщин и мужчин — 8–10:1. Основные факторы, способствующие заболеванию: наследственность, гормональные перестройки (эстрогенная стимуляция, беременность), внешние воздействия (ультрафиолетовое облучение), прием лекарственных препаратов, курение, инфекции, стресс. Наличие генетической предрасположенности и воздействие факторов внешней среды приводят к нарушению иммунной толерантности, запуску иммунных реакций, направленных на неконтролируемую активацию В-лимфоцитов и гиперпродукцию аутоантител против компонентов ядра. Повреждение тканей, вызванное аутоантителами, отложением иммунных комплексов и гиперпродукцией цитокинов, происходит в почках, сердце, сосудах, ЦНС, коже, легких, мышцах, суставах, определяя мультисистемное поражение и многообразие клинических проявлений СКВ. Для диагностики СКВ недостаточно наличия одного симптома заболевания или одного выявленного лабораторного изменения. Диагноз устанавливают на основании клинических проявлений заболевания, данных лабораторных, инструментальных методов исследования, входящих в классификационные критерии заболевания. Согласно рекомендациям ACR (1997), необходимо 4 любых критерия из 11 (ДЧ — 90%, ДС — 80%), согласно рекомендациям SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics, 2012) — 4 критерия, из которых один должен быть клиническим и один — иммунологическим (любой из следующих лабораторных показателей: анти-дсДНК, АНФ, Sm, аКЛ, С3, С4) (ДЧ — 95%, ДС — 74%).

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.5.1. Критерии для постановки диагноза  
В клинической практике для постановки диагноза используют классификационные критерии СКВ: SLICC/ACR 2012 г. (табл. 10.9).

Таблица 10.9. Классификационные критерии системной красной волчанки (SLICC/ACR, 2012)

Клинические критерии
1. Острое активное поражение кожи: <input type="checkbox"/> сыпь на скулах (не учитываются дискоидные высыпания); <input type="checkbox"/> буллезные высыпания;

- ☐ токсический эпидермальный некролиз как вариант СКВ;
- ☐ макулопапулезная сыпь;
- ☐ фотосенсибилизация: кожная сыпь, возникающая в результате реакции на солнечный свет, или подострая кожная волчанка (неиндурированные псориазоформные и/или круговые полициклические повреждения, которые проходят без образования рубцов, но с возможной поствоспалительной депигментацией или телеангиэктазиями).
- 2. Хроническая кожная волчанка:
  - ☐ классическая дискоидная сыпь: локализованная (выше шеи), генерализованная (выше и ниже шеи);
  - ☐ гипертрофические (бородавчатые) поражения кожи;
  - ☐ панникулит;
  - ☐ поражение слизистых оболочек;
  - ☐ отечные эритематозные бляшки на туловище;
  - ☐ капилляриты (красная волчанка обморожения, болезнь Хатчинсона, проявляющаяся поражением кончиков пальцев, ушных раковин, пяточных и икроножных областей);
  - ☐ дискоидная красная волчанка по типу красного плоского лишая.
- 3. Язвы слизистых оболочек (в отсутствие васкулита, болезни Бехчета, инфицирования вирусом герпеса, воспалительных заболеваний кишечника, реактивный артрит):
  - ☐ ротовой полости: нёба, щек, языка;
  - ☐ носовой полости.
- 4. Нерубцовая алопеция, в том числе диффузное истончение волос или повышенная хрупкость волос с видимыми обломанными участками (в отсутствие очаговой алопеции, вследствие приема лекарств, дефицита железа и андрогенная).
- 5. Артрит:
  - ☐ синовит с вовлечением двух и более суставов, характеризующийся отеком или выпотом, или болезненность двух и более суставов и утренняя скованность по крайней мере 30 мин.
- 6. Серозит (в отсутствие инфекции, уремии и перикардита Дресслера):
  - ☐ типичный плеврит в течение >1 дня, или плевральный выпот, или шум трения плевры;
  - ☐ типичная перикардальная боль (боль в положении лежа, купирующаяся в положении сидя с наклоном вперед) >1 дня, или перикардальный выпот, или шум трения перикарда, или признаки перикардита при электрокардиографии.
- 7. Поражение почек:
  - ☐ суточная протеинурия (в моче >500 мг белка за сутки), или эритроциты в моче ( $\geq 5$ ), или цилиндры в моче ( $\geq 5$ ).
- 8. Нейропсихические поражения:
  - ☐ эпилептический приступ; психоз;
  - ☐ моно-/полиневрит (в отсутствие других причин: первичный васкулит);
  - ☐ миелит;
  - ☐ патология черепно-мозговых нервов, периферическая невропатия (в отсутствие первичного васкулита, инфекции, СД);
  - ☐ острое нарушение сознания (в отсутствие других причин: токсические/метаболические, уремия, прием лекарств).
- 9. Гемолитическая анемия.
- 10. Лейкопения  $<4,0 \times 10^9/\text{л}$  по крайней мере 1 раз (в отсутствие синдрома Фелти, приема лекарств, портальной гипертензии) или лимфопения  $<1,0 \times 10^9/\text{л}$  по крайней мере 1 раз (в отсутствие приема глюкокортикоидов, других лекарств, инфекции).
- 11. Тромбоцитопения  $<100 \times 10^9/\text{л}$  по крайней мере 1 раз (в отсутствие приема лекарств, портальной гипертензии, тромбоцитопенической пурпуры)

#### Иммунологические критерии

- 1. АНФ выше референсного диапазона.
- 2. Анти-дсДНК выше референсного диапазона (или более чем двукратное увеличение, определяемое методом ИФА).
- 3. Анти-Sm выше референсного уровня.
- 4. Положительные АФЛ, определенные любым из следующих способов:
  - ☐ положительный ВА;
  - ☐ средний или высокий титр аКЛ (IgA, IgG или IgM);
  - ☐ положительный результат теста на анти- $\alpha 2$ ГП-I (IgA, IgG или IgM);
  - ☐ низкий уровень компонентов комплемента: CH50, C3, C4.
- 5. Положительная реакция Кумбса при отсутствии гемолитической анемии

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Диагноз СКВ устанавливается при наличии четырех критериев, один из которых должен быть обязательно иммунологическим (любой из АНФ, анти-дсДНК, а-Sm, аФЛ, C3, C4, CH50) и один — клиническим или при подтвержденном биопсией волчаночном нефрите с положительными АНФ или анти-дсДНК. Вопросы, связанные с дифференциальной диагностикой СКВ от других заболеваний, оценка повреждений внутренних органов и систем при СКВ, шкала активности СКВ SLEDAI-2K, схемы лечения представлены в методических рекомендациях для специалистов первичного звена: <https://www.rnmot.ru/public/uploads/RNMOT/clinical/2022>.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.5.2. Лабораторные показатели при системной красной волчанке

**Скрининговые исследования.** Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению СКВ Ассоциация ревматологов России (2023), при подозрении на СКВ необходимо проведение ряда лабораторных исследований. Всем пациентам проводится ОАК с лейкоцитарной формулой и определением СОЭ. С активностью заболевания ассоциируются лейкопения ( $<4,0 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфопения ( $<1,0 \times 10^9/\text{л}$ ). С хроническим воспалением, приемом некоторых ЛС связана АХЗ, которая обычно носит нормохромный нормоцитарный характер, однако при РЗ часто встречается гипохромия эритроцитов. АХЗ постоянно сопровождается нарушением метаболизма железа: гипоферремией, некоторым снижением концентрации трансферрина в крови и повышением ферритина как в крови, так и в органах и тканях. До 10% больных СКВ страдают Кумбс-положительной гемолитической анемией, развивающейся при сенсибилизации эритроцитов аутоантителами. Тромбоцитопения ( $<100 \times 10^9/\text{л}$ ) обычно наблюдается у пациентов с АФС. В отдельных случаях развивается аутоиммунная тромбоцитопения, связанная с антителами к тромбоцитам.

Общий анализ мочи выявляет протеинурию, гематурию, лейкоцитурию, выраженность которых зависит от клинкоморфологического варианта волчаночного нефрита. При выявлении протеинурии необходимо измерение уровня белка в моче за 24 ч или определение отношения белок/креатинин.

Изменения биохимических показателей неспецифичны, зависят от поражения внутренних органов в различные периоды болезни.

**Иммунологические исследования.** Проводится определение АНФ в ПРИФ НЕр-2, который выявляется у 95% больных СКВ (обычно в высоком титре). Его отсутствие в подавляющем большинстве случаев исключает диагноз СКВ. Менее чувствительны и специфичны ИФА, мультиплексные диагностические платформы. При наличии АНФ или отрицательных результатах его исследования показано определение в сыворотке крови концентрации анти-дсДНК, анти-Sm, аФЛ, С3- и С4-компонентов комплемента.

Анти-дсДНК специфичны для СКВ, выявляются у 50–90% больных, имеют хорошую связь с активностью заболевания и волчаночным нефритом. Серийный мониторинг анти-дсДНК имеет умеренную корреляцию с активностью заболевания.

Анти-Sm специфичны для СКВ, их обнаруживают у 10–30% больных. Анти-РNP чаще выявляют у больных с проявлениями смешанного заболевания соединительной ткани. Анти-Ro/SSA ассоциируются с лимфопенией, лейкопенией, фотодерматитом, синдромом Шегрена.

АФС развивается у 20–30% больных СКВ и требует исследования на наличие в сыворотке крови аФЛ-аКЛ, аа2ГП-I и ВА. У больных с волчаночным нефритом отмечают снижение СН50, С3- и С4-компонентов комплемента, коррелирующее с активностью волчаночного нефрита. Для диагностики СКВ не следует изучать панели продуктов активации комплемента.

Ранняя диагностика СКВ особенно сложна, поскольку тесты на ранней стадии не обладают специфичностью; кроме того, клинические признаки и симптомы часто появляются только после того, как произошло повреждение органов, что указывает на более поздние стадии заболевания. Современные скрининговые тесты на СКВ заведомо ненадежны. Для диагностики, прогноза или мониторинга СКВ не следует использовать панели тестов сывороточных биомаркеров и запатентованных алгоритмов и/или индексных оценок (например, AVISE CTD, AVISE SLE Monitor, AVISE SLE Prognostic). Диагноз СКВ ставится на основании лабораторных данных, клинических проявлений, серологии и гистологии пораженных органов.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6. Антифосфолипидный синдром

АФС — системное аутоиммунное заболевание, включающее рецидивирующие тромбозы (артериальный и/или венозный), акушерскую патологию (чаще синдром потери плода) и связанное с синтезом аФЛ-аКЛ, и/или ВА, и/или аа2ГП-I. Истинная распространенность АФС в популяции неизвестна. Частота обнаружения аФЛ в крови здоровых людей составляет в среднем 1–5% и увеличивается у лиц пожилого возраста, при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях и на фоне приема некоторых лекарственных препаратов.

**Классические критерии** постановки диагноза АФС опубликованы ISTH в 2006 г. В соответствии с ними диагноз АФС ставится при наличии у пациента минимум одного клинического и одного лабораторного критерия. Присутствие диагностических критериев должно быть стойким и сохраняться не менее 12 нед, а временной интервал между развитием клиники и появлением лабораторных маркеров — длиться не более 5 лет. Однако даже кратковременное присутствие аФЛ в крови повышает риск развития тромбозов.

АФС и СКВ обладают патогенетической общностью. У 5–15% пациентов с первичным АФС в течение 10 лет заболевания развивается СКВ и у до 50% пациентов с СКВ формируется АФС в течение 10 лет заболевания.

Прогноз АФС во многом зависит от своевременности установления диагноза, начатого лечения и дисциплинированности пациента. При наличии АФС прогноз у больных СКВ менее благоприятен. Показатели выживаемости пациентов с АФС и СКВ ниже, чем у больных АФС без СКВ. Летальность связана с развитием таких клинических проявлений, как инсульт, поперечный миелит, ИМ, эндокардит, тромбоэмболия сосудов легких, легочная гипертензия, нефропатия, гангрена конечностей и др., причем частота их выше у более молодых пациентов.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6.1. Патогенетические механизмы антифосфолипидного синдрома

Основным антигеном (мишенью аутоиммунной агрессии) при АФС является белок плазмы  $\beta_2$ ГП-I, он синтезируется гепатоэндотелиальными клетками и плацентой, его концентрация в крови составляет около 200 мкг/мл, а функции до конца не ясны. Полагают, что основной физиологической функцией  $\beta_2$ ГП-I является удаление из кровотока отрицательно заряженного клеточного дебриса (микрочастиц, обломков клеток, микровезикул), присутствующего в крови в результате повреждения мембран или разрушения клеток (тромбоцитов, эндотелиоцитов) при вирусных и бактериальных инфекциях, злокачественных новообразованиях и иных заболеваниях.

При взаимодействии с фосфолипидами  $\beta_2$ ГП-I меняет конформацию и становится доступным для элиминации клетками иммунной системы вместе со связанными им фосфолипидами клеточной мембраны. Благодаря положительно заряженному участку  $\beta_2$ ГП-I способен связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран клеток и глубоко внедряться в фосфолипидный бислой клеточных мембран. В физиологических условиях  $\beta_2$ ГП-I проявляет низкую аффинность к фосфолипидам и не конкурирует с факторами плазменного гемостаза при образовании теназного и протромбиназного комплексов, формирующихся при коагуляции плазмы.

Белок  $\beta_2$ ГП-I имеет пять доменов, к каждому из них могут формироваться антитела. При АФС антитела направлены в основном против субъединицы I  $\beta_2$ ГП-I, при связывании с ней повышается аффинность  $\beta_2$ ГП-I к фосфолипидам, в том числе за счет того, что образуется комплекс из двух молекул этого гликопротеина. Комплекс  $\beta_2$ ГП-I с антителом делает его устойчивым к элиминации, в сформировавшемся комплексе происходит изменение конформации этого протеина с экспрессией новых эпитопов в I и V доменах. Именно антитела к домену I связаны с тромботическими эпизодами и являются наиболее специфичными для АФС. Антитела к доменам IV, V выявлялись при нетромботических состояниях.

Обнаружить аФЛ, направленные непосредственно против фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и других фосфолипидов, можно при разных инфекциях, но их присутствие в крови будет ограничено лишь активным воспалительным процессом, после завершения которого они элиминируются из крови, перестают синтезироваться и не приводят к тромботическим нарушениям. Отличить истинный АФС от реактивных иммунологических нарушений позволяет стойкое присутствие аФЛ в плазме, не зависящее от преходящих изменений состояния пациента.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6.2. Тромбофилический эффект антифосфолипидного синдрома

Венозные тромбозы при АФС возникают в 70%, а артериальные — в 30% случаев. Около 30% больных АФС имеют как тромбозы магистральных сосудов (вен и артерий), так и нарушения (сладж) в зоне микроциркуляции.

Тромбогенный эффект комплекса антител и двух молекул  $\beta_2$ ГП-I реализуется преимущественно через повреждение эндотелия и нарушение функций связанных с ним молекул:

- активация эндотелиоцитов, тромбоцитов (через рецептор Ib-IX и TLR-2), моноцитов (через аннексин A2);
- влияние на систему протеина C и тромбомодулина;
- угнетение фибринолиза;
- усиление генерации тромбина;
- активация системы комплемента;
- образование комплекса с ЛПНП;
- снижение активности аннексина V на эндотелии;
- активация эндотелиоцита через TLR-4 с последующим избыточным высвобождением провоспалительных цитокинов («цитокиновый шторм») и прокоагулянтов, экспрессии молекул адгезии;
- посттрансляционные модификации  $\beta_2$ ГП-I с созреванием ДК, Th1-поляризации и высвобождением IL-1, -6, -8, -12, ФНО- $\alpha$ .

На поверхности эндотелиоцитов иммунные комплексы  $\alpha\beta_2$ ГП-I конкурируют с аннексинами II и V, «защитающими» клетки поверхностного слоя сосудов и обладающими выраженными антикоагулянтными свойствами. Вытесняя аннексины, аФЛ не только обнажают анионные фосфолипиды, но и усиливают их экспрессию. Данный эффект аФЛ наиболее активно проявляется в сосудах головного мозга (аннексин II) и плаценты (аннексин V). аФЛ повышают образование ТАФИ эндотелием сосудистой стенки и тем самым способствуют торможению фибринолиза.

Наличие ВА — более сильный фактор риска развития тромбоза, чем аКЛ. ВА резко повышает риск рецидивирования тромбоза, а также служит показанием для назначения длительной терапии оральными антикоагулянтами. При АФС нередко развиваются ТЭЛА и поражения ЦНС (ишемические инсульты, энцефалопатия, судорожный синдром, полиневропатия, мигренеподобные боли и даже симптомокомплекс, напоминающий рассеянный склероз).

Неврологические проявления заболевания (церебральная форма АФС) чаще всего проявляются развитием синдрома Снеддона, характеризующегося сочетанием острых или преходящих нарушений мозгового кровообращения (инсульты, транзиторные ишемические атаки) с наличием на коже пациентов сетчатого ливедо.

Неспецифическим для АФС механизмом сосудистого поражения является так называемая окклюзивная васкулопатия — нарушение дифференцировки гладкомышечных клеток сосудов, миграции и инфильтрации интимы

сосуда, вследствие чего развивается «хроническая ишемия» тканей. Наиболее выражены данные нарушения в мелких сосудах почек, но описаны в сосудах малого и среднего диаметра головного мозга, сердца, брыжейки. Тромбозы при АФС развиваются чаще всего при наличии провоцирующего фактора — травмы, инфекции, иммобилизации, катетеризации сосуда. Вероятность развития тромбоза повышается при наличии других тромбофилий в сочетании с внешними провоцирующими факторами. Особенно тяжело протекает катастрофический АФС (синдром Ашерсона), характеризующийся быстро прогрессирующим тромбозом и во многом напоминающий ДВС. Наиболее часто тромбозы развиваются у пациентов, в крови которых присутствуют все три вида аФЛ, входящих в критерии диагностики АФС—ВА, аКЛ и анти- $\beta$ 2ГП-I (чаще всего IgG), это так называемый достоверный тромботический и/или акушерский АФС. Наибольшее число тромботических и акушерских осложнений происходит при наличии анти- $\beta$ 2ГП-I к домену I  $\beta$ 2ГП-I. Разработаны и внедряются в практику тест-системы, определяющие именно этот тип антител.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.6.3. Воспалительный компонент антифосфолипидного синдрома  
При АФС в крови повышается уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ ), благодаря чему усиливается экспрессия тканевого фактора и других прокоагулянтов эндотелиоцитами и моноцитами. аКЛ при АФС способны фиксировать компоненты комплемента C3 и C4 на поверхности эндотелиальных клеток. Повреждение тканей при АФС может быть вызвано анафилотоксинами (C3a, C4a, C5a), реализующими свой эффект посредством мембраноатакующего комплекса комплемента.

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.6.4. Беременность и антифосфолипидный синдром  
При беременности аФЛ нарушают дифференцировку трофобласта, ингибируют продукцию гормонов плацентой, связывают аннексин V, благодаря чему содержание указанного антикоагулянта на апикальной поверхности трофобласта и эндотелиальных клетках значительно уменьшается, чем создаются благоприятные условия для тромбообразования.  
Развитию патологии беременности способствуют не только ишемические нарушения, но и развивающееся в плаценте иммунокомплексное воспаление, что требует более строгого подхода и расширения показаний к назначению иммуносупрессивной терапии у беременных, страдающих АФС. При СКВ у беременных с наличием антител к фосфолипидам невынашивание плода достигает 90%. Даже при сохраненной беременности при АФС с 10–15-й недели гестации в большинстве случаев замедляется развитие плода, резко уменьшается количество амниотической жидкости, проявляются преэклампсия и эклампсия.  
Таким образом, наиболее актуальной задачей лабораторной диагностики АФС является определение анти- $\beta$ 2ГП-I, так как именно с их присутствием связаны тромботические, акушерские и другие осложнения. Определение других групп антител (к протромбину, аннексину V и иным соединениям) расширяет спектр диагностики и понимания «некритериальных» проявлений АФС (мигрень, неврологическая симптоматика), ориентирует в подборе терапии (применение варфарина, иммуносупрессивных препаратов).

Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.6.5. Клинические критерии антифосфолипидного синдрома  
Для постановки диагноза АФС у пациента обязательным должен быть как минимум один клинический критерий. Присутствие диагностических критериев должно быть стойким и сохраняться не менее 12 нед, а временной интервал между развитием клиники и появлением лабораторных маркеров — длиться не более 5 лет (табл. 10.10).  
**Таблица 10.10.** Клинические критерии антифосфолипидного синдрома

Тромбоз сосудов
Один или более клинический эпизод артериального, венозного тромбоза или тромбоза мелких сосудов в любых ткани или органе. Тромбоз должен быть подтвержден доплеровским или другими исследованиями. Гистология призвана подтвердить отсутствие значительного воспаления сосудистой стенки. Наличие врожденных или приобретенных факторов риска тромбоза (возраст, гипертензия, СД, гиперхолестеринемия, курение, повышенная масса тела, микроальбуминурия, снижение клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин, семейный анамнез, врожденные тромбофилии, прием оральных контрацептивов, нефротический синдром, онкологическая патология, длительная иммобилизация, хирургические вмешательства) не исключает АФС. Пациенты должны быть разделены на две группы по наличию или отсутствию дополнительных факторов риска тромбозов. Тромбозы подкожных вен не являются критерием диагноза АФС
Патология беременности
Критериями АФС при патологии беременности являются:

- а) как минимум один случай мертворождения морфологически нормального плода 10 нед гестации и более (нормальная морфология должна быть подтверждена УЗИ или обследованием плода);
- б) один случай или более преждевременных родов здорового плода до 34 нед гестации вследствие преэклампсии, эклампсии или преждевременной отслойки плаценты;
- в) не менее трех последовательных случаев спонтанных аборт до 10 нед гестации при отсутствии гормональных и анатомических нарушений у матери и хромосомных aberrаций у обоих родителей.
- Общепринятыми критериями плацентарной недостаточности являются:
- 1) ареактивный нестрессовый тест при кардиомониторировании плода, свидетельствующий о внутриутробной гипоксии;
  - 2) нарушения кровотока, выявляемые при доплерографии (отсутствие конечного диастолического кровотока в пупочной артерии);
  - 3) маловодие (индекс амниотической жидкости менее 5 см);
  - 4) масса плода, составляющая при рождении менее 10-го перцентиля для данного гестационного возраста

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6.6. Лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома

Обязательным требованием диагностики АФС является обнаружение в крови аФЛ (табл. 10.11). В зависимости от метода, которым проводится определение концентрации аФЛ, выделяют следующие их типы: ВА (клеточный метод детекции), аКЛ, анти- $\beta$ 2ГП-I (метод ИФА). В клинической практике также доступно выявление и других типов аФЛ (к аннексину V, протромбину), но эти типы антител для развития АФС и постановки диагноза имеют ограниченное значение и не входят в официальные критерии его диагностики.

**Таблица 10.11.** Лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома

1. Наличие ВА в плазме пациента в двух или более пробах с интервалом между исследованиями не менее 12 нед.
  2. Наличие аКЛ IgG- и/или IgM-изотипов в сыворотке или плазме пациента в среднем или высоком титре [ $>40$  GPL (Ед) или MPL (Ед) или выше 99-го перцентиля] с интервалом между исследованиями не менее 12 нед (определение ИФА).
  3. Наличие анти- $\beta$ 2ГП-I IgG- и/или IgM-изотипов в сыворотке или плазме пациента в титре более 99-го перцентиля с интервалом между исследованиями не менее 12 нед (определение ИФА).
- В зависимости от позитивности по аФЛ рекомендуется разделять больных с АФС по следующим категориям:
- ☐ категория I — позитивность более чем по одному лабораторному маркеру (в любой комбинации);
  - ☐ категория IIa — позитивность только по ВА;
  - ☐ категория IIb — позитивность только по аКЛ;
  - ☐ категория IIc — позитивность только по анти- $\beta$ 2ГП-I

Комплексность анализа (определение антител тремя методиками) связана с тем, что ни один из способов диагностики не охватывает все возможные типы аФЛ.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6.7. Волчаночный антикоагулянт

ВА (люпус-антикоагулянт) — одно из трех основных аФЛ. Одного теста для определения ВА не существует. ВА обычно выявляют путем комбинации различных тестов. Начальное тестирование включает один или несколько анализов с использованием фосфолипидных реагентов. В зависимости от их результатов могут проводиться дополнительные анализы для того, чтобы подтвердить или опровергнуть наличие ВА.

*Первым этапом* проводится выявление ВА, для этого достаточно проведения двух клеточных (коагулологических) тестов:

- 1) АЧТВ с разведенным ядом гадюки Рассела (dRVVT) — скрининговый тест с реагентом, содержащим лимитированное количество фосфолипидов;
- 2) АЧТВ с чувствительным к присутствию ВА реагентом (с низким содержанием фосфолипидов и частицами кремния в качестве активатора).

*Вторым этапом* проводится коррекционная проба (тест смешивания) — смешивание исследуемой плазмы с нормальной плазмой, как правило, в соотношении 1:1, и повторное выполнение указанных выше тестов с «микс»-плазмой. Если показатели приходят к норме, то причиной их исходного удлинения служил дефицит одного или нескольких факторов свертывания. Если же удлинение времени образования сгустка в тестах сохраняется (или недостаточно укорачивается), то делается заключение о присутствии в плазме пациента ингибитора коагуляции (им может быть ВА). Нормальным является показатель клеточного теста в плазме пациента, если он не превышает более чем на 20% тест в нормальной плазме, определенный тем же реактивом в тот же день. Наиболее простой способ оценки — разделить показатель пациента на показатель нормальной плазмы, такое «нормализованное отношение» не должно превышать 1,2.

После инкубации в течение 1 ч при 37 °C плазмы пациента и ее смеси с нормальной плазмой, повторив исследование АЧТВ и dRVVT, можно дифференцировать характер данного ингибитора: если его эффект усилился (АЧТВ и dRVVT стало больше, чем исходное), то он является специфичным (блокирует фактор коагуляции, чаще — фактор VIII);

если же его действие сохранилось на прежнем уровне после часовой инкубации образца, то он расценивается как неспецифический, разновидностью которого является ВА.

*Третий этап* устанавливает фосфолипидную зависимость неспецифического ингибитора. Для этого используются реагенты (как правило, для теста dRVVT) с избыточным содержанием фосфолипидов в них (так называемый подтверждающий тест), «отвлекающие» на себя ингибитор коагуляции и таким образом дающие возможность факторам свертывания крови без помех участвовать в коагуляционном каскаде. В конечном итоге нормализация времени образования сгустка при использовании подтверждающего реагента с избытком фосфолипидов свидетельствует о присутствии в плазме фосфолипид-зависимого неспецифического ингибитора коагуляции, то есть ВА. На практике к данному этапу диагностики переходят сразу после установления удлинения теста со скрининговым реагентом dRVVT, минуя этап коррекционной пробы с нормальной плазмой.

Ключевыми показателями приведенного алгоритма являются два следующих отношения.

1. Время свертывания плазмы пациента к свертыванию нормальной плазмы (так называемое скрининговое отношение). При его значении, превышающем 1,2, выполняется постановка реакции с подтверждающим реагентом.
2. «Подтверждающее» — определяемое разницей нормализованного отношения в тесте с плазмой пациента и нормальной плазмой к нормализованному отношению в подтверждающем тесте с плазмой пациента и нормальной плазмой. Положительным тест считается, если итоговое нормализованное отношение более 1,2. При этом уровень в плазме ВА более 2,0 расценивается как высокий, от 1,5 до 2 — средний и от 1,2 до 1,5 — низкий.

Для выявления ВА необходимо обязательное двукратное центрифугирование плазмы перед исследованием, выполнение тестов в плазме, не подвергавшейся заморозке. Не менее важным требованием диагностики ВА является использование специальных КМ с известным уровнем ВА. Для более достоверной трактовки получаемых результатов рекомендуется одновременное определение в крови белков острой фазы воспаления (СРБ), что позволяет дифференцировать транзиторное присутствие ВА при разных видах патологии с «истинным», постоянным его наличием в крови, характерным для АФС.

*Диагностическое значение лабораторных показателей.*

- Для постановки диагноза АФС достаточно одного из трех лабораторных критериев (ВА, аКЛ или а $\beta$ 2ГП-I); наличие у больного нескольких лабораторных критериев АФС сопровождается значительным увеличением риска тромботических осложнений.
- Диагноз АФС не может быть установлен, если промежуток между выявлением аФЛ и клиническими признаками заболевания составляет менее 12 нед и более 5 лет.
- Для прогнозирования риска развития тромботических осложнений при АФС полезными маркерами являются ВА, IgG аКЛ и анти- $\beta$ 2ГП-I.
- Для прогнозирования риска развития акушерской патологии при АФС наиболее полезными маркерами являются ВА, IgG аКЛ и анти- $\beta$ 2ГП-I.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

*Показания к определению аФЛ.*

- Необъяснимый тромбоз глубоких вен нижних конечностей или тромбоз легочных сосудов, особенно у лиц молодого возраста.
- Рецидивирующий тромбоз.
- Ишемический инсульт у лиц моложе 50 лет.
- СКВ или другие аутоиммунные заболевания, протекающие с тромботическими осложнениями.
- Рецидивирующая потеря плода или осложненная беременность с преждевременными родами.
- Необъяснимая тромбоцитопения.
- Сетчатое ливедо.
- Необычная локализация тромбоза (вены сетчатки, венозные синусы головного мозга, вены почек).

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.6.8. Некритериальные признаки антифосфолипидного синдрома

В последние годы пересмотрены взгляды на тромбогенность аФЛ, направленных не к  $\beta$ 2ГП-I. Ранее считалось, что их присутствие в плазме относительно безопасно в отношении риска тромбоза. В настоящее время показано, что даже транзиторное присутствие аФЛ в крови, сопровождающее инфекционный процесс и другие виды воспаления (посттравматическое, аутоиммунное), повышает риск развития тромбоза. В этой связи введены понятия о «некритериальных» признаках АФС (**табл. 10.12**).

**Таблица 10.12.** «Некритериальные» признаки антифосфолипидного синдрома

Клинические
Большие: АФС-нефропатия, сетчатое ливедо, хореоформные гиперкинезы, тромбофлебит подкожных вен голени, поражение клапанов сердца, тромбоцитопения, поперечный миелит.

Малые: кратковременные потери сознания, когнитивные нарушения, гемолитическая анемия, мигрень, легочная гипертензия, эпилептиформные припадки, язвы кожи, повреждение белого вещества головного мозга по данным магнитно-резонансной томографии, положительная прямая проба Кумбса, признаки повреждения вещества головного мозга, подобные рассеянному склерозу, феномен Рейно, нейросенсорная тугоухость, точечные кровоизлияния под ногтями.

Акушерские: поздняя внутриутробная гибель плода (после 34 нед гестации), преэклампсия после 34 нед гестации, отслойка плаценты, гематома плаценты, преждевременные роды (34–37 нед), две и более неудачи протоколов экстракорпорального оплодотворения, два необъяснимых самопроизвольных выкидыша на сроке менее 10 нед

#### Лабораторные

«Некритериальными» антифосфолипидными мишенями для антител являются аннексин А5, аннексин А2, протромбин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, виментин-кардиолипин.

Антителами, не определяемыми стандартными способами, являются антитела к протеинам С и S, лизобисфосфатидиловой кислоте, тромбомодулину, гепарансульфату, CD36, фосфолипазе А2, окисленным ЛПНП

В связи с учетом некритериальных признаков, помимо классического, рекомендуется выделение следующих вариантов АФС.

- «Серонегативный» АФС — установлены клинические проявления АФС (тромбоз или акушерская патология) + некритериальные проявления (как минимум один большой неакушерский или два малых неакушерских признака; либо два малых акушерских признака) + нет «классических» аФЛ, определявшихся дважды с интервалом 12 нед, + нет других тромбофилий.
- «Некритериальный клинический» АФС — некритериальные клинические признаки + позитивность по классическим аФЛ.
- «Неполный лабораторный» АФС — достоверный АФС + позитивные аФЛ, но уровни не соответствуют лабораторным классификационным критериям (низкий титр аКЛ или анти- $\beta_2$ ГП-I). «Однократно-позитивные» пациенты не включаются в эту группу, диагноз не устанавливается. Низкий уровень — менее 40 Ед или уровень между 95–99-м процентилями, интервал также 12 нед. В этой группе рекомендовано дополнительно определение некритериальных антител.
- «Некритериальный лабораторный» АФС (достоверный клинически АФС, но с устойчиво отрицательными или низкими уровнями классических аФЛ и с наличием некритериальных антител).

Данный подход к пониманию патогенеза АФС и его диагностике призван усилить внимание к применению антитромботических препаратов в схемах терапии различных видов патологии — от невынашивания беременности до неврологических заболеваний. Накапливаются данные о высокой эффективности применения антикоагулянтов (НМГ, варфарина) в терапии пациентов с подозрением на «неклассический» АФС.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.7. Системная склеродермия

ССД, или прогрессирующий системный склероз, — системное аутоиммунное ИВРЗ, характеризующееся прогрессирующим фиброзом кожи и внутренних органов. ССД — полиорганное заболевание, в основе которого лежат иммунные нарушения и вазоспастические сосудистые реакции по типу феномена Рейно, сопровождающиеся активацией фиброобразования и избыточным отложением компонентов внеклеточного матрикса (коллагена) в тканях и органах. Прогрессирующее течение ССД приводит к развитию необратимых распространенных фиброзных изменений, что определяет высокую инвалидизацию больных и общий плохой прогноз.

Заболеваемость составляет 3–20 случаев на 1 млн населения в год, распространенность — 30–300 случаев на 1 млн.

ССД чаще встречается у женщин (соотношение 5–7:1) с дебютом в возрасте 30–60 лет. Основные субтипы или формы ССД — диффузная с обширным поражением кожи и внутренних органов, лимитированная, при которой поражение кожи ограничено дистальными отделами конечностей и лицом, ювенильная — начавшаяся в возрасте до 16 лет.

Особая форма — перекрестная, при которой ССД сочетается с РА, ПМ/ДМ, СКВ, синдромом Шегрена и другими аутоиммунными заболеваниями. Очень редко (1–2%) встречается ССД без поражения кожи.

Иммунопатогенез ССД носит комплексный характер, что отражается в клинической полиморфности. Ведущая роль в патогенезе ССД отводится возникающему на фоне дисрегуляции иммунитета поражению сосудов микроциркуляторного русла и усилению процессов фиброобразования, связанному с действием различных ростовых факторов и цитокинов. В-клетки играют важную роль в инициальных механизмах фиброобразования при ССД, а хроническая активация В-клеток непосредственно связана с развитием склеродермического фиброза через продукцию аутоантител и фиброгенных цитокинов.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.7.1. Аутоантитела при системной склеродермии

Циркуляция большого спектра аутоантител — характерная черта ССД. Их определение имеет большую диагностическую и прогностическую значимость для курации больных. Три основных специфичных для ССД типа



аутоантител — анти-Scl-70, АЦА, к РНК-полимеразе III — включены в классификационные критерии заболевания ACR/EULAR, 2013. ССД характеризуется присутствием в циркуляции аутоантител к компонентам ядра, цитоплазмы и поверхностным клеточным антигенам. Аутоантитела при ССД условно разделены на две подгруппы — специфичные, которые характерны преимущественно для этого заболевания, и неспецифичные. Специфичные для ССД аутоантитела представляют собой гетерогенную группу АНА. Для ССД характерен эксклюзивный набор мишеней-аутоантигенов, которые локализованы в ядрышках, хроматине и нуклеоплазме. Частота выявления АНА при ССД составляет 90–95%.

Показано, что, кроме специфичных АНА, в крови примерно половины больных ССД циркулируют и другие АНА, в том числе встречающиеся при разных РЗ, например aSSA/Ro к полипептидам с молекулярной массой 60 и 52 кДа. Неспецифические аутоантитела направлены против эндотелиальных клеток, фибробластов, клеточных рецепторов, белков экстрацеллюлярного матрикса, ферментов. АНА, ассоциированные с ССД (встречают в 85–95% случаев), включают семь (стандартный профиль) наиболее изученных аутоантител. К ним относят АЦА, антитела к топоизомеразе I (АТА) и антитела к рибонуклеопротеазе III, Th/To, Pm/Scl, а также аутоантитела к РНП U1RNP и U3RNP.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.7.2. Методы диагностики системной склеродермии

Первичным скрининговым методом определения склеродермических АНА в сыворотке крови является НРИФ-HEp-2. Наличие АНФ в сыворотках больных ССД проявляется ядерным свечением HEp-2 клеток, тип которого зависит от топографии аутоантигена. Характер свечения позволяет идентифицировать аутоантиген-специфичные склеродермические антитела. Центромерное свечение ассоциируется с АЦА, мелкое крапчатое — с АТА, нуклеолярный тип свечения характерен для группы аутоантител, включающих антитела к фибрилларину/U3-RNP, антитела к рибонуклеопротеазе I, II, III, Th/To и Pm-Scl. НРИФ-HEp-2 считается наиболее чувствительным и специфичным методом определения АЦА для диагностики ССД, что исключает необходимость дальнейшего исследования этих аутоантител при помощи подтверждающих лабораторных тестов.

Выявление у больных ССД с положительными результатами НРИФ-HEp-2 других субтипов склеродермических АНА (АТА, антител к рибонуклеопротеазе III, антител к U3-RNP, Pm/Scl, Th/To, U1RNP и др.) требует применения подтверждающих методов иммунодиагностики — капиллярного электрофореза, двойной иммунодиффузии, ИФА, иммуноблота и мультиплексного иммунного анализа. Последний имеет высокую специфичность (97–100%) для всех аутоантител (кроме антител к SS-A/Ro-52) и способен детализировать иммунологический профиль у больных, имеющих нуклеолярный тип свечения в НРИФ и негативных по наиболее распространенным АНА — АТА и АЦА.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.7.3. Клиническое значение антител при системной склеродермии

ССД-специфические АНА присутствуют в крови практически всех (90–95%) больных ССД. Несмотря на широкий спектр известных «склеродермических» аутоантител, у больных ССД в 50–60% случаев в сыворотке крови обнаруживают всего два вида аутоантител — АЦА и АТА (Scl-70). Они высокоспецифичны для ССД и обычно не сочетаются у одного больного. Продукция одного типа специфичных для ССД АНА является характерной для каждого пациента. Доминирующий тип АНА сохраняется на протяжении болезни, в определенной мере определяя особенности клинических проявлений болезни. Как правило, в процессе ее развития новые типы аутоантител не появляются.

Наличие АЦА является полезным маркером для прогнозирования лимитированного поражения кожи и низкой вероятности развития легочного фиброза. Обнаружение анти-Scl-70 служит полезным маркером для прогнозирования диффузного поражения кожи, высокой вероятности развития легочного фиброза и нарушения функциональных легочных проб. Антитела к РНК-полимеразе 3 ассоциируются с диффузным поражением кожи, развитием склеродермического почечного криза.

Другие высокоспецифичные для ССД антитела — к U3RNP и Th/To — встречаются редко. Нечасто встречаются и антитела к Pm/Scl, Ku, U1RNP, которые более характерны для перекрестных с ССД синдромов.

Существуют убедительные доказательства того, что АНА, специфичные для ССД, имеют значение как серологические маркеры определенных клинических субтипов и относятся к предикторам течения и исхода болезни. АНА являются более строгими предикторами исхода и выраженности висцеритов, чем поражения кожи при диффузной и лимитированной форме болезни. Каждое из АНА в отдельности обнаруживается у небольшого числа больных с определенной клинической картиной, характером течения ССД, прогнозом и имеет четкие генетические ассоциации. Наличие четких клинических ассоциаций делает определение АНА незаменимым инструментом для диагностики, оценки течения и прогноза при ведении больных ССД (табл. 10.13).

**Таблица 10.13.** Частота выявления «склеродермических» аутоантител и основные клинические ассоциации

Тип АНА	Частота, %	Клинические ассоциации
АЦА	16–39	Легочная артериальная гипертензия без фиброза легких, первичный билиарный цирроз, протективный для легочного фиброза и острого склеродермического криза

АТА	9–39	Чаще при диффузной форме, легочный фиброз, выраженные дигитальные язвы, высокая летальность
Анти-РНК-полимераза 3	4–25	Диффузная форма, острый склеродермический криз (до 45% больных), рак
Анти-Th/To	1–7	Легочный фиброз, легочная артериальная гипертензия
Анти-U3RNP	1–6	Тяжелое течение болезни, вовлечение мышц, легочная артериальная гипертензия — плохой прогноз
Анти-PM/Scl	1–6	Перекрестный синдром с ПМ/ДМ или с РА, легочный фиброз
Анти-Ku	1–3	Поражение мышц и суставов
Анти-U1RNP	5–35	Перекрестные синдромы

Очевидно, что определение АНА, специфичных для ССД, важно для оценки риска развития органических проявлений и прогноза. Показано, что при ССД летальность от всех причин за 15 лет существенно отличается между больными, в сыворотках которых выявляются разные типы АНА. При наличии АТА она составляет 57%, при АЦА — 78%, при анти-UIRNP — 78%, при антителах к рибонуклеопротеазе III — 93%. Важно, что специфичные для ССД АНА появляются уже на самых ранних стадиях, еще до развернутой клинической картины болезни (в частности, при «изолированном» феномене Рейно), поэтому их раннее обнаружение имеет большое практическое значение. Подозрение на раннюю ССД должно возникнуть у врача любой специальности, если при осмотре или в анамнезе у больного имеется феномен Рейно, особенно в сочетании с отечностью кистей, даже если отечность возникает непостоянно. Такому больному необходимо определить АНФ. Наличие триады — феномена Рейно, отека кистей и позитивного теста на АНФ — служит основанием для направления пациента на консультацию к ревматологу. Установлено, что наличие АНФ и специфических АНА является независимым предиктором развития ССД при болезни Рейно. При этом у пациентов с феноменом Рейно, имеющих ССД-специфические АНА и микроангиопатию (выявленную при капилляроскопическом исследовании), вероятность развития ССД увеличивается в 60 раз. При длительном наблюдении почти у 80% таких пациентов развивается ССД. Напротив, отсутствие этих параметров практически исключает вероятность развития ССД у лиц с феноменом Рейно.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.8. Болезнь (синдром) Шегрена

БШ — аутоиммунное системное ИВРЗ неизвестной этиологии, характерной чертой которого является хронический аутоиммунный и лимфопролиферативный процесс в секретирующих эпителиальных железах с развитием паренхиматозного сиаладенита с ксеростомией и сухого кератоконъюнктивита с гипоплазмией. БШ развивается у 5–25% больных с системными заболеваниями соединительной ткани, чаще РА, у 50–75% больных с хроническими аутоиммунными поражениями печени, иногда при других аутоиммунных заболеваниях. Если БШ сочетается с другими аутоиммунными заболеваниями, то говорят о синдроме Шенгена. Заболеваемость БШ колеблется от 100 до 1000 на 100 000 населения. Пик заболеваемости приходится на 35–50 лет. Женщины страдают в 8–10 раз чаще мужчин. Смертность при БШ в 3 раза выше, чем в популяции. Иммунологические и морфологические исследования являются важной частью классификационных критериев (SICCA — Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance, 2012):

- наличие анти-SSA/Ro- и/или анти-SSB/La-антиядерных антител или позитивные РФ и АНФ;
- в биоптате малых слюнных желез — очаговая лимфоцитарная инфильтрация (один фокус и более в 4 мм<sup>2</sup>);
- сухой кератоконъюнктивит —  $\geq 3$  баллов по шкале окраски глазного эпителия флюоресцеином и лиссаминовым зеленым.

Заболевание может быть классифицировано как БШ при соответствии двум из трех критериев при исключении облучения головы и шеи, инфицирования HCV, ВИЧ-инфекции, саркоидоза, амилоидоза, IgG4-связанного заболевания, РА, СКВ, ССД и других аутоиммунных заболеваний.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.8.1. Специфические антитела к SSA/Ro (Robert) и SSB/La (Lane)

SSA/Ro-антигены — полипептиды с молекулярной массой 60 и 52 кДа, образующие комплекс с Ro-РНК (hY1, hY3 и hY5). Стандартными методами определения анти-SSA/Ro в сыворотке крови являются ИФА, иммуноблот, двойная иммунодиффузия. Антитела к Ro/SSA- и La/SSB-ядерным антигенам при использовании ИФА выявляются у 85–100% больных. Одновременное обнаружение анти-Ro/SS-A и анти-La/SS-B наиболее специфично для БШ, но наблюдается у 40–50% больных. В остальных случаях изолированно выявляются только анти-Ro/SS-A и реже — только анти-La/SS-B. Анти-Ro/SS-A часто выявляются у больных с вариантами сочетания БШ с РА, СКВ, ССД, что затрудняет дифференциальную диагностику и требует дополнительных методов исследования. Анти-La/SS-B более специфичны для заболевания. Положительные результаты обнаружения анти-SSA/Ro являются диагностическими критериями первичной и вторичной БШ.

У больных СКВ наличие анти-SSA/Ro ассоциируется с фотосенсибилизацией, синдромом Шегрена, гиперпродукцией РФ. При беременности исследование сывороточного уровня анти-SSA/Ro-52 кДа у матери полезно для прогнозирования риска развития неонатального волчаночноподобного синдрома у новорожденных. SSB/La-антиген — нуклеоцитоплазматический комплекс фосфопротеина с Ro РНК (hY1-hY5), являющийся терминальным транскрипционным фактором для РНК полимеразы 3. При БШ обнаружение анти-SSB/La ассоциируется с выраженной лимфоидной инфильтрацией слюнных желез и развитием экстрагангулярных проявлений (пурпуры, васкулита, лимфаденопатии). При СКВ гиперпродукция анти-SSB/La ассоциируется с поражениями почек. При беременности обнаружение анти-SSB/La в сыворотке крови матери служит прогностическим маркером развития полной поперечной блокады сердца у плода. Исследование анти-SSA/Ro и анти-SSB/La проводят один раз в жизни.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.8.2. Другие иммунологические и лабораторные маркеры

РФ и АНФ определяются у 95–100% больных БШ. Увеличение титров РФ характерно для больных, имеющих криоглобулинемический васкулит и морфологические признаки формирования MALT-ткани (мукозассоциированная лимфоидная ткань) в слюнных/слезных железах и легких. Наиболее характерным типом свечения АНФ является крапчатый, реже выявляются гомогенный и периферический типы свечения.

Криоглобулины выявляются у трети больных БШ. В 40% они относятся к II типу криоглобулинемии (смешанная моноклональная криоглобулинемия). В отличие от больных с криоглобулинемическим васкулитом, ассоциированным с инфицированием HCV, у больных БШ отсутствует связь с HBV и HCV.

Снижение C4-комплемента — прогностически неблагоприятный признак, влияющий на выживаемость больных, отражающий активное течение криоглобулинемического васкулита, он же является предиктором возможного развития лимфопролиферативного заболевания.

Поликлональная гипергаммаглобулинемия, преимущественно за счет увеличения IgG и IgA, реже — IgM, встречается у 50–60% больных. Моноклональные Ig в сыворотке крови и их легкие цепи в моче (белок Бенс-Джонса) выявляются у 20% больных БШ. У 50–60% больных при обнаружении моноклональной секреции Ig удастся диагностировать неходжкинские лимфомы.

Лейкопения является характерным признаком заболевания, часто ассоциирована с высокой иммунологической активностью. Увеличение СОЭ может быть следствием генерализованного васкулита, серозита, развития лимфом или присоединения вторичной инфекции. Увеличение СРБ нехарактерно для БШ. Высокие показатели наблюдаются только при выпотном серозите, гломерулонефрите, деструктивном васкулите с развитием язвенно-некротических поражений, демиелинизирующей невропатии и агрессивных лимфомах.

Диагностика БШ основана на выявлении у больных одновременного поражения глаз и слюнных желез, а также лабораторных признаков аутоиммунного заболевания (анти-Ro/La-антитела, РФ/АНФ).

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.9. Идиопатические воспалительные миопатии

ИВМ представляют группу редких, гетерогенных по клинико-иммунологическим и морфологическим характеристикам аутоиммунных заболеваний, характеризующихся воспалительным поражением поперечнополосатой мускулатуры с развитием прогрессирующей мышечной слабости и включающих основные подтипы: ДМ, ПМ, аутоиммунную некротизирующую миопатию и миозит с включениями. Заболеваемость ИВМ составляет 1,4–5,9 случая на 100 тыс. человек с преобладанием женщин (3:1) и имеет бимодальное возрастное распределение с пиками в 5–15 и 45–55 лет. ДМ встречается в любом возрасте, ПМ — преимущественно после второй декады жизни. По разным данным, в 7–20% всех случаев ИВМ составляет миозит, ассоциированный со злокачественными новообразованиями.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.9.1. Миозит-специфические антитела

Миозит-специфические антитела, реагирующие с различными ядерными и цитоплазматическими антигенами, являются серологическими маркерами ИВМ, включая ПМ и ДМ. Важное диагностическое значение имеет определение анти-Jo-1, анти-Mi-2, частицы сигнального распознавания (SRP) и миозит-ассоциированных антител — анти-RNP, анти-Scl-70, АЦА, анти-SM, анти-Ro (SSA) и анти-La (SSB) антител.

Миозит-специфические антитела имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность в отношении диагностики и прогнозирования течения ПМ/ДМ, они выявляются примерно у 40% больных ПМ/ДМ.

Положительные результаты определения анти-Jo-1 являются диагностическим критерием ПМ/ДМ с наличием антисинтетазного синдрома, который характеризуется острым началом миозита, интерстициального поражения легких, лихорадкой, артритом, феноменом Рейно и изменением кожи кистей по типу «руки механика».

Антитела к SRP обнаруживаются при ПМ, ассоциирующемся с острым началом заболевания, тяжелым течением миозита, кардиомиопатией и резистентностью к терапии глюкокортикоидами. Определение антител к Mi-2 полезно для диагностики классического стероидочувствительного ДМ с благоприятным прогнозом и редким развитием опухолевого миозита. Анти-PM-Scl ассоциируются с субтипом диффузной болезни соединительной ткани (ДБСТ), включающим признаки ССД, ПМ и поражение почек. Анти-KJ выявляются при миозите, феномене Рейно и интерстициальном поражении легких. Для выявления миозит-специфических антител в сыворотке крови используются методы ИБ, ИФА, двойной иммунодиффузии, иммунопреципитации (верхний предел референтного интервала антинуклеоларных антител зависит от техники определения). Исследование проводят один раз в жизни. Клиническое значение миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител.

- Миозит-специфические антитела имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность диагностики и прогнозирования течения ПМ/ДМ, выявляются примерно у 40% больных ПМ/ДМ.
- Положительные результаты определения анти-Jo-1 являются диагностическим критерием ПМ/ДМ с наличием антисинтезного синдрома, который характеризуется острым началом миозита, интерстициальным поражением легких, лихорадкой, артритом, феноменом Рейно и изменением кожи кистей по типу «руки механика».
- Антитела к SRP обнаруживаются при ПМ, ассоциирующемся с острым началом заболевания, тяжелым течением миозита, кардиомиопатией и резистентностью к терапии глюкокортикоидами.
- Определение антител к Mi-2 полезно для диагностики классического стероидочувствительного ДМ с благоприятным прогнозом и редким развитием опухолевого миозита.
- Анти-PM-Scl ассоциируются с субтипом ДБСТ, включающим признаки ССД, ПМ и поражения почек.
- Анти-KJ выявляются при миозите, феномене Рейно и интерстициальном поражении легких.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.9.2. Другие иммунологические и лабораторные маркеры

АНА обнаруживают у 24–60% больных ДМ, 16–40% — у пациентов с ПМ и у 20% пациентов с миозитом с включениями. При наличии очень высоких титров АНА вероятен перекрестный синдром с другими системными заболеваниями соединительной ткани.

Изменения общего анализа крови неспецифичны, увеличение СОЭ наблюдается редко (преимущественно при системных проявлениях).

Из биохимических показателей креатинфосфокиназа — наиболее чувствительный маркер мышечного некроза, коррелирует с выраженностью мышечной слабости. Диагностическое значение имеет определение АЛТ, АСТ, ЛДГ, альдолазы. Активность ферментов следует определять до проведения игольчатой электромиографии из-за травматизации мышечной ткани.

В анализе мочи может быть изменение цвета мочи (красная, бурая), что связано с миоглобинурией — следствием массивного рабдомиолиза.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.10. Системные васкулиты

СВ — группа заболеваний, основным морфологическим признаком которых является воспаление сосудистой стенки, а клинические проявления определяются типом, калибром, локализацией пораженных сосудов и тяжестью иммуновоспалительных изменений. СВ относят к числу относительно редких болезней: заболеваемость составляет около 4,2 на 100 тыс. населения в год.

Кроме клинических проявлений, данных морфологии и инструментальных методов обследования, для диагностики и оценки эффективности проводимой терапии при СВ широко используются лабораторные показатели. Результаты рутинных (ОАК, общий анализ мочи, биохимические показатели, маркеры острофазового ответа) и специальных иммунологических (НРИФ, ИФА) методов определения аутоантител широко представлены в обновленных классификационных критериях АНЦА-СВ, васкулитов, поражающих средние и крупные артерии (ACR/EULAR, 2022).

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

10.10.1. Системные васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами АНЦА-СВ — некротизирующий васкулит с отсутствием (или небольшим количеством) иммунных депозитов, с преимущественным поражением мелких сосудов (капилляров, венул, артериол и мелких артерий), ассоциированный с АНЦА, со специфичностью к МПО или протеиназе 3. Группу АНЦА-СВ составляют три заболевания — гранулематоз с полиангиитом, микроскопический полиангиит и эозинофильный гранулематоз с полиангиитом.

**Гранулематоз с полиангиитом (ранее — гранулематоз Вегенера)** — некротизирующее гранулематозное воспаление с вовлечением верхних и нижних дыхательных путей и некротизирующий васкулит преимущественно сосудов мелкого и среднего калибра (капилляров, венул, артериол, артерий и вен). Часто развивается некротизирующий иммунный (малоиммунный) гломерулонефрит с «полунуниями».

**Микроскопический полиангиит** — некротизирующий васкулит с отсутствием (или небольшим количеством) иммунных депозитов, с преимущественным поражением мелких сосудов (капилляров, венул, артериол). Типично развитие некротизирующего иммунного гломерулонефрита с «полунуниями». Часто присоединяется геморрагический альвеолит. Отсутствует гранулематозное воспаление.

**Эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ранее — синдром Черга–Стросс)** — эозинофильное и гранулематозное воспаление с вовлечением респираторного тракта и некротизирующий васкулит преимущественно сосудов мелкого и среднего калибра. Ассоциируется с бронхиальной астмой и эозинофилией. АНЦА наиболее часто определяются при наличии гломерулонефрита.

Эксперты рекомендовали добавить префикс к названию аутоантител, чтобы указать на специфичность АНЦА (ПР3-АНЦА, МПО-АНЦА или АНЦА-отрицательный). ПР3-АНЦА обнаруживаются у 84–85% пациентов с гранулематозом с полиангиитом и у 2–27% пациентов с микроскопическим полиангиитом, тогда как МПО-АНЦА выявлялись только у 16% пациентов с гранулематозом с полиангиитом и у 75–97% пациентов с микроскопическим полиангиитом.

**Этапы и методы выявления АНЦА.** Согласно международному консенсусу по исследованию АНЦА, при всех подозрительных на СВ клинических проявлениях в качестве скринингового теста должно применяться исследование анти-ПР3 и анти-МПО стандартным ИФА. Выявление АНЦА с помощью ИФА имеет более высокую ДЧ, чем использование НРИФ. Метод НРИФ в качестве скрининга рекомендован только для выявления АНЦА при АИГ и воспалительных заболеваниях кишечника.

Если анти-ПР3 или анти-МПО не обнаружены, а клинические проявления болезни с высокой долей вероятности характерны для АНЦА-СВ, рекомендуется повторить тестирование или выполнить исследование АНЦА с помощью НРИФ или других методов. В метод НРИФ выявления АНЦА внесены технические изменения: нейтрофильные субстраты были объединены с антигеноспецифическими биочипами и технологией микрогранул, стали доступны устройства автоматического распознавания образов для оценки типа свечения. Разработаны автоматический хемилюминесцентный, флуоресцентный, мультиплексный анализ. Эти методы исследования АНЦА с улучшенной чувствительностью и специфичностью можно проводить на автоматизированных платформах.

У пациентов с высокой степенью клинического подозрения и отрицательными результатами теста АНЦА тестирование другим методом может быть полезно для повышения чувствительности. Ложные результаты наблюдаются в основном в образцах с низким уровнем АНЦА. Проведение повторного анализа или применение НРИФ может незначительно повысить специфичность в случаях низкوپоложительных результатов теста.

Отрицательный результат определения АНЦА не исключает диагноз АНЦА-СВ, поскольку небольшая часть пациентов с заболеванием, ограниченным дыхательными путями, или с васкулитом, ограниченным почками, являются АНЦА-негативными.

**АНЦА при других заболеваниях и инфекциях.** АНЦА обнаруживаются при ряде ИВРЗ, таких как РА, СКВ, ССД и БШ. Они встречаются при воспалительных заболеваниях кишечника (язвенный колит), первичном склерозирующем холангите, воспалительных заболеваниях печени (АИГ, первичный билиарный цирроз, хронический вирусный гепатит). В отличие от ИВРЗ и АНЦА-СВ, при этих состояниях выявляются атипичные АНЦА. Перед постановкой диагноза АНЦА-СВ и началом иммуносупрессивной терапии следует исключить такие инфекции, как инфекционный эндокардит, гепатит С и туберкулез, COVID-19, при которых выявляются АНЦА со специфичностью в отношении ПР3 и МПО.

В целом диагноз АНЦА-СВ должен быть обоснован наличием клинических проявлений и данными лабораторных исследований. Положительные результаты биопсии играют существенную роль в подтверждении диагноза заболевания, но прижизненное патоморфологическое исследование в ряде случаев может быть малоинформативным или невыполнимым. Решающее значение в диагностике АНЦА-СВ по-прежнему принадлежит детальному клиническому анализу течения заболевания и подробному обследованию пациентов с выявлением клинико-патологических особенностей, патогномоничных для этих заболеваний.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.10.2. Васкулиты крупных сосудов

**ГКА** — артериит, часто гранулематозный, с поражением аорты, сонных и позвоночной артерий, с частым поражением височной артерии. Как правило, развивается у пациентов старше 50 лет и часто сочетается с РПМ. Результаты СОЭ ( $\geq 50$  мм/ч) и СРБ ( $\geq 10$  мг/л) входят в классификационные критерии ГКА (ACR/EULAR, 2022).

**РПМ** — системное аутовоспалительное ИВРЗ заболевание опорно-двигательного аппарата, которое развивается преимущественно у людей пожилого и старческого возраста, характеризуется интенсивными болями и скованностью мышц плечевого и/или тазового пояса, шеи, системными проявлениями (лихорадка, похудение), сопровождается значительным повышением лабораторных показателей воспаления, а также наступлением ремиссии при назначении глюкокортикоидов в небольших дозах. РПМ нередко сочетается с ГКА. Выделяют две формы заболевания: изолированную РПМ и РПМ с ГКА. Определение СОЭ и СРБ наряду с УЗИ мягких тканей плечевых суставов входит в обязательный перечень обследования при РПМ. СОЭ включена в диагностические критерии заболевания SECRET.

**Артериит Такаясу** — гранулематозный артериит с преимущественным поражением аорты и/или ее главных ветвей. Как правило, развивается у пациентов моложе 60 лет. Осложнения, вызванные повреждением сосудов, могут привести к серьезным заболеваниям, включая инсульт, ИМ, мезентериальную ишемию и хромоту конечностей. Динамика СОЭ

и СРБ — важная составная часть определения мониторинга активности болезни на фоне проводимой терапии, однако нормализация этих показателей не всегда является отражением отсутствия воспалительных изменений в аорте и артериях. В связи с этим необходимо интерпретировать результаты лабораторных исследований совместно с клиническими проявлениями болезни и данными ультразвуковой доплерографии и магнитно-резонансной томографии сосудов.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.11. Анкилозирующий спондилит

АС, или болезнь Бехтерева, — хроническое ИВРЗ из группы спондилоартритов, характеризующееся поражением крестцово-подвздошных суставов и/или позвоночника с потенциальным исходом их в анкилоз, с частым вовлечением в патологический процесс энтезисов и периферических суставов.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.11.1. Роль лейкоцитарных антигенов HLA-B27

Распространенность АС зависит от частоты HLA-B27 — лейкоцитарных антигенов главного комплекса гистосовместимости человека в конкретной популяции, а последняя нарастает от экватора (0%) к приарктическим регионам (25–40%) Земли. В России распространенность болезни составляет 0,1–0,2%. Пик заболеваемости АС приходится на возрастной интервал 25–35 лет. Болезнь дебютирует в 10–20% случаев до 18-летнего возраста, а в возрасте старше 50 лет заболевают не более 5–7%. Мужчины в 3–6 раз чаще болеют, чем женщины. Одним из патогенетических механизмов HLA-B27 при болезни Бехтерева является образование гомодимеров на поверхности клеток вследствие нестабильной природы HLA-B27. Эти гомодимеры взаимодействуют с киллерными Ig-подобными рецепторами на естественных NK и клетках Th17, запуская активацию врожденной и адаптивной иммунной системы. Обнаружено повышение уровня В-клеток в периферической крови, периферических суставах, а также наличие аутоантител в сыворотке крови — анти-CD74, АМЦВ.

Частота выявления HLA-B27 составляет 90% у больных АС, 70% — на ранней, «дорентгенологической», стадии заболевания и 6–10% — в общей популяции. Носительство HLA-B27 не является специфическим тестом для этого заболевания. Определение HLA-B27 рекомендуется использовать для ранней (нерентгенологической стадии) диагностики АС у молодых людей в возрасте до 45 лет при наличии клинических проявлений и наследственных предпосылок заболевания (воспалительная боль в спине >3 мес, семейный анамнез) и отсутствии четких рентгенологических признаков сакроилеита. Тестирование на HLA-B27 полезно для прогнозирования более тяжелого течения АС. Носительство HLA-B27 наряду с высокими базальными уровнями СРБ, молодым возрастом и мужским полом служит предиктором эффективного ответа на терапию ингибиторами ФНО- $\alpha$  при АС. Для оценки выраженности воспалительных изменений определяют уровень СОЭ и СРБ. Однако при АС их повышение или нормальные значения более чем у 50% больных не соответствуют клинической активности заболевания.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.11.2. Лабораторные маркеры анкилозирующего спондилита

*Аутоантитела.* В сыворотках больных АС обнаружен широкий спектр аутоантител, среди которых наибольшее диагностическое значение имеют антитела к CD74. Это IgG, реагирующий с пептидом инвариантной цепи (Ii), ассоциированной с HLA класса II (CLIP), что индуцирует активацию клеток и синтез провоспалительных цитокинов. Антитела к CD74 рассматриваются в качестве кандидатного биомаркера для диагностики АС на ранней «дорентгенологической» стадии заболевания. Наиболее высокая ДЧ антител к CD74 отмечается у больных аксиальным спондилитом с длительностью заболевания <1 года (97%); по мере прогрессирования патологического процесса данный показатель снижается до 69–78%. Антитела к CD74 выявляются у 45% больных псориатическим артритом без признаков поражения аксиального скелета, 11% больных РА, 15% больных СКВ и 0,8% здоровых доноров.

*КП.* При АС отмечено повышение уровней сывороточного и фекального КП. Уровень сывороточного КП у больных АС положительно коррелирует с лабораторными острофазовыми показателями (СОЭ, СРБ), но не с индексами активности заболевания. Повышение базального уровня сывороточного КП служит независимым предиктором быстрого рентгенологического прогрессирования аксиального спондилита. Показано снижение концентрации КП в крови больных АС на фоне терапии ингибиторами ФНО- $\alpha$ . Рассматривается возможность его использования в качестве информативного маркера для прогнозирования клинического ответа на лечение ингибиторами ФНО- $\alpha$ , моноклональными антителами к ИЛ17A (*секукинумаб*).

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.12. Болезнь Стилла у взрослых

БСВ — острое системное воспалительное заболевание с высокой гетерогенностью клинических проявлений и исходов, рассматривается как особая клиническая форма РА. БСВ получила международное признание, что нашло отражение в Международной классификации болезней 10-го пересмотра, в рубрике M06 «Другие РА» (M06.1 Болезнь Стилла, развившаяся у взрослых). Частота болезни составляет 1,5 случая на 100 000–1 000 000 населения, преимущественно описательного характера, представлена в основном в сообщениях о единичных или небольших сериях случаев и ретроспективных наблюдениях. БСВ встречается во всех странах, отмечаются два возрастных пика: 16–25 и 36–46 лет, но может развиваться в пожилом возрасте. Женщины болеют несколько чаще, чем мужчины. Диагноз БСВ обычно предполагается после исключения инфекций, злокачественных новообразований, других системных заболеваний соединительной ткани. БСВ клинически характеризуется ежедневными резкими подъемами температуры тела более 39 °С, артралгиями или артритом, быстро исчезающей кожной сыпью, мультиорганным поражением. Молекулярную основу иммунопатогенеза БСВ составляет активация врожденного иммунитета, связанная с NLRP3 инфламасома-зависимыми механизмами воспаления, характеризуется гиперпродукцией провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-18, индуцирующих синтез других провоспалительных медиаторов воспаления. Типичные лабораторные изменения при БСВ характеризуются лейкоцитозом с нейтрофилией, повышенными уровнями острофазовых показателей (СРБ и СОЭ), повышением активности печеночных ферментов и заметно повышенным уровнем ферритина, при отсутствии РФ и АНА. Уровни неспецифических реактантов острой фазы в сыворотке крови, включая СРБ, СОЭ и ферритин, являются полезными биомаркерами БСВ в повседневной практике как часть более широкой клинической картины, состоящей из характерной комбинации признаков, симптомов и лабораторных данных.

Гиперферритинемия может служить индикатором активности заболевания. Однако при отсутствии характерных клинических проявлений ферритин имеет низкую прогностическую ценность для диагностики БСВ независимо от используемого порогового значения. Потенциально более полезным биомаркером может быть гликозилированный ферритин. У здоровых взрослых 50–80% ферритина гликозилировано. Снижение процента гликозилирования ферритина наблюдается при воспалительных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, инфекциях или заболеваниях печени, но редко составляет менее 20%. В ретроспективном многоцентровом исследовании оценивалось соответствие уровней ферритина и гликозилированного ферритина окончательному диагнозу БСВ. При диагностике БСВ ДЧ и ДС теста на гликозилированный ферритин составила 80 и 66%. При сочетании низких ( $\leq 20\%$ ) значений гликозилированного ферритина с повышением (более чем в 5 раз от нормы) общего ферритина ДЧ и ДС составили соответственно 43 и 93%.

Обнаружено, что спектр клинических, лабораторных и иммунологических нарушений БСВ весьма сходен с таковым при тяжелом течении COVID-19. Как при БСВ, так и при COVID-19 увеличение концентрации CXCL10 (IP-10), ГМ-КСФ, галектина 3 и 9 коррелирует с активностью и тяжестью заболеваний. Низкий (менее 40%) уровень гликозилированного ферритина при COVID-19 ассоциируется с более тяжелым течением болезни и высоким риском смертельного исхода. Однако есть значимые различия в генезе лабораторных показателей: IL-18 увеличен при тяжелом COVID-19, концентрация ферритина при активной БСВ повышена в значительно большей степени, чем при COVID-19.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.13. Пандемия COVID-19 и иммуновоспалительные ревматические заболевания

В основе патогенеза COVID-19 лежит вирусиндуцированная «дисрегуляция» («асинхронизация») врожденного и приобретенного иммунитета, приводящая к гиперпродукции широко спектра провоспалительных, противовоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов, других медиаторов воспаления и патогенных антител к SARS-CoV-2 (анти-SARS-CoV-2) и органонеспецифических и органоспецифических аутоантител, реагирующих с компонентами ядра, цитоплазмы, мембранными белками, цитокинами и другими молекулами. Активация инфламасом (NLRP3, NLRC4, AIM2) играет фундаментальную роль в иммунопатогенезе COVID-19. Синтез молекул, ассоциирующихся с активацией NLRP3 инфламасомы, коррелирует с тяжестью COVID-19, а N-белок SARS-CoV-2 индуцирует активацию NLRP3 инфламасомы и гипервоспаление.

Инфекция SARS-CoV-2 сопровождается развитием системных экстрапульмональных клинических проявлений, а у ряда пациентов, перенесших COVID-19, наблюдаются разнообразные, длительно сохраняющиеся клинические симптомы, характерные для ИБПЗ. В четырех больших когортах больных были оценены риски развития ИБПЗ в группах с COVID-19 и контрольной группе. Интервал наблюдения составил от 1 до 15 мес после развития острой инфекции SARS-CoV-2.

Когорта с COVID-19 имела значительно более высокий риск развития РА, СКВ, АС, ИБМ, ССД, БШ, системных заболеваний соединительной ткани, РПМ, васкулита и псориаза по сравнению с контрольной группой. Риск развития любого ИБЗ у человека был ниже, если COVID-19 был диагностирован, когда преобладающими циркулирующими штаммами были варианты омикрона.

У пациентов в острый период инфекции SARS-CoV-2 и через 12 нед и более после нее (пост-COVID-19-синдром) выявляются аутоантитела, характерные для ИБПЗ, в первую очередь АНА и аФЛ (табл. 10.14). При пост-COVID-19-синдроме по данным молекулярного тестирования SARS-CoV-2 отсутствует, но наблюдается выраженная гиперпродукция антител к нему.

**Таблица 10.14.** Частота выявления аутоантител, характерных для иммуновоспалительных ревматических заболеваний, при COVID-19, %

Аутоантитела	Периоды	
	Острый COVID-19	Пост-COVID-19-синдром
АНФ НРИФ-Нер-2, % Тип свечения	18–55% Ядрышковый (55% — высокий титр при тяжелом течении)	5–30% Ядрышковый (низкий, умеренный титр)
Анти-дсДНК, %	13	5–10
Анти-Jo-1, %	5–10	5–7
Анти-La/SSB, %	10–15	5–10
Анти-Ro/SSA, %	20	5–10
Анти-Scl-70, %	10–15	7
Анти-Sm, %	5	7
аФЛ, %	47	20–30
аКЛ, % Класс Ig	20–40 IgA (26%), IgM (7%), IgG (6%)	6–7 IgA > IgM > IgG
Анти- $\alpha$ 2ГП-I, % Класс Ig	30–40 IgA (29%) > IgG (18%)	20–30 IgA > IgM > IgG
Наличие двух или трех аФЛ одновременно, %	IgA анти- $\alpha$ 2ГП-I, IgA аКЛ (23%)	IgA аКЛ, IgA анти- $\alpha$ 2ГП-I, BA
АНЦА, %	5–7	5–7
Анти-ПРЗ, %	0	5
Анти-МПО, %	0	5
АЦЦП, %	3,5	2–3
РФ, %	20	10–15
Анти-MDA-5-антитела, %	31–48	6
АЦА, %	9	9
Анти-U1-snRNP (68, A, C, B), %	—	6
Анти-ПМ/Scl75, %	—	5
IgG к SARS-CoV-2, %	90–100	>85%

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.13.1. Антинуклеарный фактор при COVID-19

АНФ наиболее часто выявляются при инфекции COVID-19 как в острый период, так и при пост-COVID-19-синдроме. По данным Hileman и соавт. (2024), на основе анализа 991 случая наличие положительного АНФ после COVID-19 было предиктором развития одного из ИВРЗ у 11,9% перенесших COVID-19, предиктором РА у 3,2% пациентов, повышался риск развития СКВ, системных заболеваний соединительной ткани, БШ, кожного васкулита, ангиита гиперчувствительности, РПМ, ИВМ и ССД. При этом продукция АНФ нехарактерна для РА, кожного васкулита, ангиита гиперчувствительности, РПМ и, возможно, является отражением гипервоспаления и развития аутовоспалительных реакций при этих состояниях, индуцируемых SARS-CoV-2. После COVID-19 в тесте НРИФ-Нер-2 преобладал ядрышковый тип свечения, как правило, в низком или умеренном титре. В большинстве случаев (36–70%) при проведении иммуноблота на экстрагируемые ядерные антигены не было получено положительных результатов, что свидетельствует о наличии в сыворотке крови больных COVID-19 АНФ к неизвестным антигенам-мишеням. При исследовании методом иммунопреципитации в сочетании с жидкостной хромато-масс-спектрометрией сывороток больных COVID-19 с высоким титром ( $\geq 1:320$ ) АНФ в НРИФ-Нер-2, у которых было ИВРЗ или злокачественное заболевание, были обнаружены как известные антигены, связанные с аутоиммунными заболеваниями, так и новые аутоантигены. Последние, подтвержденные в иммуноблоте, включали CDK9 (при ССД) и RNF20, RCC1 и TRIP13 (при злокачественных новообразованиях). АНФ при COVID-19, возможно, связан с выработкой аутоантител к антигену DFS-70. Показано, что в сыворотках 13% пациентов с COVID-19 присутствуют анти-дсДНК (а также антитела к лизату эритроцитов и фосфатидилсерину), которые ассоциируются с тяжелым течением COVID-19.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.13.2. Антифосфолипидные антитела при COVID-19

аФЛ «сопровождают» COVID-19. Показано повышение титра аКЛ у 14–20% пациентов с COVID-19 и более в 50% случаев при его тяжелой форме. Увеличение концентрации аФЛ отмечено в среднем через 35–39 дней от начала



инфекции. Более чем в 90% случаев пациентов, госпитализированных с COVID-19 и с изолированным удлинением теста АЧТВ, причиной служил ВА. Это, безусловно, повышает риск тромбообразования у пациентов с COVID-19. В острой фазе болезни одномоментное выявление нескольких типов аФЛ, как правило, наблюдается при тромботических нарушениях и коррелирует с развитием инсульта. Однако у большей части пациентов, включая «тройную позитивность» по аФЛ, не было клинически выраженных тромботических нарушений. В отличие от классического АФС при COVID-19 часто обнаруживаются IgA-анти- $\beta$ 2ГП-I и IgA аКЛ, изолированно или в сочетании между собой, а также с IgG анти- $\beta$ 2ГП-I. После выздоровления аФЛ могут персистировать и ассоциируются с тромбозом сосудов головного мозга.

При наличии генетической предрасположенности (и/или других факторов риска) даже транзиторный синтез аФЛ может приводить к гиперкоагуляции на фоне инфекции SARS-CoV-2. Общий механизм «тромбовоспаления» как при COVID-19, так и при ИБПЗ может быть связан с образованием NETs, которое индуцируется компонентами бактерий, активированными тромбоцитами, белками системы комплемента, аФЛ и другими аутоантителами, провоспалительными цитокинами (IL-1, IL-8). Полагают, что связь между NETs и тромбовоспалением при COVID-19 и ИБПЗ носит «двунаправленный» характер. С одной стороны, NETs являются источником аутоантигенов, а с другой — индуцируют синтез провоспалительных цитокинов, в свою очередь, стимулирующих синтез аутоантител.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

### 10.13.3. Влияние COVID-19 на показатели иммуновоспалительных ревматических заболеваний

Однозначного ответа о повышении частоты ИБПЗ в связи с пандемией COVID-19 пока не получено. По разным амбулаторным службам в разных странах в пандемийный 2020 г. сообщалось о равнозначном или более высоком проценте положительных результатов на ИБПЗ по сравнению с предпандемийным периодом. ИБПЗ с системным поражением диагностировались на том же уровне, что и в предпандемийный период. Эти данные свидетельствуют как о влиянии инфекции COVID-19 на образование аутоантител, так и об увеличении ложноположительных результатов на ее фоне. На международном симпозиуме по аутоантителам при COVID-19, состоявшемся в 2021 г. в Дрездене, были согласованы выводы по аутоантителам при COVID-19.

- Аутоиммунные явления (аутоантитела, дисрегуляция цитокинов) не приравниваются к аутоиммунным заболеваниям. Это относится к таким аутоантителам, как анти-дсДНК и аФЛ, которые могут быть патогенными в некоторых, но не во всех ситуациях.
- Важный момент для оценки аутоиммунных явлений — необходимость повторного отбора проб и клинического наблюдения, поскольку выработка аутоантител зависит от времени. «Моментальный снимок» в произвольное время не может отразить весь процесс образования аутоантител.
- При наличии аутоантител должны быть приняты во внимание следующие факторы: применение лекарственных препаратов, существовавшие ранее аутоиммунные и другие сопутствующие заболевания.
- Наиболее вероятные механизмы, которые способствуют развитию аутоиммунитета у COVID-19: способность SARS-CoV-2 гиперстимулировать иммунную систему, вызывать чрезмерное образование NETs с нейтрофил-ассоциированным цитокиновым ответом и молекулярное сходство между компонентами хозяина и вируса.

Адаптированный метод REAP (Rapid Extracellular Antigen Profiling), позволяющий определять аутоантитела к внеклеточным и секретируемым белкам: в сыворотках пациентов с COVID-19 обнаружено 2770 аутоантител, реагирующих с белками, обладающими иммуномодулирующей активностью. Эти антитела обладали способностью нарушать функцию клеток иммунной системы и ослаблять контроль вирусной инфекции за счет ингибции иммунорецепторной сигнализации и нарушения композиции периферических иммунных клеток. Синтез аутоантител, распознающих «тканевые» антигены, чаще имел место у пациентов с тяжелым COVID-19. Латентный аутоиммунитет был обнаружен у 83% пациентов с пост-COVID-19-синдромом. При этом латентный аутоиммунитет коррелировал с гуморальным ответом на SARS-CoV-2.

В целом пандемия COVID-19 подтвердила наличие тесной связи между механизмами аутоиммунитета и аутовоспаления, а также позволила на новом уровне рассматривать их взаимодействие в континууме ИБПЗ человека.

### Рекомендуемая литература

1. Авдеева А.С. Маркеры воспаления при ревматических заболеваниях // Научно-практическая ревматология. 2022. Т. 60. № 6. С. 561–569. doi: 10.47360/1995-4484-2022-561-569.
2. Александрова Е.Н., Новиков А.А. и др. Современные стандарты исследования антинуклеарного фактора при системных аутоиммунных ревматических заболеваниях. Методические рекомендации. М., 2023.
3. Бекетова Т.В. Новые классификационные критерии АНЦА-ассоциированных системных васкулитов ACR/EULAR 2022 // Научно-практическая ревматология. 2023. Т. 61. № 5. С. 531–536. doi: 10.47360/1995-4484-2023-531-536.
4. Дибров Д.А. Новые лабораторные биомаркеры ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. 2021. Т. 59. № 2. С. 201–207. doi: 10.47360/1995-4484-2021-201-207.
5. Мячикова В.Ю., Ткаченко О.Ю. и др. Маркеры активности болезни Стилла взрослых // Научно-практическая ревматология. 2022. Т. 60. № 3. С. 341–346. doi: 10.47360/1995-4484-2022-341-346.
6. Насонов Е.Л. Современная концепция аутоиммунитета в ревматологии // Научно-практическая ревматология. 2023. Т. 61. № 4. С. 397–420. doi: 10.47360/1995-4484-2023-397-420.
7. Насонов Е.Л. Пандемия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19) и аутоиммунные ревматические заболевания: итоги и перспективы // Научно-практическая ревматология. 2024. Т. 62. № 1. С. 32–54. doi: 10.47360/1995-4484-2024-32-54.

8. Российские клинические рекомендации. Ревматология / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 448 с.
9. Соловьев С.К., Асеева Е.А., Баранов А.А. и др. Клинико-иммунологические особенности фенотипа системной красной волчанки в сочетании с синдромом Шегрена // Современная ревматология. 2023. Т. 17. № 4. С. 50–56. doi: 10.14412/1996-7012-2023-4-50-56.
10. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В. и др. Русскоязычная адаптация международной номенклатуры типов свечения ядра и цитоплазмы клетки (ICAP) для стандартизации выявления антинуклеарного фактора // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22. № 6. С. 1195–1214. doi: 10.15789/1563-0625-RVO-2067.
11. Чельдиева Ф.А., Решетняк Т.М. и др. Глобальная шкала оценки риска развития клинических проявлений антифосфолипидного синдрома (GAPSS) у пациентов с первичным антифосфолипидным синдромом // Современная ревматология. 2023. Т. 17. № 1. С. 31–37. doi: 10.14412/1996-7012-2023-1-31-37.

## Глава 10. Лабораторная диагностика иммуновоспалительных ревматических заболеваний

12. Baker J.F. Diagnosis and differential diagnosis of rheumatoid arthritis. 2023. <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-differential-diagnosis-of-rheumatoidarthritis# H1530529584>.
13. Bhana S. Antinuclear Antibodies (ANA). 2023. <https://www.rheumatology.org/I-AmA/Patient-Caregiver/Diseases-Conditions/Antinuclear-Antibodies-ANA>.
14. Bloch D. Antibodies to double-stranded (ds)DNA, Sm, and U1 RNP. 2022. <https://www.uptodate.com/contents/antibodies-to-double-stranded-ds-dna-sm-and-u1-rnp>.
15. Fanouriakis A., Kostopoulou M. et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus: 2023 update // Ann. Rheum. Dis. 2024. Vol. 83. N. 1. P. 15–29. doi:10.1136/ard-2023-224762.
16. Hellmich B., Sanchez-Alamo B. et al. EULAR recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis: 2022 update // Ann. Rheum. Dis. 2024. Vol. 83. N. 1. P. 30–47. doi: 10.1136/ard-2022-223764.
17. Hileman C.O., Malakooti S.K. et al. New-onset autoimmune disease after COVID-19 // Front. Immunol. 2024. Vol. 15. P. 1337406. doi: 10.3389/fimmu.2024.1337406.
18. Motta F., Bizzaro N. et al. Rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis diagnosis and prognosis: a systematic review and meta-analysis // RMD Open. 2023. Vol. 9. N. 3. P. e002817. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002817.
19. Suppiah R., Robson J.C. et al. DCVAS Study Group. 2022 American College of Rheumatology/European Alliance of associations for rheumatology classification criteria for microscopic polyangiitis // Arthritis Rheumatol. 2022. Vol. 74. N. 3. P. 400–406. doi: 10.1002/art.41983.
20. Taylor P. Maini R. Investigational biologic markers in the diagnosis and assessment of rheumatoid arthritis. 2022. <https://www.uptodate.com/contents/investigationalbiologic-markers-in-the-diagnosis-and-assessment-of-rheumatoid-arthritis>.
21. Walker B.S., Peterson L.K., Koenig C. et al. Performance of MPO-ANCA and PR3-ANCA immunoassays for the stratification of specific ANCA-associated vasculitis: A systematic review and meta-analysis // Autoimmun Rev. 2022. Vol. 21. N. 6. P. 103100. doi: 10.1016/j.autrev.2022.103100.
22. Wallace D.J., Gladman D. Clinical manifestations and diagnosis of systemic lupus erythematosus in adults. 2023. <https://www.uptodate.com/contents/clinicalmanifestations-and-diagnosis-of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults>.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.1. Группы крови AB0, Rh и другие системы

Группы крови — генетически детерминированные антигены эритроцитов (агглютиногены), наследуемые от родителей и не меняющиеся в течение жизни. За более чем 120 лет с открытия первых групп крови были описаны сотни антигенов эритроцитов и предлагались разнообразные терминологии и классификации групп крови. Для преодоления разобщенности исследователей и практических врачей Международным обществом переливания крови (International Society of Blood Transfusion — ISBT) на основе генетического картирования создана числовая (номерная) терминология для антигенов эритроцитов. На сегодняшний день антигены эритроцитов относятся к одной из четырех классификаций.

1. Системы группы крови.
2. Коллекции группы крови.
3. Редко встречающиеся антигены (700-е серии).
4. Часто встречающиеся антигены (901-е серии).

**Система группы крови** состоит из одного или более антигенов, контролируемых одним генетическим локусом или двумя и более очень тесно связанными гомологичными генами с небольшой или не выявляющейся рекомбинацией между ними. Для каждой системы показана четкая генетическая дискретность от другой системы группы крови. Известно 47 систем групп крови, объединяющих 366 антигенов. Эти 47 систем кодируются 52 генами (по состоянию на январь 2025 года) (**табл. 11.1**). Нумерация систем в основном соответствует порядку их открытия [AB0 — 1901 г. (Ландштейнер), MNS — в 1927 г. (Ландштейнер, Левин), RH — 1940 г. (Винер, Ландштейнер, Левин) и т.д.]. Антигены двух систем, Lewis и Chido/Rogers, не экспрессируются на эритроцитах непосредственно, а, сохраняя иммуногенность, адгезируются из плазмы, являясь продуктами секреции других клеток.

**Коллекция группы крови** содержит серологически, биохимически или генетически родственные антигены, характеристики которых не соответствуют критериям системы. Известно пять коллекций, содержащих 14 антигенов. **Редко встречающиеся антигены** (700-е серии) состоят из 14 антигенов, распространенность которых в популяции не превышает 1%.

**Часто встречающиеся антигены** (901-е серии), распространенность которых в популяции более 90%, насчитывают три антигена.

**Таблица 11.1.** Системы групп крови эритроцитов человека

N	Название системы	Обозначение	Название гена (генов)	Хромосомная локализация
001	AB0	AB0	<i>AB0</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	22q13.2
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	<i>LU</i>	19q13.32
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	7q34
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	<i>DARC</i>	1q23.2
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	18q12.3
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	7q22.1
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.33
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	12p12.3
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	7p14.3
016	Landsteiner–Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	<i>FUT1</i>	19q13.33
019	Kx	XK	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	2q14.3
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	1q32.2
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	1q32.2
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	11p13
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	19p13.3
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	15q24.1
027	I	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALT3</i>	3q26.1
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	9p13.3
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	6p21-qter
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	9q34.13
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	4q22
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	2q36
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	1p36.32
035	CD59 (HRF)	CD59	<i>CD59</i>	11p13
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	6p21.1
037	Kanno	KANNO	<i>PRNP</i>	20p13
038	SID	SID	<i>B4GALNT2</i>	17q21.32
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>	19p13.2
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	13q32.1
041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>	19q13.33
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>	4p16.3
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>	16p13.11
044	Er	ER	<i>PIEZO1</i>	16q24.3
045	CD36	CD36	<i>CD36</i>	7q21.11
046	ATP11C	ATP11C	<i>ATP11C</i>	Xq27.1
047	MAL	MAL	<i>MAL</i>	2q11.1

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.1.1. Принципы числовой терминологии для антигенов эритроцитов

Каждый антиген, принадлежащий к системе группы крови, обозначается шестизначным номером: первые три цифры соответствуют номеру системы (например, 004 для RH), вторые три цифры — специфичности антигена внутри системы (например, 004003 для антигена E системы RH). Также возможно написание RH003 или RH3.

Антигены коллекций группы крови обозначаются аналогичным образом. Обозначения антигенов серий 700 и 901 начинаются с этих цифр. Практически ежегодно Рабочая группа ISBT уточняет номенклатуру поверхностных антигенов эритроцитов.

Для практической трансфузиологии большое значение имеют наиболее иммуногенные антигены, в первую очередь систем AB0, RH, Kell (Келл) и другие, указанные в **табл. 11.2**. Антигены коллекций, редко и часто встречающиеся, менее иммуногенны, и необходимость их специфической идентификации в повседневной практике лечебных учреждений отсутствует.

**Таблица 11.2.** Наиболее иммуногенные антигены эритроцитов

Система	Номер антигена					
	001	002	003	004	005	
001	AB0	A	B	AB	A1	
002	MNS	M	N	S	s	U
004	Rh	D	C	E	c	e
005	LU	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Lu3	Lu4	Lu5
006	KEL	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Ku
007	LE	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Le <sup>ab</sup>	—	—
008	FY	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Fy3	Fy4	Fy5
009	JK	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Jk3	—	—
010	DI	Di <sup>a</sup>	Di <sup>b</sup>	Wr <sup>a</sup>	Wr <sup>b</sup>	—

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.1.2. Региональная представленность антигенов эритроцитов

Имеется специфика региональных и расовых различий в распространенности антигенов групп крови. Коренные жители Центральной и Южной Америки в основном имеют фенотип O, соответственно, проблема AB0-несовместимости для трансфузиологов этого региона не столь актуальна. D-негативный фенотип встречается у 15–40% представителей белого населения (кавказоидов), тогда как среди китайцев, японцев и американских индейцев — менее чем у 1% (соответственно, RhD-конфликты у беременных чрезвычайно редки). В ряде регионов достаточно широко распространены антигены, чрезвычайно редко встречающиеся в других популяциях:

- Di<sup>a</sup> (система Diego): у китайцев — 2–5%, у японцев — 8–12%, у американских индейцев — 11–36%;
- In<sup>a</sup> (система Indian) — среди населения Индии и Пакистана (2,3–4,5%);
- антигены системы Gerbich отсутствуют у 80% жителей Новой Гвинеи, что нехарактерно для остального мира.

Проводятся достаточно интенсивные исследования генетического полиморфизма антигенов групп крови, особенностей их тканевой экспрессии, биологических свойств и структурно-функциональных взаимосвязей. С учетом имеющейся информации антигены групп крови можно предварительно классифицировать на пять категорий:

1) транспортеры и мембранные каналы; 2) рецепторы для экзогенных лигандов и микроорганизмов; 3) молекулы адгезии; 4) ферменты; 5) структурные белки.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.2. Агглютинация для исследования групповой принадлежности

#### 11.2.1. Реакция агглютинации

Реакция агглютинации (от лат. *agglutinatio* — склеивание) — связывание антигенов с антителами в растворе. В ходе этой реакции антигены склеиваются антителами и выпадают в осадок в виде иммунных комплексов, видимых невооруженным глазом. Связывание антителами антигенных участков приводит к потере определенных функций молекулы или клетки. Если молекула антигена имеет несколько специфических участков связывания, то антитела могут сшивать их в обширную сеть. Достигнув определенных размеров, такая сеть может выпасть из раствора в осадок. На этом основано определение групп крови, когда эритроциты связываются со специфическими антителами. Реакцию агглютинации используют для определения групп крови с антителами против антигенов эритроцитов, определения специфических антител в сыворотке крови пациентов.

В настоящее время в КДЛ используется несколько модификаций данного метода. Различают прямую и непрямую реакцию агглютинации.

**Реакция прямой агглютинации.** В этой реакции антитела непосредственно агглютинируют корпускулярные антигены, естественные компоненты эритроцитов. Для определения агглютинации (или ее отсутствия) используют стандартные антисыворотки с анти-А- и анти-В-агглютинидами.

**Реакция непрямой (пассивной) агглютинации.** В этом варианте можно определить антитела плазмы. Для получения феномена агглютинации антиген предварительно адсорбируют на клетках (эритроциты барана, I(0)-группы крови человека). Для улучшения адсорбирующих свойств эритроциты животных или человека обрабатывают растворами танина, формальдегида (Формалина<sup>\*</sup>) или бензидина. Эритроциты, адсорбированные на себе антитела, называются сенсibilизированными, а иммунная реакция, в которой они участвуют, — реакцией пассивной гемагглютинации, так как эритроциты участвуют в ней пассивно. В иммуногематологии предварительная адсорбция антигена на эритроцитах практически не используется.

#### **Характеристика реакции агглютинации**

Физическая природа связи антигена и антитела состоит в межмолекулярных нековалентных взаимодействиях: электростатические силы, водородные связи, гидрофобные эффекты, силы ван дер Ваальса. Прочность этих связей зависит от значений pH, ионной силы, температуры, свойств окружающей жидкости. Связь антигена и антитела специфична и обратима. Диссоциация иммунного комплекса, при которой антитело отделяется от антигена клеточной поверхности, называется элюцией.

Реакцию агглютинации можно разделить на две стадии:

- сенсibilизация — соединение антител с антигенами мембраны эритроцита;
- гемагглютинация — соединение сенсibilизированных клеток в агглютинаты.

Это деление достаточно условно и полезно для понимания процесса, происходящего *in vitro*. Фактически обе стадии протекают одновременно, и гемагглютинация начинается до завершения сенсibilизации.

Результат реакции агглютинации зависит от ряда условий.

- Соблюдение адекватного соотношения концентраций антигенов и антител — для создания «зоны эквивалентности».
- Кислотность. Большинство антител к антигенам эритроцитов реактивны при pH от 6,5 до 7,5. Обычно используется pH 7,0.
- Ионная сила. Ионы Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в обычном изотоническом растворе натрия хлорида отчасти нейтрализуют электрический заряд активных участков антигенов и антител. При снижении ионной силы среды этот нейтрализующий эффект уменьшается. Кроме того, низкая концентрация ионов способствует ускорению образования комплекса «антиген–антитело». Поэтому в иммуногематологической практике широко распространено использование в качестве «усиливающего» реагента раствора низкой ионной силы.
- Температура. Антитела к антигенам групп крови различаются по температурному оптимуму реагирования. Антитела класса IgM лучше реагируют при температуре от +4 до +27 °C, а антитела класса IgG — при температуре +37 °C. Антитела, реагирующие *in vitro* только при температуре менее +37 °C, как правило, не вызывают разрушения эритроцитов и не имеют клинического значения.
- Время. Слишком ранний учет результатов чреват тем, что реакция еще не произошла. При затянутой инкубации может произойти диссоциация иммунных комплексов. При использовании «усиливающих» реагентов, например раствора низкой ионной силы, оптимальное время инкубации сокращается.
- Учет класса антител. Антитела класса IgM активнее индуцируют агглютинацию, чем антитела класса IgG.
- Недостаточная экспрессия антигенов. Возможно, что на мембране эритроцита экспрессировано незначительное количество молекул антигена либо антиген «погружен» в липидный бислой.
- Электростатическое отталкивание эритроцитов. Эритроциты отталкиваются вследствие отрицательного поверхностного заряда («дзета-потенциала»). Для преодоления этого эффекта используют: 1) обработку клеток протеолитическими ферментами; 2) добавление коллоидов в реакционную среду; 3) центрифугирование.

#### **Роль пространственной конфигурации антигенов эритроцитов**

Различия типа экспрессии антигенов эритроцитов обуславливают необходимость использования разных методических подходов к их выявлению. Ключевое значение для агглютинации имеет высота антигена над липидным бислоем мембраны эритроцита. Следует иметь в виду, что:

## **Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование**

- в суспензии расстояние между липидными бислоями двух эритроцитов — 18 нм;
- максимальное расстояние между двумя антигенсвязывающими участками молекулы IgG — 12 нм;
- максимальное расстояние между двумя антигенсвязывающими участками молекулы IgM — 30 нм;
- антигены систем AB0 и MNS выступают над липидным бислоем мембраны на 10–12,5 нм;
- антигены систем Rh и Diego выступают над липидным бислоем мембраны около или менее чем на 1 нм.

Пространственная конфигурация диктует, что:

- молекула IgG может соединиться антигенсвязывающими участками с антигенами систем АВ0 и MNS (12 нм + 10 нм + 10 нм > 18 нм);
- молекула IgG не может соединиться своими антигенсвязывающими участками с антигенами систем Rh и Diego (12 нм + 1 нм + 1 нм < 18 нм).

Для связывания антигенов системы Rh пригодны и широко применяются в клинической практике два способа.

- Использование специфических антител класса IgM, которые могут соединиться своими антигенсвязывающими участками с антигенами систем Rh (30 нм + 1 нм + 1 нм > 18 нм).
- Использование дополнительных «антиглобулиновых» антител — антител к глобулинам человека (проба Кумбса). В этой реакционной среде имеет значение расстояние между специфическими антигенсвязывающими центрами двух антител класса IgG, которые, в свою очередь, связаны специфическим антителом к глобулинам человека. Соответственно, расстояние между участками молекул Ig, связывающими антигены эритроцитов, значительно превышает 18 нм.

**Гемолиз, вызванный образованием комплекса «антиген–антитело»**

Наличие антител к эритроцитам может проявиться гемолизом из-за разрушения мембраны комплементом, активированным комплексом «антиген–антитело». Опосредованный антителами гемолиз не развивается в отсутствие иммобилизованного на эритроцитах компонента комплемента C3d или в плазме, содержащей кальцийсвязывающий антикоагулянт (цитрат, ЭДТА), при условии, что изначально сыворотка не была гемолизированной и при тестировании не добавлялись гемолитические агенты. Гемолиз в супернатанте — признак реакции «антиген–антитело» (**табл. 11.3**).

**Таблица 11.3.** Интерпретация гемолиза в серологической реакции

Оценка	Проявления
Сильный	Красный супернатант, интактные клетки отсутствуют или единичные
Средний	Розовый супернатант, некоторые клетки интактны
Слабый	Бледно-розовый супернатант, много интактных клеток

Агглютинацию можно обнаружить несколькими методами: в пробирке, на плоскости в микропланшетах. В анализаторах применяют исследование агглютинации в геле, стеклянных шариках, планшетах, методом магнитизации.

**Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование**

**11.2.2. Агглютинация в пробирке**

В пробирке при ручном тестировании агглютинацию выявляют визуально по агрегации (слипанию) эритроцитов в осадке после центрифугирования. Эритроциты поддерживаются в растворе в виде суспензии за счет электростатических сил отталкивания. Антитела, реагирующие с антигеном эритроцитов, образуют связи между частицами, что позволяет преодолеть силы отталкивания с образованием нерастворимых агрегатов. В плазме крови постоянно присутствуют антитела (агглютинины) к отсутствующим на эритроцитах антигенам системы группы крови АВ0, принадлежащим к антителам IgM и IgG. Каждое антитело может связывать более одной молекулы-мишени, позволяя антителам сшивать антигены, присутствующие в множественных копиях на эритроцитах. Молекула IgG содержит два антигенсвязывающих сайта, молекула IgM — 10 мест связывания с антигеном. Агглютинация под действием антител класса IgM более активна по сравнению с агглютинацией опосредованной IgG, что обусловлено большим размером молекул IgM, содержащих 10 антигенсвязывающих участков. Количество копий антигена и плотность их экспрессии на мембране варьируют в зависимости от группы крови. Агглютинация используется для серологической пробы на совместимость (донорские эритроциты инкубируют с плазмой или сывороткой донора или реципиента), скрининга на наличие нерегулярных (неожиданных) антител (эритроциты-реагенты с известным составом антигенов группы крови инкубируют с плазмой или сывороткой реципиента) и фенотипирования антигенов групп крови донора или реципиента (исследуемые эритроциты инкубируют с реагентами — моноклональными антителами или антисыворотками с известной специфичностью). Описание агглютинации в зависимости от концентрации взаимодействующих структур представлено в **табл. 11.4**.

**Таблица 11.4.** Интерпретация реакций агглютинации в пробирке

Выраженность реакции	Степень	Величина, баллов	Проявления
4+	Полная	12	Единый агглютинат. Свободные эритроциты не обнаруживаются
3,5+	4+ <sup>w</sup> или 3+ <sup>s</sup>	11	Определяются опытным глазом
3+	3+	10	Выраженная агглютинация. Много больших агглютинатов
2,5+	3+ <sup>w</sup> или 2+ <sup>s</sup>	9	Определяются опытным глазом
2+	2+	8	Большие агглютинаты среди меньших скоплений клеток. Свободные эритроциты не обнаруживаются
2+ <sup>w</sup>	2+ <sup>w</sup>	7	Много средних и малых агглютинатов. Свободные эритроциты не обнаруживаются

1,5+	1+ <sup>s</sup>	6	Много средних и малых агглютинатов. В нижнем слое — свободные эритроциты
1+	1+	5	Много малых агглютинатов на фоне свободных эритроцитов
1+ <sup>w</sup>	1+ <sup>w</sup>	4	Много очень малых агглютинатов среди множества свободных эритроцитов
0,5+ или —	± Макро-	3	Слабая зернистость суспензии эритроцитов. При макроскопии — несколько агглютинатов. При микроскопии — множество агглютинатов
Следы (микро-)	(+) Микро-	2	При макроскопии — нет агглютинации. При микроскопии в большинстве полей зрения небольшое число агглютинатов из 6–8 клеток
Неопределенная	(0 <sup>R</sup> ) Приблизительно	1	При микроскопии — единичные агглютинаты
0	0	0	Суспензия одинаковых эритроцитов. Агглютинаты не обнаруживаются

**Примечание.**

1. Для взбалтывания осевшего агломерата эритроцитов со дна пробирки нужно аккуратно перемешать или перевернуть пробирку.
2. После полного ресуспендирования клеток оценивают степень агглютинации в соответствии с данными таблицы.
3. Следует описать характер агглютинации. Нужно особо отметить расплывчатые, волокнистые, неоднородные и распадающиеся агглютинаты, которые могут иметь ключевое диагностическое значение при сложных клинических ситуациях.

Необходимо учесть, что при взаимодействии гомологичных антигена и антитела не всегда наблюдаются видимые проявления реакции агглютинации. Агрегаты образуются при оптимальных соотношениях обоих компонентов реакции.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

Картина агглютинации определяется концентрацией взаимодействующих структур:

- при избытке антител агглютинаты не образуются вследствие отсутствия свободных эпитопов («прозона»);
- при приблизительно равном соотношении антигенных детерминант и молекул антител развивается видимая агглютинация («зона эквивалентности»);
- при дефиците антител агглютинаты не образуются вследствие связывания единичных молекул иммуноглобулинов с отдельными клетками («постзона»).

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.2.3. Агглютинация на плоскости в микропланшетах

Другой традиционный ручной метод — исследование агглютинации в титрационных стеклянных микропланшетах по распределению эритроцитов в отдельных лунках. Реакции агглютинации (прямые и пассивные) на стекле обычно применяют в качестве ускоренного метода обнаружения специфических антител в сыворотке больного. Используют моноклональные антитела или их набор к различным антигенам. Несомненным достоинством реакции агглютинации на стекле является простота ее постановки и то, что она протекает несколько минут или даже секунд, так как оба компонента в ней используются в концентрированном виде. Однако она имеет лишь качественное значение и менее чувствительна, чем пробирочная.

Для реакций на микропланшетах удачно использовались наборы цоликлонов (название от разработчика ЦОЛИПК — Центральный ордена Ленина институт переливания крови, ныне НМИЦ гематологии Минздрава России). Цоликлон — это раствор моноклональных антител к антигенам эритроцитов.

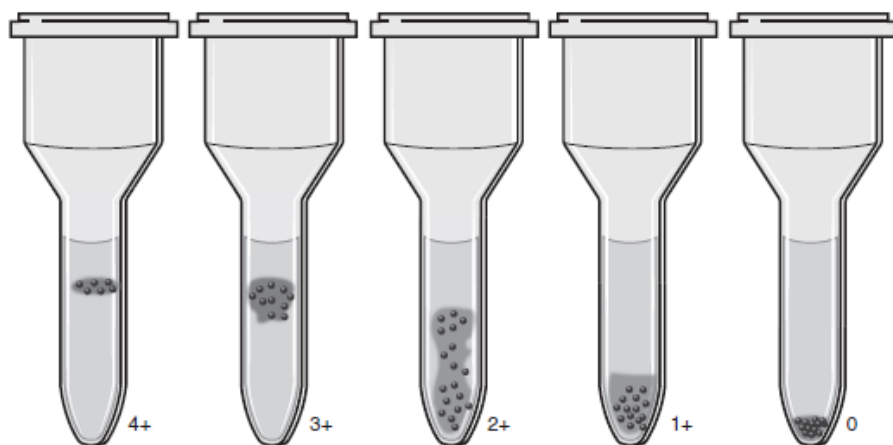
В настоящее время существует большое количество моноклональных антител к разным антигенам, которые предназначены для определения групп крови по различным системам. Наиболее часто используются моноклональные антитела анти-А, анти-В и анти-D. Первые два реагента предназначены для определения группы крови по системе АВ0, последний — для определения фенотипа RhD.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.2.4. Агглютинация в геле

Гелевые тесты широко используют в современной автоматизированной трансфузиологии. После агглютинации реакционную смесь центрифугируют через гелевую матрицу, обычно состоящую из декстран-акриламида. Неагглютинированные эритроциты проходят через гель, в то время как более крупные агглютинированные комплексы остаются на поверхности или внутри матрицы. Преимущества тестирования на основе геля по сравнению с тестированием в пробирке включают стандартизацию силы реакции, чувствительности и оптимизацию

производительности благодаря использованию автоматизированных платформ и возможности исключить некоторые этапы отмывания (рис. 11.1), а также выявить двойную популяцию эритроцитов (химера).



**Рис. 11.1.** Интерпретация метода колоночной агглютинации в геле. В колонках слева направо агглютинация убывает от 4+ до 0. 4+ — выраженная агглютинация, сильная реакция антиген–антитело. 0 — агглютинации нет. При промежуточных степенях агглютинации следует рассмотреть возможность дополнительных исследований

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.2.5. Антиглобулиновые тесты

Робин Кумбс предложил использовать антитела к глобулину человека (античеловеческий глобулин — АЧГ), нарабатываемые лабораторными животными (кролик) к глобулинам человека. Синоним пробы Кумбса — антиглобулиновый тест. Проба Кумбса выполняется в двух вариантах — прямой и непрямой тест.

**Прямой антиглобулиновый тест:** для определения наличия IgG, фиксированных на поверхности эритроцитов, суспензию эритроцитов пациента смешивают с антителами против IgG. Если наблюдается агглютинация эритроцитов, тест считается положительным, указывая на наличие IgG на поверхности эритроцитов.

**Непрямой антиглобулиновый тест** выявляет антитела к эритроцитам, присутствующие в пробах крови. Сначала инкубируют сыворотку реципиента с эритроцитами донора, затем добавляют АЧГ в реакционную смесь в поиске нерегулярных антител реципиента, сенсибилизировавших донорские эритроциты. В пробе используются эритроциты, которые экспрессируют известные антигены, они выступают в качестве реагентов. Если в плазме или сыворотке присутствуют антитела против антигена на реагентных клетках, антитела будут связываться с реагентными эритроцитами, вызывая их агглютинацию или гемолиз. Положительная реакция с реагентными клетками указывает на то, что тестируемый образец плазмы или сыворотки содержит антитела, которые связываются с эритроцитами, имеющими этот антиген. Пациенту не следует переливать эритроциты до тех пор, пока не будет известна антигенная специфичность антиэритроцитарных антител, иначе в организме реципиента перелитые эритроциты покроются нерегулярными антителами, будут поглощены макрофагами, разрушены, и разовьется отсроченный внесосудистый гемолиз. Когда целевой антиген антиэритроцитарных антител установлен, для переливания отбирают только те компоненты крови, которые отрицательны по данному антигену. Различные типы реагентных клеток применяются при детекции системы Rh, систем MNS, системы Lewis, системы Kell, системы Duffy и системы Kidd.

**Ферментный тест** — способ, повышающий чувствительность реакции агглютинации эритроцитов антителами класса IgG. В результате предварительной обработки эритроцитов протеолитическими ферментами (папаин, бромелайн, трипсин) происходит улучшение непосредственного взаимодействия молекулы IgG с антигенами эритроцитов за счет удаления остатков сиаловых кислот на гликофоринах A, B, C, D, обуславливающих ее отрицательный заряд мембраны, а также удаление с поверхности клетки гликопептидов, затрудняющих доступ молекулы IgG к липидному бислою мембраны. Ограниченность ферментного метода обусловлена тем, что протеазы повреждают некоторые антигены групп крови (M, N, Ss, Gerbich, Fy<sup>a</sup>, In<sup>a</sup>/In<sup>b</sup>, Cromer). В то же время клинически значимые антигены (Rh, Di, K, Jk) остаются сохранными.

В последние годы внедряются в практику новые иммуногематологические методы (микропланшетный, магнитизации, твердофазный), позволяющие стандартизировать и автоматизировать процедуры определения антигенов эритроцитов и антител к ним.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.3. Система группы крови AB0

Систему группы крови AB0 составляют два групповых агглютиногена — A и B — и два соответствующих агглютинина в плазме —  $\hat{a}$  (анти-A) и  $\hat{b}$  (анти-B). Различные сочетания этих антигенов и антител образуют четыре группы крови: группа 0 — оба антигена отсутствуют; группа A — на эритроцитах присутствует только антиген A; группа B — на эритроцитах присутствует только антиген B; группа AB — на эритроцитах присутствуют антигены A и B. Уникальность системы AB0 состоит в том, что в плазме у неиммунных людей имеются естественные (регулярные) антитела к отсутствующему на эритроцитах антигену: у лиц группы 0 — антитела к A и B; у лиц



группы А — анти-В-антитела; у лиц группы В — анти-А-антитела; у лиц группы АВ нет антител к антигенам системы АВ0. В последующем тексте анти-А- и анти-В-антитела будут обозначаться как анти-А и анти-В.

Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

11.3.1. Фенотип системы АВ0

Фенотип системы АВ0 — результат взаимодействия продуктов двух генных локусов — *H* и *ABO*. Ген локуса *H* производит фермент  $\alpha$ 2-L-фукозилтрансферазу, присоединяющий фукозу к параглобозиду типа II (или лакто-N-неотетраозилцерамиду) на мембране эритроцита, — так образуется антиген Н. Антиген Н — акцептор трансфераз, производимых генами *A* и *B*. Известен редко встречающийся ген *h*, продуктов которого не обнаружено. При наследовании двух генов *h* образуется фенотип Бомбей. У людей с фенотипом Бомбей нет антигена Н, и, соответственно, даже при наличии нормальных генов *A* и *B* продукция антигенов А и В невозможна. В локусе *ABO* описаны три главных аллеля — *A*, *B* и *O*. Гены *A* и *B* отвечают за продукцию N-ацетилгалактозаминилтрансферазы и D-галактозилтрансферазы соответственно (табл. 11.5). На первичные углеводные остатки антигена Н продукт гена *A* переносит N-ацетилгалактозамин, а продукт гена *B* — галактозу. Аморфный ген *O* не производит продукт, поэтому у лиц, наследовавших два гена *O*, на эритроцитах экспрессированы только антигены Н. Поэтому у лиц с группой крови 0 количество антигенов Н на эритроцитах больше, чем у представителей других групп системы АВ0.

Таблица 11.5. Продукты генов H, A и B

Ген	Продукт гена	Сахар, переносимый ферментом
H	$\alpha$ 2-L-фукозилтрансфераза	Фукоза
A	N-ацетил-D-галактозаминилтрансфераза	N-ацетил-D-галактозамин
B	D-галактозилтрансфераза	D-галактоза
O	Нет	Нет

Таким образом, имеются три иммунодоминантных сахара — фукоза, N-ацетилгалактозамин и галактоза, которые определяют специфичность антигенов Н, А и В соответственно.

Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

11.3.2. Генотип системы АВ0

Продукты генов *ABO* экспрессируются по аутосомно-кодминантному типу. Например, у лиц, унаследовавших гены *A* и *B*, экспрессируются продукты обеих этих генов, что приводит к образованию фенотипа АВ. Фенотип А может быть у человека, унаследовавшего или два гена *A*, или гены *A* и *O*. Следовательно, для определения генотипа необходимы семейные исследования (табл. 11.6).

Таблица 11.6. Наследование групп крови системы АВ0

Фенотипы родителей	Генотипы родителей	Фенотип (генотип) ребенка
А×А	АА×АА	А (АА)
	АА×АО	А (АА или АО)
	АО×АО	А (АА или АО) или О (ОО)
В×В	ВВ×ВВ	В (ВВ)
	ВВ×ВО	В (ВВ или ВО)
	ВО×ВО	В (ВВ или ВО) или О (ОО)
АВ×АВ	АВ×АВ	АВ (АВ) или А (АА) или В (ВВ)
О×О	ОО×ОО	О (ОО)
А×В	АА×ВВ	АВ (АВ)
	АО×ВВ	АВ (АВ) или В (ВО)
	АА×ВО	АВ (АВ) или А (АО)
	АО×ВО	АВ (АВ) или А (АО) или В (ВО) или О (ОО)
А×О	АА×ОО	А (АО)
	АО×ОО	А (АО) или О (ОО)
В×О	ВВ×ОО	В (ВО)
	ВО×ОО	В (ВО) или О (ОО)
А×АВ	АА×АВ	АВ (АВ) или А (АА)
	АО×АВ	АВ (АВ) или А (АА или АО) или В (ВО)
В×АВ	ВВ×АВ	АВ (АВ) или В (ВВ)
	ВО×АВ	АВ (АВ) или В (ВВ или ВО) или А (АО)

AB×O

AB×OO

A (AO) или B (BO)

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.3.3. Антитела к антигенам группы AB0

Естественные анти-А и анти-В к отсутствующему на эритроцитах антигену образуются в результате действия генетических и внешних факторов. Классической иллюстрацией этого положения служат эксперименты на цыплятах, у которых обычно выявляют антитела, подобные анти-В. Эти антитела не вырабатываются у цыплят, выращенных в стерильных условиях. Однако при добавлении в пищу штаммов кишечной палочки, поверхность которой богата остатками галактозы, анти-В начинают продуцироваться в высоком титре. Подобные эксперименты с участием человека не проводились, тем не менее считается, что анти-А и анти-В образуются под действием иммунодоминантных сахаров — составляющих клеточной стенки бактерий внешней среды, а также населяющих пищеварительный тракт.

Циркулирующий пул анти-А и анти-В состоит из трех классов Ig — IgM, IgG и IgA. У лиц с группами крови А и В анти-В и анти-А соответственно представлены в основном белками класса IgM, тогда как при фенотипе О анти-А и анти-В главным образом состоят из IgG, при этом IgM и IgA присутствуют в меньшей степени.

Особенность анти-А и анти-В — способность к резкой активации комплемента, что обуславливает их клиническую значимость. При переливании АВ0-несовместимой крови специфические антитела активируют комплемент, что ведет к внутрисосудистому лизису эритроцитов, развитию ДВС и острой почечной недостаточности у реципиента.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.3.4. Порядок определения группы крови АВ0 в медицинской организации

Определение группы крови АВ0 проводят путем идентификации специфических антигенов и антител (двойная или перекрестная реакция). Анти-А и анти-В выявляют в сыворотке крови с помощью стандартных эритроцитов А и В. Наличие или отсутствие на эритроцитах антигенов А и В устанавливают при помощи моноклональных или поликлональных антител (стандартных гемагглютинирующих сывороток) соответствующей специфичности.

Определение группы крови проводят дважды: первичное исследование — в лечебном отделении (бригаде заготовки крови); подтверждающее исследование — в лабораторном отделении. При заготовке крови в первый раз нужно определить группу крови из пробирки, отобранной из бактывама в начале донации, во второй раз — из сегмента трубки донорского контейнера.

В больнице есть и третье определение — непосредственно перед переливанием, чтобы не перепутать ни реципиента, ни донорский гемоконтейнер.

Результат определения группы крови записывается в специально отведенном месте лицевого листа истории болезни или в донорский журнал (карту) с указанием даты и за подписью врача, производившего определение.

Определение группы АВ0 новорожденного основано только на типировании эритроцитов. Типирование плазмы или сыворотки («обратное» типирование) не проводится, поскольку АВ0-антитела, возможно, присутствующие после рождения, имеют материнское, а не неонатальное происхождение. Собственные антитела новорожденный начнет вырабатывать, прожив 4 мес.

На Северо-Западе России распределение групп крови системы АВ0 в популяции следующее: группа 0 — 35%; группа А — 35–40%; группа В — 15–20%; группа АВ — 5–10%.

Следует отметить, что существуют разные виды (слабые варианты) как антигена А (в большей степени), так и антигена В. Наиболее часто встречаются виды антигена А —  $A_1$  и  $A_2$ . Последние являются продуктами генов  $A_1$  и  $A_2$ . Хотя оба эти гена кодируют N-ацетилгалактозиламинил трансферазу, между ними наблюдаются количественные и качественные отличия.

Фермент, кодируемый  $A_1$ , существенно более эффективно трансформирует антиген Н в А: на эритроцитах лиц с генотипом  $A_1$  экспрессируется около миллиона молекул антигена А, тогда как у лиц с генотипом  $A_2$  — лишь 250 000. Соответственно, на эритроцитах с антигеном  $A_2$  сохранено значительное количество молекул Н — больше только на эритроцитах группы 0. Установлены и качественные биохимические отличия трансфераз  $A_1$  и  $A_2$ .

Распространенность антигена  $A_1$  у лиц групп А и АВ составляет 80%, а антигена  $A_2$  — около 20%. Образцы крови с  $A_2$  могут содержать анти- $A_1$ -антитела (2–4% в группе крови  $A_2$  и 25–30% — в группе  $A_2B$ ), взаимодействующие со стандартными эритроцитами группы А. Наличие анти- $A_1$  выявляется при перекрестном определении групп крови и при проведении пробы на индивидуальную совместимость.

Для дифференцированного определения вариантов антигена А ( $A_1$  и  $A_2$ ) необходимо использовать специфические реагенты (фитогемагглютинины или моноклональные антитела анти- $A_1$ ). Фитогемагглютинины (лектины) — вещества растительного происхождения, обладающие специфической способностью связывать субстанции антигенов (сахара) на поверхности эритроцитов, в результате наступает агглютинация клеток. В практике службы крови используются два таких реагента:

- семена *Dolichos biflorus* — лектин со специфичностью  $A_1$ ;
- семена *Ulex europaeus* — лектин со специфичностью Н, связывающий фукозу.

Пациентам групп  $A_2$  и  $A_2B$  нужно переливать эритроцитсодержащие гемокомпоненты, соответственно, групп  $A_2$  и  $A_2B$ . Также могут быть рекомендованы трансфузии отмытых эритроцитов:  $O$  — пациентам с группой крови  $A_2$ ;  $O$  и  $B$  — пациентам с группой крови  $A_2B$ .

Другие подгруппы антигена  $A$  — продукты редких аллелей локуса  $ABO$  ( $A_{int}$ ,  $A_3$ ,  $A_x$ ,  $A_m$ ,  $A_{end}$ ,  $A_{el}$ ,  $A_{bantu}$ ,  $A_{finn}$ ) — имеют меньшее клиническое значение, для их выявления полезны семейные исследования.

У лиц с фенотипом Бомбей на эритроцитах отсутствуют антигены  $H$ ,  $A$  и  $B$ , а в сыворотке присутствуют «естественные» анти- $H$ , анти- $A$  и анти- $B$ . Соответственно, при скрининге антител все эритроциты, в том числе и группы  $O$ , будут агглютинироваться такой сывороткой. Фенотип Бомбей обозначается  $O_H$ . Реципиентом с таким фенотипом можно переливать лишь также Бомбей-эритроциты. В России лиц с фенотипом Бомбей пока не встречали.

Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

11.3.5. Стандартные процедуры для определения групп крови системы  $ABO$

**Стандартные реактивы.** Первооткрыватель групп крови Карл Ландштейнер и его последователи работали стандартными изогемагглютинирующими сыворотками, приготовленными из крови людей и некоторых жидкостей, содержащими групповые антитела (агглютинины). Сыворотки предназначаются для определения групповой принадлежности крови людей по системе  $ABO$ .

Сегодня на смену стандартным изогемагглютинирующим сывороткам пришли коммерчески доступные моноклональные антитела.

**Стандартные способы.** Возможны два способа определения группы крови.

1. Определение группы крови при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток (моноклональных антител). При этом способе в крови устанавливают наличие или отсутствие агглютиногенов и исходя из этого делают заключение о групповой принадлежности исследуемой крови.

2. Определение группы крови перекрестным способом, то есть одновременно при помощи стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов. При этом способе, так же как и при первом, определяют наличие или отсутствие агглютиногенов и, кроме того, при помощи стандартных эритроцитов устанавливают наличие или отсутствие групповых агглютининов.

Группа крови у пациентов, которым предполагается сделать переливание крови, определяется врачом клинического отделения, прошедшим обучение по трансфузиологии. Во избежание ошибки подтверждающее определение группы крови выполняют в лаборатории.

Результат определения группы крови (табл. 11.7). записывается в специально отведенном месте лицевого листа истории болезни. Все лабораторные исследования проводят, руководствуясь инструкцией к используемым диагностическим реагентам.

Таблица 11.7. Результаты определения группы крови  $ABO$

Результаты исследования						Групповая принадлежность исследуемой крови
эритроцитов с реагентом			сыворотки (плазмы) со стандартными эритроцитами			
Анти-AB	Анти-A	Анти-B	0	A	B	
—	—	—	—	+	+	0
+	+	—	—	—	+	A
+	—	+	—	+	—	B
+	+	+	—	—	—	AB

Примечание. «+» — наличие агглютинации, «—» — отсутствие агглютинации.

Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

11.4. Система группы крови  $Rh$

Антигены системы  $Rh$  в европейской части России встречаются со следующей частотой:  $D$  — 85%;  $C$  — 70%;  $c$  — 80%;  $E$  — 30%;  $e$  — 97,5%. Чем выше в популяции доля монголоидов, тем меньше  $RhD$ -отрицательных.

Антигены системы  $Rh$  обладают способностью вызывать образование аллоиммунных антител.

Наиболее активным в этом отношении является антиген  $D$

Историческая справка. Карл Ландштейнер и Александр Винер иммунизировали кролика эритроцитами макаки и обнаружили антиген Резус. Впоследствии эту систему антигенов в честь великих ученых назвали Ландштейнер–Винер ( $LW$ ). Фенотипы систем  $Rh$  и  $LW$  близки.

Антигены  $LW$  в большом количестве присутствуют на  $D$ -положительных клетках и слабо представлены на  $D$ -отрицательных клетках. Это и привело к изначальному перепутыванию антигенов  $LW$  с антигеном  $D$ . У макаки резусов нет антигена  $D$  и всей системы  $Rh$ . И система  $Rh$  никогда не называлась «Резус». То есть мы живем в мифе, сотворенном Александром Соломоновичем Винером, сыном российского эмигранта.. Именно по наличию или отсутствию антигена  $D$  все люди делятся на  $Rh$ -положительных и  $Rh$ -отрицательных. Иммуногенность других (минорных) антигенов системы  $Rh$  существенно ниже и убывает в ряду:  $c > E > C > e$ .

Иммунная система  $RhD$ -отрицательных лиц при контакте с антигеном  $D$  синтезирует анти- $D$ -антитела, что клинически важно при аллогенных гемотрансфузиях и беременности  $RhD$ -отрицательной женщины  $RhD$ -положительным плодом

(посттрансфузионные гемолитические реакции и ГБПН соответственно). В зависимости от гаплотипа на мембране эритроцитов обычно экспрессировано 10 000–30 000 молекул D, а в некоторых случаях и более.

Существуют две особые категории D-позитивных лиц, способных образовывать анти-D-антитела.

Первая — лица, эритроциты которых характеризуются значительно сниженной экспрессией нормального D на мембране, порядка 100–500 молекул на клетку, «слабый» D ( $D^{\text{weak}}$ ). Референс-методом выявления слабого D является непрямой антиглобулиновый тест.

Вторая — лица, эритроциты которых характеризуются экспрессией измененного D (частичный D,  $D^{\text{partial}}$ ).

Исследования в настоящее время показали наличие 30 легко распознаваемых эпитопов антигена D. В редких случаях имеет место недостаток одного или нескольких эпитопов, соответственно, иммунная система лиц с частичным D способна вырабатывать антитела к отсутствующим эпитопам. Современный подход к выявлению частичного D предполагает исследование Rh-принадлежности с использованием двух реагентов: моноклональных анти-D-антител класса IgM и поликлональных анти-D-антител класса IgG (либо моноклональных анти-D-антител класса IgG).

Для удобства в повседневной работе иммуногематологических лабораторий слабые варианты антигена D объединяют в группу  $D^u$ , частота которой составляет около 1%. Эти эритроциты слабо или вообще не агглютинируются полными анти-Rh-антителами в реакции прямой агглютинации. В большинстве (порядка 90%) случаев для частичного D категории VI характерен генотип CcDee. С помощью высокоспецифичных моноклональных антител устанавливается гетерогенность частичного D категории VI. Реципиенты, содержащие антиген  $D^u$ , должны быть отнесены к Rh-отрицательным, и им должна быть перелита только Rh-отрицательная кровь, так как нормальный антиген D может вызвать у таких лиц иммунный ответ.

Лица с антигеном  $D^u$  квалифицируются как RhD-положительные доноры, так как переливание их крови может вызвать иммунный ответ у RhD-отрицательных реципиентов, а в случае предшествующей сенсибилизации к антигену D — тяжелые трансфузионные реакции. Поэтому кровь доноров следует обязательно тестировать на присутствие  $D^u$ . Беременным с частичным D категории VI, когда ожидается рождение ребенка с полным D, целесообразно назначение анти-RhD-Ig.

RhD-принадлежность крови больных устанавливают по наличию или отсутствию антигена D. Во избежание ошибки процедуру взятия крови и определение RhD-принадлежности проводят дважды. Определение минорных антигенов системы Rh проводится детям при необходимости многократных трансфузий в тех случаях, когда в сыворотке реципиента обнаружены антитела к антигенам системы Rh, а также у беременных.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5. Пробы на индивидуальную совместимость крови донора и реципиента

Целью пробы на индивидуальную совместимость является предотвращение трансфузий несовместимых эритроцитов. Тестирование сыворотки реципиента с эритроцитами предполагаемого донора — наиболее надежный метод выявления антител, способных вызвать повреждение перелитых эритроцитов, посттрансфузионные реакции, в том числе и гемолитические. Проведение такой пробы позволяет:

- 1) подтвердить АВ0-совместимость донора и реципиента;
- 2) выявить все антитела в сыворотке реципиента, направленные против антигенов эритроцитов донора.

Для получения сыворотки у больного берут 4–5 мл крови в сухую пробирку, на которой надписывают фамилию и инициалы реципиента, группу его крови и дату. При этом врач должен лично убедиться в том, что надписи на пробирке сделаны правильно и относятся к тому больному, у которого взята эта кровь. Современный способ маркировки пробирок — автоматизированное штрихкодирование.

Через 1–2 мин пробирку с кровью сильно встряхивают для отделения сгустка от стенок пробирки или обводят его сухой стеклянной палочкой. После ретракции сгустка от него отделяется сыворотка, которая и служит для пробы на совместимость. Если необходимо ускорить отделение сыворотки, пробирку с кровью центрифугируют около 5 мин при 2000–3000 об./мин.

Могут возникнуть трудности в получении сыворотки у пациентов с пониженной свертываемостью крови или получающих гепарин. Свертывание образца может быть достигнуто путем добавления раствора тромбина (50 ед/мл): одну каплю на 1 мл образца крови. Можно использовать сухой тромбин — вносить на кончике предметной палочки. Для нейтрализации гепарина к 4 мл цельной крови добавляют одну (при необходимости — больше) каплю 1% раствора протамина сульфата.

Кровь донора получают из сегмента трубки контейнера, который подготовлен для переливания. Для этого кровь выпускают через иглу в небольшом количестве (5–10 капель) в пробирку или на пластинку, на которой будет производиться проба. На пробирке (пластинке) надписывают группу крови донора и номер контейнера. При этом врач должен лично убедиться в том, что на пробирке (пластинке) правильно написаны сведения о доноре, имеющиеся на контейнере, из которого получена эта кровь.

Лабораторных проб на совместимость две:

- 1) лечащий врач проводит пробу на плоскости, которая даст агглютинацию при несовместимости по АВ0; цель этой пробы — не перепутать ни пациента, ни гемоконтейнер;
- 2) лаборатория совмещает кровь в непрямом антиглобулиновом тесте; цель этой пробы — убедиться в отсутствии каких-либо антител в сыворотке реципиента к антигенам эритроцитов донора.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.1. Проба на совместимость крови по антигенам системы АВ0

Ход определения:

- на чистую сухую поверхность планшета или пластинки при комнатной температуре наносят и смешивают в соотношении 10:1 сыворотку реципиента и кровь донора;
- периодически покачивая планшет, наблюдают за ходом реакции;
- при отсутствии агглютинации в течение 5 мин кровь совместима.

Наличие агглютинации указывает на несовместимость крови реципиента и донора. Такую кровь переливать нельзя. В сомнительных случаях результат пробы контролируют под микроскопом: при наличии монетных столбиков, исчезающих после добавления теплого (+37 °C) 0,9% изотонического раствора натрия хлорида, кровь совместима; если в капле смеси видны агглютинаты, не расходящиеся при добавлении теплого 0,9% изотонического раствора натрия хлорида, кровь несовместима.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.2. Проба на совместимость крови с использованием антиглобулинового реагента

Нельзя проводить повторное замораживание-оттаивание антиглобулинового реагента (реагента Кумбса). Для контроля качества антиглобулинового реагента целесообразно (при каждом отрицательном результате) провести антиглобулиновый тест с RhD-положительными эритроцитами, сенсibilизированными IgG (неполными) анти-D-антителами.

Ход определения — в соответствии с инструкцией к диагностикуму.

Принцип антиглобулиновой пробы — в тесте используется реагент, приготовленный путем инъекции животным (например, кроликам) молекул человеческих антител (человеческий IgG) и белков комплемента. Животные введенные белки распознают как чужеродные антигены и вырабатывают поликлональные антитела к молекулам антител человека и белкам комплемента. Реагент, полиспецифический АЧГ, содержит антитела к молекулам IgG (анти-IgG) и белкам комплемента (анти-C3d, анти-C3b). Этот реагент АЧГ реагирует с человеческими антителами IgG и белками комплемента, связанными с поверхностью эритроцитов. Положительный результат — реакция агглютинации. Контроль активности антиглобулинового реагента (всегда положительная реакция) — со взвесью эритроцитов группы OD+, сенсibilизированных анти-RhD.

Контроль специфичности антиглобулинового реагента (всегда отрицательная реакция) — со взвесью эритроцитов группы ORhD-.

Антиглобулиновый реагент хранят замороженным при -20 °C (сухой реагент можно хранить при комнатной температуре).

Причины ложноположительных результатов:

- 1) присутствие аутоантител на поверхности тест-эритроцитов;
- 2) тест-эритроциты содержат микробные примеси;
- 3) нарушение режима центрифугирования (механическое повреждение мембраны эритроцитов при чрезмерной нагрузке).

Причины ложноотрицательных результатов:

- 1) тест-эритроциты плохо отмыты или остатки белков сыворотки присутствуют на стенках пробирки;
- 2) нарушение режима отмывания или инкубации;
- 3) потеря активности сыворотки или тест-эритроцитов в процессе хранения;
- 4) низкая активность антиглобулинового реагента;
- 5) недостаточное время инкубации.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.3. Исследование аллоантител к антигенам эритроцитов

Исследование аллоантиэритроцитарных антител проводят параллельно с подтверждением группы крови в лаборатории.

У беременных исследование сыворотки на содержание антител к антигенам эритроцитов проводят в первые 16–20 нед беременности, в случае отсутствия антител в сыворотке — повторно в 30–32 нед. При обнаружении антител или наличии в анамнезе гемотрансфузий, выкидышей, мертворождений либо ГБПН исследование антител проводят в динамике ежемесячно, а также после родов.

При несовпадении с группой крови мужа у женщины с группой крови 0, А или В исследуют в сыворотке крови содержание иммунных анти-А- и анти-В-антител.

В России обязательно использование коммерческой панели тест-эритроцитов из трех клеток. Для установления специфичности антител, выявленных при первичном скрининге, необходимо использовать идентификационную панель, как правило, из 11 клеток. Клиническое значение имеют только «тепловые» (вступающие в реакцию при температуре +37 °C) аллоантитела (табл. 11.8).

**Таблица 11.8.** Клиническая значимость аллоантител

Значимые	Необычные	Редкие
AB0	Bg (HLA)	Cartwright (Yt <sup>a</sup> )

Rh	Ch/Rg (complement C4)	Lutheran (Lu <sup>b</sup> )
Kell	Le <sup>b</sup>	Gerbich
Kidd	Kn/Mc/Yk	Lan
Duffy	JMH	Dombrock
S, s, U	Xg <sup>a</sup>	M, N
P	—	Le <sup>a</sup> , а также Vel, LW, Ii, H, At <sup>a</sup> , In <sup>b</sup> , Mi <sup>a</sup> , Cs <sup>a</sup>

Ввиду того, что аллоиммунные антитела могут быть как полной, так и неполной формы, их следует выявлять, используя разные методы при разных температурных режимах. Для выявления неполных антител необходимо проводить непрямую пробу Кумбса. Для выявления полных антител проводят реакцию солевой агглютинации при разных температурах: 37, 20, 4 °С. Заключение о наличии, а также о форме и специфичности антител делают по результатам реакции во всех методах.

Если положительная реакция выявлялась с разными образцами эритроцитов только при проведении непрямой пробы Кумбса, это значит, что в исследованной сыворотке содержатся только неполные антитела.

Если положительная реакция выявилась при непрямой пробе Кумбса и одновременно в реакции солевой агглютинации, это свидетельствует о содержании в сыворотке как неполных, так и полных антител. Полные антитела могут быть тепловыми, тогда положительный результат выявится при температуре 37 °С, или холодowymi, давшими положительный результат при 20 или 4 °С.

Если сыворотка дала положительный результат только в реакции солевой агглютинации в пробирках, это значит, что она содержит только полные антитела — тепловые или холодовые (в зависимости от того, при какой температуре выявилась агглютинация).

Если агглютинация эритроцитов не наблюдается ни в одной из этих проб, это говорит об отсутствии как полных, так и неполных аллоиммунных антител к антигенам, содержащимся в стандартных эритроцитах, которые были использованы при этом исследовании.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.4. Способы устранения реакций «антиген–антитело»

В специализированных лабораториях используются способы для устранения клинически незначимых реакций «антиген–антитело», в обобщенном виде они представлены в **табл. 11.9**. Следует иметь в виду, что при уменьшении реактивности «нежелательных» антител может также снижаться реактивность клинически значимых антител. Все серологические реакции важно выполнять с положительным и отрицательным контролем.

**Таблица 11.9.** Способы устранения клинически не значимых реакций «антиген–антитело»

Метод	Действие	Эффект
Предварительное подогревание в тесте с АЧГ	Избегание холодowych ауто- или аллоантител	Отмена действия антител
Анти-Ig АЧГ	Избегание активации комплемента	Отмена действия холодowych агглютининов на комплемент
Ферментный	Инактивация антигенов (Duffy, MNS и др.)	Создание антиген-негативных клеток
Дитиотреитол (ZZAP)	Разрушение антигенов Kell	Создание Kell-негативных клеток
Обработка сыворотки тиоловыми реагентами	Разрушение IgM	Отмена прямой агглютинации и активации комплемента IgM
Различные среды: раствор низкой ионной силы, изотонический раствор натрия хлорида, альбумин	Дополнительные растворы	Устранение «монетных столбиков», холодowych агглютининов, реагентов (каприлат, красители и др.)
Увеличение температуры	Ускорение ассоциации или замедление диссоциации	Отмена действия холодowych антител
Сокращение инкубации	Уменьшение сенсibilизации	Уменьшение реактивности холодowych агглютининов
Инкубация со специфическим антигеном	Нейтрализация антител	Отмена действия анти-A, B, Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup> , P <sub>1</sub> , Sd <sup>a</sup> , Ch <sup>a</sup> , Rg <sup>a</sup>
Изменение pH	Ускорение диссоциации или замедление ассоциации	Отмена действия анти-M
Добавление изотонического раствора натрия хлорида	Удаление аномальных белков	Устранение «монетных столбиков»
Отмывание тест-эритроцитов	Удаление дополнительных растворов	Устранение действия антител
Без отмывания эритроцитов	Нейтрализация антител	Ингибирование антител

Абсорбция	Удаление нежелательных антител	Устранение
Холодовая аутологичная	—	Холодовых агглютининов
Тепловая аутологичная	—	Тепловых аутоантител
Отдельными эритроцитами	—	Алло- или аутоантител
Аутологичная + C4	—	Анти-Ch <sup>a</sup> и анти-Rg <sup>a</sup>
Тромбоцитами	—	Анти-HLA
Мышиными эритроцитами	—	Анти-I, IH

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.5. Дополнительные исследования при донации эритроцитов

Большую роль при определении специфичности антител может сыграть определение антигенной структуры эритроцитов самого пациента. Если такое исследование было возможным, то это очень облегчит решение вопроса о специфичности антител, так как у пациента могут быть антитела только к тем антигенам, которые не содержатся в его собственной крови.

Если у пациента выявлены аллоиммунные антитела, то, зная их специфичность, можно обеспечить совместимость при переливании крови специальным выбором донора.

Если у пациента выявлены антитела, но определить их специфичность невозможно, например, из-за недостаточного набора стандартных эритроцитов, совместимость переливаемой крови можно обеспечить индивидуальным подбором донора.

При обнаружении антител к антигенам эритроцитов выписывают ответ, который переносится в донорский журнал или историю болезни. В ответе обязательно указывается, что в случае необходимости гемотрансфузионной терапии индивидуальный подбор крови осуществляют с применением антиглобулинового теста. Бланк ответа остается у донора или больного, хранится в течение всей жизни и предъявляется при госпитализации.

Методы скрининга нерегулярных антител должны обнаруживать клинически значимые антитела. Нужен непрямой антиглобулиновый тест после инкубации (37 °C) сыворотки или плазмы пациента с тест-эритроцитами. Существует несколько вариантов выбора методов определения антител у потенциальных реципиентов крови (**табл. 11.10**). Решения о выборе приемлемого варианта должны быть основаны на:

- причинах и частоте предшествующих серьезных трансфузионных реакций;
- доступности ресурсов;
- понимания, что ни один метод не будет обнаруживать все клинически значимые антитела.

**Таблица 11.10.** Методы определения антител перед переливанием крови

Метод	Сыворотка	Эритроциты	Инкубация	АЧГ
Изотонический раствор натрия хлорида	2–3 капли	1 капля, 3–5%	30–60 мин, 37 °C	IgG/ПС
Альбумин	2–3 капли	1 капля, 3–5%	15–30 мин, 37 °C	IgG/ПС
Раствор низкой ионной силы	2 капли <sup>1</sup>	2 капли, 2% <sup>1</sup>	10–15 мин, 37 °C	IgG/ПС
Гель	25 мкл	50 мкл, 0,8%	15 мин, 37 °C	IgG
Полиэтиленгликоль	2 капли <sup>2</sup>	1 капля	15–30 мин, 37 °C	IgG
Твердофазная адгезия	1 капля	Как определено инструкцией	10–15 мин, 37 °C	IgG

Примечание. <sup>1</sup> — объемы капель должны быть равны; <sup>2</sup> — плюс 4 объема 20% полиэтиленгликоля; ПС — полиспецифичный иммуноглобулин.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.6. Гемолитические реакции у реципиента

**Острая гемолитическая реакция.** Острая гемолитическая реакция проявляется с частотой 1:12 000–1:100 000.

Начинается в течение 24 ч после переливания, обычно немедленно.

**Клинические признаки острой гемолитической реакции:** лихорадка, озноб, дрожь, жар лица, боль в груди, животе, спине, в боку, тошнота, рвота, диарея, гипотензия, бледность, желтуха, олиго-/анурия, диффузные кровотечения, темная моча.

**Лабораторные признаки острой гемолитической реакции:** гемоглобинемия, гипербилирубинемия за счет непрямого билирубина, снижение уровня Hb, гемоглобинурия, ретикулоцитоз, снижение сывороточного гаптоглобина, повышение в сыворотке активности ферментов ЛДГ и АСТ.

Не все клинические и лабораторные признаки реакции могут присутствовать у пациента, однако их отсутствие не исключает диагноз. Причиной гемолиза также могут быть аутологичные антиэритроцитарные антитела у реципиента или влияние неиммунных факторов (неисправность нагнетающего устройства, подогревателя крови, использование гипотонических растворов и т.д.).

С целью профилактики тщательно следует сверить идентификатор реципиента с маркировкой образца для проб на совместимость и маркировкой компонента. Лучше, если это параллельно будут делать два сотрудника. Наблюдайте за реципиентом в первые 15 мин переливания каждого контейнера. В экстремальной ситуации переливайте эритроциты группы 0.

Храните и применяйте компоненты крови по инструкции.

*Действия при возникновении острой гемолитической реакции.* Прекратите переливание. Замените внутривенную систему и вводите изотонический раствор натрия хлорида. Проведите терапию шока и внутривенную инфузию солевого раствора для поддержания артериального давления. Диагностируйте возможность ДВС. При клинически значимом кровотечении назначьте терапию. Диуретики фуросемид в дозе 1–2 мг/кг внутривенно или маннитол поддерживают диурез. Рассмотрите применение гидрокортизона. Оцените функции почек и печени, вероятность ДВС и гемолиза: ОАК, непрямой билирубин, АЧТВ, ЛДГ, мочевины, креатинина, гаптоглобина.

Отправьте уведомление о реакции на станцию переливания крови.

**Отсроченная гемолитическая реакция.** Отсроченная гемолитическая реакция развивается ориентировочно с частотой 1:5000 трансфузий, по официальной статистике — 1:35 000. Причины реакции связаны с предшествующей иммунизацией реципиента антигеном эритроцита при трансфузии или беременности или переливанием эритроцитов, которые имели соответствующий антиген, что вызвало вторичный иммунный ответ и привело к гемолизу перелитых антигенположительных эритроцитов. Начинается реакция обычно через 1–7 дней, реже — до 28 дней после переливания. Об отсроченной гемолитической реакции свидетельствует как минимум один из трех критериев:

- 1) положительный прямой антиглобулиновый тест в отношении антител, появившихся от 24 ч до 28 дней после окончания трансфузии;
- 2) положительный тест элюции с аллоантителами на перелитых эритроцитах или выявление новых аллоантител в сыворотке реципиента;
- 3) неадекватный подъем уровня Hb после трансфузии, быстрое падение Hb до претрансфузионного уровня или необъяснимое появление в мазке крови сфероцитов.

*Клинические признаки* — увеличилась тяжесть анемии и желтухи из-за разрушения эритроцитов, возможны спленомегалия, гемоглобинемия и гемоглобинурия. В тяжелых случаях — почечная недостаточность. В анализе крови могут выявиться анемия и RET.

*Профилактика гемолитической реакции.* Проведите скрининг антиэритроцитарных антител у всех потенциальных реципиентов крови. Выявленные нерегулярные антитела зарегистрируйте в информационной базе донорства, чтобы подобрать совместимые эритроциты на случай, если понадобится переливание. На подбор совместимых эритроцитов может уйти время, поэтому заранее подберите несколько совместимых доз.

*Действия при возникновении отсроченной гемолитической реакции.* Для определения причины гемолиза нужно выполнить развернутый анализ крови с просмотром мазка, прямой антиглобулиновый тест. Он может быть отрицательным при разрушении большинства эритроцитов. Также понадобится скрининг антиэритроцитарных антител, который может быть отрицательным из-за связи антител с эритроцитами. Рекомендуется исследование функции печени с определением печеночных ферментов ЛДГ, АЛТ и АСТ. Обратите внимание: концентрация гаптоглобина падает при гемолизе.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.5.7. Клинически значимые рекомендации

В клинической работе надо учитывать следующее.

Антитела классов IgM и IgG могут разрушать эритроциты посредством множества механизмов, основанных главным образом на распознавании антигена и структуре антител.

IgG-антитела разрушают эритроциты, индуцируя внесосудистый гемолиз (в селезенке или печени), обеспечивая захват эритроцитов фагоцитами посредством Fc-рецепторов и/или опсонизации, основанной на комплементе. Такое разрушение обычно проявляется отсроченной гемолитической реакцией.

IgM-антитела (в редких случаях — IgG) способны индуцировать внутрисосудистый гемолиз посредством активации комплемента, приводящей к включению мембраноатакующего комплекса. Такое разрушение обычно проявляется острой гемолитической реакцией.

Термин «посттрансфузионные реакции и осложнения» смысла не имеет, ибо никто реакции и осложнения не дифференцирует.

Не все антитела к антигенам эритроцитов в итоге разрушают эритроциты. Конечно, несовместимости нужно избегать во всех возможных случаях. Но если совместимая кровь недоступна, можно использовать несовместимые дозы эритроцитов, если известно, что антитела клинически не значимы.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6. Иммунологический конфликт матери и плода по антигенам клеток крови

ГБПН, фетальная/неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (НАИТ) и ИТП поражают беременных, их плоды и новорожденных. Служба крови играет решающую роль в диагностике и лечении этих состояний, включая соответствующее обеспечение резус-иммуноглобулином (RhIg).

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование



### 11.6.1. Гемолитическая болезнь новорожденного

ГБПН обусловлена разрушением эритроцитов плода/новорожденного в результате проникновения через плаценту материнских аллоантител. ГБПН может варьировать от изолированного серологического проявления у клинически здорового новорожденного с положительным результатом прямого антиглобулинового теста до тяжелой анемии и иногда гибели плода.

При попадании в кровь матери эритроцитов плода, несущих унаследованные от отца «чужеродные» антигены, против последних продуцируются аллоантитела. Антитела класса IgG проникают в обратном направлении сквозь плаценту, вызывая разрушение эритроцитов плода и анемию различной тяжести. При тяжелом поражении могут развиваться повреждение сердца, отек и гибель плода. Термин «гемолитическая болезнь новорожденного» образовался по причине того, что начало лечения было лимитировано преждевременным родоразрешением и лечением новорожденного; отсутствовали технологии доступа к плоду и дородовому лечению. Возникающее в результате усиление кроветворения вызывает состояние, называемое эритробластозом плода, с увеличением печени и селезенки, вторичными по отношению к экстрамедуллярному кроветворению, и портальной гипертензией.

Заболевание печени может привести к снижению выработки альбумина и связанному с этим снижению онкотического давления плазмы с генерализованными отеками, асцитом и выпотами, известными как водянка плода. Тяжелая форма ГБПН может возникнуть уже на сроке 18–20 нед беременности или раньше при наличии антител к KEL1, при этом ее трудно обнаружить; тяжесть обычно увеличивается при последующих беременностях. Без лечения водянка плода и связанная с ней сердечно-сосудистая недостаточность, вторичная по отношению к анемии, могут привести к гибели плода. Разрушение эритроцитов приводит к повышению уровня билирубина. Материнская печень удаляет билирубин из крови, предотвращая накопление билирубина у плода. После рождения незрелые ферментативные пути печени ребенка не могут метаболизировать неконъюгированный билирубин, который жирорастворим и может накапливаться в липидах мозга до опасного уровня, вызывая необратимое повреждение головного мозга, известное как ядерная желтуха. Количество материнских антител обычно снижается у новорожденного в течение 12 нед, а период полувыведения составляет около 25 дней.

Существуют три предпосылки ГБПН, диктующие необходимость определенных диагностических исследований и лечебных мероприятий.

1. У матери отсутствует антиген, воздействию которого она была подвергнута во время беременности или гемотрансфузий.

2. Плод обладает данным антигеном, унаследованным от отца. Этот антиген эффективно вырабатывается внутриутробно.

3. Организм матери вырабатывает IgG-антитела.

*Патофизиологические механизмы ГБПН.* Пуповину формируют кровеносные сосуды плода. В плаценте кровь плода проходит через множество ворсин в кровь матери. В ворсинах сформирована тонкая мембрана из фенестрированного эндотелия, через который свободно проходят кислород, питательные вещества, молекулы продуктов выделения.

Молекулы большого размера и целые клетки не проникают через неповрежденный эндотелий и сформированную мембрану. Эта мембрана относительно легко повреждается при незавершенной имплантации, аномалиях плаценты, травме живота, которые вызывают разрывы ворсин и пространства между ними. Это приводит во время беременности к проникновению клеток плода в систему циркуляции крови матери (фетоматеринское кровотечение), что подвергает мать воздействию «чужеродных» антигенов плода. Возможность кровотечения в обратном направлении, от матери к плоду, существует, но вероятность его мала из-за относительно более высокого давления на мембрану со стороны плода. Часто встречающаяся ситуация, когда мать подвергается воздействию «чужеродных» антигенов плода, — отсечение плаценты от стенки матки или отслойка плаценты во время родов. При этом нарушается гемоциркуляция плода в ворсинах, что позволяет относительно большому количеству клеток плода попасть в систему циркуляции крови матери.

У плода образование эритроцитов происходит к 2–3-й неделе гестационного возраста, к 9-й неделе оно уже сформировано в печени и начинает функционировать в костном мозге. Большинство групповых антигенов сформированы и полностью экспрессируются к 10–12-й неделе, исключение составляют антигены AB0, I, P<sub>1</sub>, Lewis, Cartwright. Если плод наследует отцовские антигены, которые отсутствуют у матери, то существует потенциальный риск развития ГБПН.

Фактор времени при первичной сенсибилизации и тот факт, что только IgG-антитела могут проходить через плаценту, являются основными причинами редкой встречаемости тяжелых ГБПН при первой беременности. Последующие беременности антигенположительным плодом несут значительно больший риск. Поскольку наиболее значимы фетоматеринские кровотечения в период родов, то первичный ответ чаще возникает после первых родов антигенположительным плодом. Во время второй или последующих антигенположительных беременностей даже очень маленькое (единичные клетки) проникновение эритроцитов плода может вызвать вторичную (анамнестическую) выработку антител.

Материнские IgG-антитела проходят сквозь плацентарный барьер, поступают в циркуляцию плода и прикрепляются к специфичным антигенам на эритроцитах плода. Эритроциты затем удаляются Fc-рецепторами макрофагов в селезенке и печени плода. Билирубин (непрямая фракция) экскретируется через плаценту в материнскую систему циркуляции крови, где конъюгируется в печени и экскретируется материнским организмом.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

Прогрессирующая анемия вызывает тканевую гипоксию. Это, в свою очередь, запускает механизмы увеличения сердечного выброса и задержки жидкости и соли почками. Вовлечение в процесс печени ведет к портальной

гипертензии с развитием асцита, повреждению гепатоцеллюлярного барьера, развитию гипоальбуминемии и генерализованному отеку тканей (водянка плода).

При рождении младенец анемичный, но не желтушный, так как билирубин экскретируется в желчь в печени матери. После рождения новорожденный вынужден сам перерабатывать билирубин. Обычно печень новорожденного не может адекватно переработать билирубин из-за недостатка глюкуронилтрансферазы, поэтому у новорожденного развивается желтуха (большая желтуха новорожденного). В норме непрямой билирубин связывается с альбумином в кровеносном русле. Когда уровень билирубина превосходит связывающую способность альбумина, его содержание нарастает в тканях, и он может проходить через ГЭБ, оседая в базальных ганглиях и вызывая непоправимое поражение головного мозга (керниктерус).

Лечение может быть начато либо в антенатальный, либо в постнатальный период. В антенатальный период лечение сфокусировано на анемии и влечет за собой раннее родоразрешение при условии соответствующего гестационного возраста и достаточности развития легких, или выполняют внутриматочные трансфузии (ВМТ) интраперитонеально либо внутрисосудисто. После родов лечение сфокусировано в первую очередь на уровне билирубина, а во вторую — на анемии и предполагает заменные переливания. Решение о типе медицинского вмешательства и времени его проведения основывается на данных лабораторного обследования и клинической картине.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6.2. Дородовое обследование матери

Первичное обследование женщины обычно проводится во время первого дородового визита и включает определение группы крови системы АВ0, определение RhD-принадлежности, включая определение слабого антигена D ( $D^u$ ), скрининг нерегулярных антител.

Отсутствие у матери D или наличие слабого D ( $D^u$ ) определяет необходимость в применении RhIg антенатально. Скрининг антител позволяет обнаружить большинство эритроцитарных аллоантител классов IgG и IgM, которые могут циркулировать в сыворотке матери. Наличие IgG-антител свидетельствует о возможности развития ГБПН. Скрининг антител повторяют в 28 нед гестации, он проводится до назначения RhIg или сопутствует ему.

Обнаруженные в пренатальный период антитела должны быть идентифицированы. Специфичность антитела определяет его клиническое значение и для плода, и для матери. Такие антитела, как I, P1,  $Sd^a$ , Lewis, Chido, Rodgers, Lutheran и Cartwright, редко вызывают ГБПН.

Антитела могут относиться к классу IgM либо IgG. Определенные антитела, такие как анти-M, -E и -S, образующиеся и без стимуляции эритроцитами, должны быть исследованы с помощью дитиотреитола или 2-меркаптоэтанола — реагентов, разрушающих дисульфидные внутримолекулярные связи молекулы IgM. Поскольку при этом IgG-антитела сохраняются, то можно определить их титр. Для полной уверенности в том, что выявляемые антитела продолжают принадлежать только к классу IgM, рекомендуется проводить повторные тесты каждые 6 нед.

Принадлежность к субклассу IgG-IgG1, 2, 3, или 4 определяет клиническое значение антитела. Все IgG-антитела проходят через плаценту. IgG1 и IgG3 имеют наибольшее клиническое значение. IgG1-антитела проходят через плаценту намного раньше, что потенциально грозит более массивной внутриматочной деструкцией и более низким уровнем Hb при рождении.

Тщательный сбор анамнеза позволяет прогнозировать исход и определить время вмешательства. У женщин, предыдущие дети которых рождались с гемолитической болезнью, ребенок от выношенной антигенположительной беременности обычно поражен в той же или большей степени, поэтому вмешательство может потребоваться на более ранних сроках гестации.

Важно обследовать отца ребенка. В большинстве случаев, кроме наличия D, возможно определение зиготности отца и, соответственно, вероятности наличия антигена у плода. Если у отца полностью отсутствует антиген, а наличие аллоантител является следствием предыдущих беременностей от другого лица и/или трансфузий, женщина может быть переведена под обычный контроль за беременными. Разумеется, наличие аллоантител следует учесть при необходимости гемотрансфузий.

В 1997 г. Lo Y.M.D. и соавт. установили, что ДНК плода присутствует в плазме матери, составляя 3% плазменной ДНК в II триместре беременности. Этот факт стал основой для возможного неинвазивного RhD-генотипирования плода.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6.3. Внутриматочные трансфузии

При значительной анемии проводят ВМТ (внутриутробные трансфузии). Перелитые внутриматочным антиген-негативные донорские эритроциты нормально приживаются, обеспечивая хорошую оксигенацию тканей плода. Тканевая гипоксия уменьшается, излишки накопленной жидкости сокращаются, что снижает возможность нарушения сердечной деятельности. Собственная продукция эритроцитов плода подавляется, что ведет к меньшей их деструкции. Благодаря уменьшению продукции и деструкции эритроцитов печень и селезенка постепенно приобретают нормальные размеры.

Для лечения анемии ВМТ используются до срока 32 нед и/или до готовности (созревания) легких плода справиться с транспортом кислорода. Абсорбция плодом эритроцитов происходит через лимфатический проток. Абсорбция составляет примерно 10–12% в день, но она варьирует при наличии у плода асцита. ВМТ повторяют с интервалом 2–3 нед, чтобы компенсировать рост плода, сопутствующее повышение объема крови и потребности в транспорте кислорода. Ранние ВМТ могут выполняться с меньшим интервалом, так как вначале имеет место продолжающаяся

деструкция эритроцитов плода, которая уменьшается по мере увеличения количества перелитых донорских эритроцитов, резистентных к деструкции.

При возможности доступа к пупочной вене предпочтительнее выполнять внутрисосудистые трансфузии. В этом случае необходимый объем для переливания может быть определен исходя из величины Hb до трансфузии, Hb донорской крови, уровня желаемого Hb после трансфузии и вычисленного фетоплацентарного объема крови. Объем переливаемых эритроцитов, рассчитанный с учетом данных параметров, может варьировать в пределах 20–175 мл. Деструкция эритроцитов плода оценивается как 3 г/л в день, поэтому трансфузии могут быть спланированы так, чтобы поддержать Hb на уровне 100 г/л.

Вне зависимости от вида запланированной процедуры возможно получить образец крови плода, что позволяет определить его группу крови АВ0 и фенотип RhD, использовать для переливания не только ORhD-отрицательную кровь. Независимо от источника крови при переливании необходимо соблюдать следующие требования.

1. Эритроциты не должны иметь антигенов (включая А и В), антитела к которым найдены у матери. Эритроциты должны быть совместимы с материнской сывороткой.
2. Доноры должны быть группы 0 или иметь группу крови, одинаковую с матерью и плодом (например, в случае, когда мать и плод группы А). Донорская кровь должна быть RhD-отрицательная в случаях, когда ребенок RhD-отрицательный или имеются анти-D. RhD-положительная кровь может быть использована в тех случаях, когда она совместима с материнскими антителами.
3. Иногда неонатологи требуют использовать ЦМВ-негативную кровь для предотвращения инфицирования/реинфицирования новорожденного. Однако современные лейкоцитарные фильтры удаляют лейкоциты в степени, достаточной для профилактики трансфузионной передачи ЦМВ.
4. Кровь должна быть облучена для предотвращения болезни «трансплантат против хозяина».
5. Используются свежие (до 5 дней хранения) лейкодеплецированные эритроциты с НСТ 80–90%. Для этого перед переливанием из взвеси удаляют часть надосадочной жидкости. Свежие эритроциты имеют меньший уровень внеклеточного  $K^+$ . Высокий НСТ уменьшает возможность перегрузки объемом.

6. Если используются материнские эритроциты, то они должны быть облучены, отмыты или заморожены и дегицеринизированы для удаления плазмы, содержащей антитела.

7. Кровь отца и его прямых родственников не должна использоваться в качестве донорской для ВМТ, заменного переливания крови (ЗПК) или простых трансфузий вследствие наличия антигена D и возможного присутствия других невыявленных антигенов, к которым у матери могли выработаться антитела (в особенности HLA-антитела, не определяющиеся при рутинном фенотипировании эритроцитов и в пробах на совместимость).

Если плод пострадал вследствие гемолитической болезни, роды осуществляют при сроке 34 нед и более.

В необходимых случаях проводят ЗПК.

При уровне Hb пуповинной крови от 110–140 г/л констатируют ГБПН легкой или средней степени тяжести, возможно, требующей вмешательства при условии резкого повышения билирубина и возможности возникновения ядерной желтухи. При уровне Hb пуповинной крови менее 110 г/л обычно требуется немедленное ЗПК.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6.4. Заменные и простые трансфузии

До ЗПК должны быть определены фенотипы АВ0 и RhD эритроцитов новорожденного. Необходимо помнить, что эритроциты плотно покрыты материнскими антителами, поэтому возможны ложноотрицательные реакции, особенно при Rh-типировании. Обратное определение (по сыворотке) группы крови не требуется, так как источником происхождения любых антител новорожденного является мать. Прямой антиглобулиновый тест проводить необязательно.

Возможны ложные результаты при типировании в результате следующих потенциальных проблем.

1. Пуповинная кровь может быть загрязнена желатинозной субстанцией пуповины, которая богата гиалуроновой кислотой. Эта субстанция может вызвать агглютинацию в виде монетных столбиков, в результате типирование клеток даст ложноположительный результат. Этого можно избежать путем тщательного отмывания перед тестированием клеток, полученных из пуповины.

2. Если плоду проводилась одна или более ВМТ, трудно или практически невозможно определить истинную группу АВ0 и RhD из-за большого количества перелитых эритроцитов. Цель проведения ВМТ — блокирование эритропоэза плода для сокращения процесса разрушения. Если это выполнено правильно, то большинство циркулирующих клеток должно быть представлено донорскими эритроцитами. В таких случаях учитывают первичное определение группы крови из образца, полученного до первой ВМТ. Для ЗПК используется кровь той же группы, что и для ВМТ.

**Показания к ЗПК при гемолитической болезни новорожденных.**

Абсолютные показания в первые часы жизни ребенка:

- наличие выраженных клинических признаков: тяжелая желтушная и предотечная формы заболевания, ранняя желтуха или бледность кожных покровов, петехиальные кровоизлияния, увеличение печени и селезенки;
- выраженная анемия с нормобластозом, гипербилирубинемия выше 342 мкмоль/л, темп нарастания билирубина выше 6,0 мкмоль/ч и уровень его в пуповинной крови выше 60 мкмоль/л;
- появление желтухи или выраженной бледности кожных покровов в первые часы жизни у ребенка с увеличением размеров печени или селезенки; в анализах крови — тяжелая анемия (Hb менее 100 г/л), нормобластоз с доказанной несовместимостью крови матери и ребенка по группе крови АВ0 или RhD, особенно при неблагоприятном по ГБПН анамнезе.

Абсолютные показания в любой день жизни:

- появление первых симптомов билирубиновой энцефалопатии;
- снижение активности сосания, появление временами ригидности затылочных мышц.

При появлении желтухи в первые сутки жизни (тем более в первые часы) и интенсивном нарастании уровня билирубина в крови ЗПК следует проводить даже при отсутствии увеличения печени и селезенки и наличия анемии. ЗПК следует применять и при более позднем появлении желтухи, медленном, но неуклонном повышении концентрации билирубина в крови, если к 2–3-м суткам жизни ребенка уровень билирубина достигает критических цифр (табл. 11.11). При этом большую активность необходимо проявлять при лечении недоношенных детей (гестационный возраст — 37 нед и менее), так как известно, что у них симптомы билирубиновой энцефалопатии могут развиваться при концентрации билирубина значительно ниже принятого критического уровня (170–240 мкмоль/л), особенно если высокий билирубин держится длительно. Период нарастания уровня билирубина у незрелых детей длится дольше, чем у детей, рожденных в срок, иногда до 5–7-го дня жизни.

**Таблица 11.11.** Критические уровни билирубина у новорожденных

Пуповинная кровь	60 мкмоль/л и более
24 ч жизни	150 мкмоль/л
48 ч жизни	240 мкмоль/л при RhD-конфликте; 270 мкмоль/л при АВ0-конфликте
4-й день жизни и далее	300 мкмоль/л при АВ0-конфликте; 265 мкмоль/л при RhD-конфликте

Показание к повторному ЗПК — наличие не менее двух нижеперечисленных признаков:

- нарастание клинических признаков гемолитической болезни;
- почасовой прирост билирубина — более 5 мкмоль/л;
- нарастание анемии (сохраняющийся гемолиз).

**Выбор крови для переливания.** Для новорожденных с группой крови 0 обычно цельная кровь. Для новорожденных с группами крови А, В или АВ — эритроциты 0 и одногруппная плазма или плазма группы АВ.

При RhD-конфликте для ЗПК используют кровь той же группы, что и у ребенка, RhD-отрицательную не более 5 дней хранения в количестве 170–180 мл/кг (при неконъюгированном билирубине сыворотки крови более 400 мкмоль/л — в объеме 250–300 мл/кг).

При АВ0-конфликте переливают кровь группы 0 с низким титром анти-А- и анти-В-антител, но в количестве 250–400 мл, помня, что, как правило, на следующий день надо сделать повторное ЗПК в полном объеме.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

Если у ребенка имеется одновременно несовместимость по RhD- и АВ0-антигенам, то обычно ГБПН возникает по групповым антигенам, значит, переливать надо ребенку кровь группы 0.

При ГБПН с конфликтом по редким антигенам для ЗПК используют донорскую кровь, не имеющую «конфликтного» антигена.

Объем крови для ЗПК равен двум объемам циркулирующей крови (у новорожденных со средним объемом циркулирующей крови — 85 мл на 1 кг массы тела), что обеспечивает замену 85% циркулирующей у ребенка крови. Эффективно для ЗПК использовать криоконсервированные (замороженные для этой цели) эритроциты в сочетании со свежезамороженной плазмой — комбинация эритроцитов группы 0 и плазмы группы АВ.

Донорские эритроциты должны быть группоспецифичны или совместимы с антителами новорожденного и совместимы с материнскими АВ0-антителами. Необходимо тестирование на анти-А и/или анти-В при помощи антиглобулинового теста с сывороткой новорожденного, если переливаются эритроциты с фенотипом А, В или АВ. Это можно не проводить при использовании для совмещения материнской сыворотки, поскольку именно она является источником всех циркулирующих антител.

При проведении последующих трансфузий эритроцитов с фенотипом А, В или АВ проводят антиглобулиновый тест с сывороткой/плазмой новорожденного.

Трансфузии плазмы выполняются или совместимой по фенотипу, или группы АВ из расчета 10 мл/кг. В некоторых случаях часть объема плазмы замещается альбумином для помощи в связывании билирубина и удалении его во время ЗПК. Введение альбумина может выполняться до проведения замены, так как в результате ЗПК временно снижаются уровни содержания свертывающих факторов крови. Не рекомендуется заменять альбумином солевые растворы для ресуспендирования эритроцитов (обычно используют НСТ не менее 0,50). Трансфузии тромбоцитов обычно не требуются.

При повторной госпитализации ребенка все исследования нужно повторить с использованием нового образца крови новорожденного. При отсутствии антител и использовании группы крови 0 дальнейших исследований не требуется. RhD-отрицательная кровь переливается RhD-отрицательным новорожденным, и/или, если предполагается наличие анти-D, RhD-положительным новорожденным могут переливаться RhD-положительные эритроциты без антигенов, к которым у матери выработались клинически значимые антитела.

Облучение донорской крови нужно проводить при любом ЗПК.

Используют эритроциты не более 5 сут хранения. Для профилактики ЦМВ-инфекции рекомендуется использование крови ЦМВ-негативных доноров или лейкодеплецированные клеточные компоненты крови.

Обычно замена проводится двойным объемом, при этом удаляется 80–90% эритроцитов и 25–35% билирубина. Из-за сохраняющейся низкой продукции новорожденным эритроцитов мониторинг нужно продолжать в течение нескольких недель.

ЗПК или простые трансфузии могут потребоваться не только из-за аллоиммунизации или аутоиммунизации матери против эритроцитарных антигенов ее ребенка, но и по другим причинам:

- 1) трансплацентарное (фетоматеринское) кровотечение в любой период во время беременности с иммунизацией матери или без нее;
- 2) обмен кровью между близнецами (кровотечение от близнеца к близнецу);
- 3) акушерские проблемы;
- 4) врожденная гемоглобинопатия;
- 5) нарушение эритропоэза.

Простые трансфузии небольших аликвот эритроцитов применяются для коррекции анемии, вызванной ГБПН, лабораторными процедурами (ятрогенная причина потери крови) или другими причинами. Требования к выбору крови аналогичны таковым при ЗПК.

**RhIg (Ig anti-RhD).** RhIg представляет собой препарат концентрированного очищенного  $\gamma$ -глобулина анти-D, полученного от гипериммунизированных доноров. Препарат вводят внутримышечно. У несенсибилизированных Rh-негативных реципиентов, подвергшихся воздействию эритроцитов, имеющих D-антиген, препарат действует как иммуносупрессор. Точный механизм действия по предотвращению иммунизации неизвестен, но постулируется, что есть механизм блокирования участков рецепторов Fc. Так как мать не сенсибилизирована, то последующая Rh-положительная беременность не находится под угрозой. Было показано, что 300 мкг RhIg предотвращают сенсибилизацию 15 мл Rh-положительных эритроцитов или 30 мл цельной крови. Для предотвращения сенсибилизации необходимо около 20 мкг на 1 мл эритроцитов.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6.5. Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения

НАИТ, подобно ГБПН, вызывается антителами, специфичными для тромбоцитарных антигенов, унаследованных от отца, но отсутствующих у матери. Наиболее распространенным тромбоцитарным антигеном, обнаруживаемым у пациентов с НАИТ, является HPA-1a, который вызывает развитие отклонений примерно в 80% случаев. В редких случаях отклонения вызывают другие тромбоцитарные антигены. Около 10% случаев являются следствием воздействия антител к антигену HPA-5b, 4% — к HPA-1b, 2% — к антигену HPA-3a, и 6% случаев являются следствием воздействия других антител. Частота возникновения этого заболевания во время беременности примерно 1 случай на 1500–2000 родов.

В то время как НАИТ имеет сходства с ГБПН, есть несколько существенных различий. Примерно в 25% случаях возникновения НАИТ антитела к тромбоцитам могут начать вырабатываться достаточно рано во время первой беременности, что может оказать влияние на плод. Материнские антитела обнаруживаются уже на 17-й неделе беременности параллельно с образованием антигенов тромбоцитов у плода. Во время такой беременности у плода может развиться тромбоцитопения уже на 20-й неделе беременности. Во время первой беременности заболевание часто не выявляется до рождения ребенка, когда у новорожденного появляются петехии, экхимозы или внутричерепное кровотечение.

Риск возникновения кровотечений обратно пропорционален концентрации тромбоцитов, при этом наибольший риск возникает в случае, когда концентрация тромбоцитов составляет менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ . В ходе последующих беременностей плод также подвержен риску развития заболевания в аналогичной или более тяжелой форме, если тромбоциты содержат целевой антиген. Реакция кроветворной системы плода на НАИТ бывает разной и может включать компенсаторный экстрамедуллярный гемопоэз. В редких случаях развивается водянка плода. Также может появиться анемия плода без несовместимости эритроцитов.

Во время первой беременности заболевание часто не диагностируется до рождения ребенка, когда наблюдаются экхимозы, петехии и, реже, внутричерепные кровотечения. Концентрация тромбоцитов у младенца будет низкой и может еще больше уменьшиться в течение нескольких первых часов и дней после рождения. Концентрация тромбоцитов у матери остается в пределах нормы. Через 2–3 нед после того как антитела выводятся из организма концентрация тромбоцитов возвращается к нормальным значениям. Наличие или отсутствие тяжелой формы тромбоцитопении и внутричерепного кровотечения у первого ребенка оказывает влияние и на результат последующих беременностей.

В случае отклонений во время первой беременности и планирования последующей беременности у супругов надлежит определить фенотип тромбоцитов, а мать должна пройти обследование на наличие аллоантител. Анализ ДНК отца также может быть полезен для определения зиготности имеющегося антигена, что позволяет определить риск возникновения отклонений во время будущих беременностей. Во время последующей беременности генотип плода можно также определить с использованием околоплодной жидкости или крови матери уже на 18-й неделе беременности. Это позволяет четко определить риск возникновения НАИТ и необходимость тщательного наблюдения за состоянием матери и ребенка. В случае необходимости обследования состояния плода следует проводить на 20-й неделе беременности или ранее, так как к этому времени могут появиться тяжелая форма тромбоцитопении и кровотечения. Для определения концентрации тромбоцитов можно использовать кордоцентез. Так как переливание крови может осуществляться во время кордоцентеза, то до начала проведения процедуры следует иметь в наличии донорские патоген-инактивированные тромбоциты и без соответствующих антигенов.

Концентрацию тромбоцитов для внутриутробного переливания увеличивают центрифугированием не менее чем до  $20 \times 10^{11}/л$ . Переливание тромбоцитов с целью профилактики тромбоцитопении и кровотечений следует проводить раз в неделю, так как срок жизни тромбоцитов составляет 8–10 дней. Региональная станция переливания крови должна иметь в своей базе доноров без наличия антигена HPA-1a и, соответственно, возможность приготовить концентрат тромбоцитов для внутриутробного переливания. Альтернативным донором является мать, у которой отсутствует иммунизирующий аллоантиген тромбоцитов. Однако ее состояние здоровья должно позволять брать у нее кровь, ее тромбоциты надлежит отмывать с целью удаления опасных аллоантител. В случае необходимости экстренного переливания тромбоцитов могут использоваться несовместимые тромбоциты, полученные из цельной крови. При обнаружении вышеуказанных отклонений в развитии плода матери вводится внутривенный Ig. Доза обычно составляет 1 г/кг раз в неделю. Даже в случае применения внутривенного Ig может возникнуть необходимость в наблюдении за концентрацией тромбоцитов у плода с помощью кордоцентеза, так как в процессе лечения могут возникнуть ошибки и необходимость в переливании тромбоцитов. Целью как переливания крови, так и использования внутривенного Ig является предотвращение кровотечений. Существуют противоречивые данные об эффективности кордоцентеза. Риск возникновения внутричерепных кровотечений (10–30% у детей матерей с внутричерепным кровотечением у предыдущих детей) следует соотнести с риском собственно кордоцентеза (смертность — 1–2%).

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

До родов следует определить концентрацию тромбоцитов у плода. Концентрация тромбоцитов должна составлять  $>50 \times 10^9/л$  для проведения влагиалищного родоразрешения и более  $20 \times 10^9/л$  после рождения.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.6. Иммунная тромбоцитопения

Младенцы, матери которых страдают тромбоцитопенией вследствие ИТП, СКВ или других аутоиммунных заболеваний, могут иметь тромбоцитопению из-за плацентарного переноса материнских аутоантител. В целом тромбоцитопения и ее последствия у новорожденных, рожденных от матерей с этими заболеваниями, менее тяжелые, чем при НАИТ. Хотя клинически значимые эпизоды кровотечений редки, за новорожденными следует внимательно наблюдать, поскольку количество тромбоцитов может снизиться после рождения.

ИТП встречается у 1 из 1000–10 000 беременных. К счастью, симптомы кровотечения во время беременности или во время родов встречаются редко. Ведение беременных с ИТП аналогично таковому у небеременных. Нет доказательств в поддержку регулярного измерения количества тромбоцитов у плода. В первые два триместра лечение следует начинать, когда у пациента появляются симптомы, так, чтобы количество тромбоцитов было больше  $20–30 \times 10^9/л$ . У женщин, которым требуется лечение, хороший эффект дают как внутривенные Ig, так и пероральные глюкокортикоиды.

Хотя количество тромбоцитов у матери не предсказывает неонатальную тромбоцитопению, матери, у которых в анамнезе были роды с тромбоцитопенией, подвергаются большему риску рождения еще одного ребенка с тромбоцитопенией. Способ родоразрешения должен основываться на предпочтениях акушера и пациента, аналогично ведению НАИТ.

У всех детей, рожденных от матерей с ИТП в анамнезе, следует провести ранний постнатальный подсчет тромбоцитов. Избегайте внутримышечных инъекций до тех пор, пока не убедитесь в нормальной концентрации тромбоцитов. Для исключения внутримозгового кровотечения при тромбоцитопении  $<50 \times 10^9/л$  необходимо провести УЗИ головы. Большинство геморрагических явлений у новорожденных происходит через 24–48 ч после родов. Подсчет тромбоцитов следует повторять ежедневно, поскольку минимальная концентрация часто наблюдается через 2–5 дней после рождения. У пациентов с клиническим кровотечением или количеством тромбоцитов  $<30 \times 10^9/л$  следует рассмотреть возможность применения внутривенных Ig и/или переливания тромбоцитов. Неонатальные показатели следует контролировать до тех пор, пока они не нормализуются, поскольку тромбоцитопения может персистировать и представлять собой наследственную форму тромбоцитопении.

Материнская тромбоцитопения, вторичная по отношению к СКВ, обычно менее тяжелая, чем тромбоцитопения при ИТП. Лечение тромбоцитопении, связанной с этими аутоиммунными состояниями, аналогично подходу при лечении ИТП.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7. Антигены лейкоцитов, HLA-типирование

Отторжение тканевых аллогенных трансплантатов, описанное в 1945 г. Питером Медавара, послужило началом исследования гистосовместимости. Гены МНС обнаружены у всех челюстных позвоночных животных. У человека гены МНС носят также название HLA, так как первоначально были обнаружены на лейкоцитах в результате поиска детерминант групп крови. HLA-комплекс является одним из самых сложных и полиморфных регионов в геноме человека. На сегодняшний день описано более 41 000 аллелей суммарно по I и II классам. Число известных аллелей HLA продолжает расти каждый год, эта тенденция стала еще более выраженной в связи с более широким использованием в последние годы методов NGS с высокой пропускной способностью и повышенным уровнем разрешения.

### Области применения HLA-типирования:

- трансплантация солидных органов (почки, сердца, печени, легких, ПЖ и других органов);
- аллогенная родственная или от неродственного донора ТГСК или трансплантация клеток костного мозга;
- HLA-типирование потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток или клеток костного мозга для включения в Регистр доноров костного мозга;
- выяснение причин супружеской несовместимости при привычном невынашивании плода во время беременности;
- определение предрасположенности к некоторым HLA-ассоциированным заболеваниям, таким как АС (болезнь Бехтерева), целиакия, РА, нарколепсия и др.;
- определение гиперчувствительности к некоторым лекарственным препаратам, например непереносимости *ацикловира* при антиретровирусной терапии при лечении ВИЧ-инфекции.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.1. Структура и функции главного комплекса гистосовместимости

Биологические функции МНС не ограничиваются только развитием ответа на чужеродную генетическую информацию, являются более разнообразными. HLA отвечают за:

- обеспечение взаимодействия клеток;
- распознавание чужеродных и собственных измененных клеток;
- обеспечение позитивной и негативной селекции Т-клеток;
- обеспечение процессинга и представления индукторов и мишеней иммунного ответа;
- обеспечение генетического разнообразия и выживаемости человека как вида.

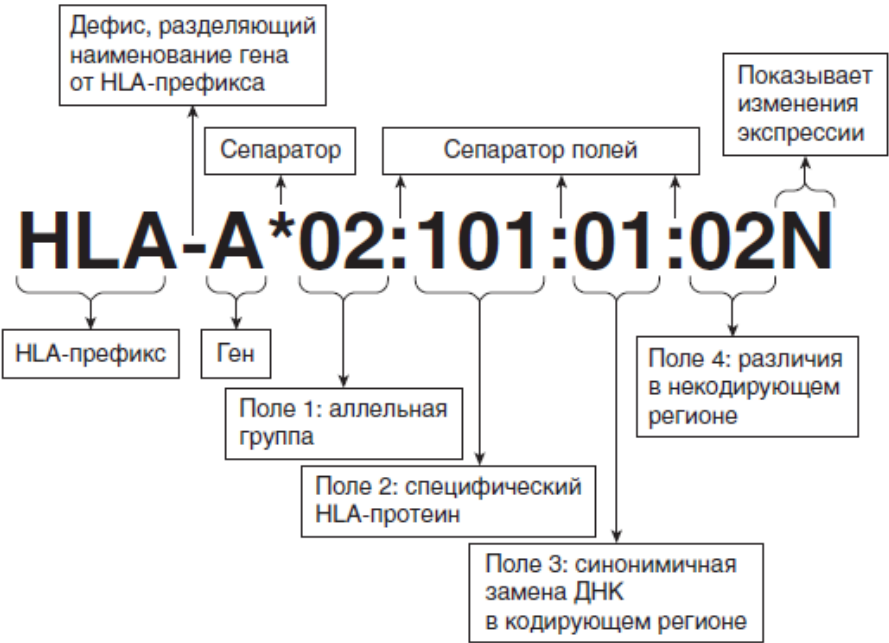
Молекулы HLA представляют собой гликопротеиды, которые экспрессируются на поверхности клеток организма и отличаются чрезвычайно высоким полиморфизмом. В пределах одного локуса определяется большое количество специфичностей HLA-антигенов, которые отличаются аминокислотной последовательностью. Полиморфизм HLA делает каждого человека индивидуальным по набору трансплантационных антигенов. На декабрь 2024 г. на сайте [hla.alleles.org](http://hla.alleles.org) представлено 41 003 HLA и родственных аллелей, описанных по номенклатуре HLA и включенных в базу данных IPD-IMGT/HLA. Гены МНС у человека расположены на коротком плече 6-й хромосомы и разделены на три класса.

Гены HLA I-го класса включают три классических локуса (HLA-A, HLA-B и HLA-C) и три неклассических (HLA-G, HLA-E и HLA-F), а также несколько некодирующих генов или псевдогенов. Молекулы HLA I класса представлены на поверхности всех здоровых ядросодержащих клеток, HLA-антигены не экспрессируются на эритроцитах и клетках ворсинчатого трофобласта. Молекулы HLA I класса локусов A, B и C являются гетеродимерами полиморфной тяжелой  $\alpha$ -цепи (45 кДа), состоящей из трех гипервариабельных доменов ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , и  $\alpha 3$ ) и легкой  $\beta$ -цепи (12 кДа). Легкая цепь представляет собой  $\beta 2$ -микроглобулин, который нековалентно связан с  $\alpha$ -цепью и не интегрирован с мембраной, кодируется отдельно на 15-й хромосоме и не относится к МНС. HLA I класса на клеточной поверхности распознаются TCR CD8+лимфоцитов, что приводит к активации цитотоксических эффекторных функций. Молекулы МНС II класса (HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) представлены на антигенпрезентирующих клетках, таких как ДК, макрофаги, В-клетки, активированные Т-клетки, клетки эндотелия, и состоят из двух цепей с примерно одинаковой молекулярной массой (30 кДа), включают внеклеточные домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 1$  на N-терминальном конце,  $\alpha 2$  и  $\alpha 2$  ближе к мембране клетки. Молекулы HLA II класса контактируют с корцептором CD4 на Т-лимфоцитах и участвуют преимущественно в реакциях гуморального иммунитета. Экспрессия молекул HLA II класса может быть индуцирована у клеток, которые в норме не экспрессируют эти молекулы (например, во время инфекций и эпизодов воспаления, в том числе при реперфузии органа).

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.2. Принципы числовой терминологии номенклатуры HLA

Полиморфизм и разнообразие генов HLA делают каждого человека индивидуальным. В этой связи вероятность подбора полностью совместимого донора и реципиента по антигенам HLA крайне мала. Разнообразие генов HLA требует их систематизации. По мере накопления данных о структуре антигенов, появления молекулярно-генетических методов исследования номенклатура HLA неоднократно пересматривалась. Последняя и ныне действующая номенклатура принята в 2010 г. (рис. 11.2).



**Рис. 11.2.** Номенклатура HLA (hla.alleles.org)

Аллель HLA имеет уникальный номер, соответствующий четырем наборам цифр, разделенным двоеточием. Аллели получают как минимум четырехзначное имя, соответствующее первым двум наборам цифр, более длинные имена присваиваются только при необходимости. Перед первым двоеточием цифры обозначают группу аллелей. Часто этот аллотип соответствует серологическому антигену. Следующий набор цифр используется для перечисления подтипов, причем номера присваиваются в том порядке, в котором были открыты. Если номера аллелей различаются в двух наборах цифр, то в генах определяются нуклеотидные замены, которые изменяют аминокислотную последовательность кодируемого белка. Если аллели отличаются только синонимическими нуклеотидными заменами (также называемыми молчащими или некодирующими заменами) внутри кодирующей последовательности, то эти различия отражены в третьем поле цифр. Аллели, которые отличаются только полиморфизмом последовательностей в интронах или в 5'- или 3'-нетранслируемых областях, которые фланкируют экзоны и интроны, различаются использованием четвертого набора цифр.

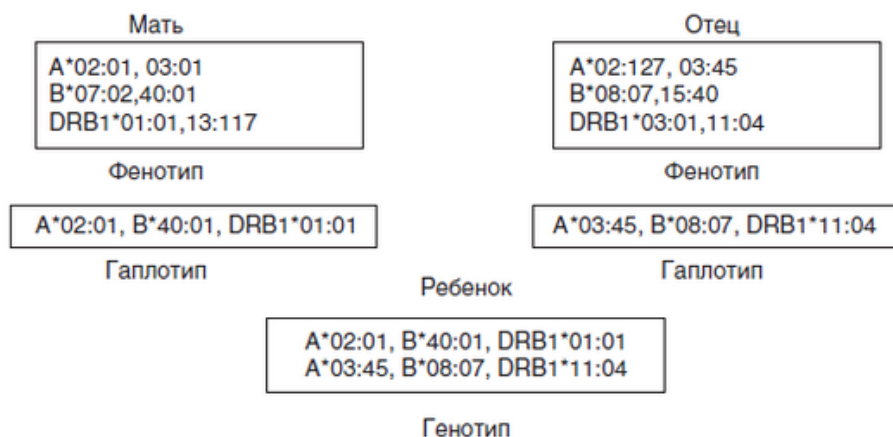
Помимо уникального номера аллеля, в ряде случаев добавляются дополнительные суффиксы, чтобы указать статус его экспрессии. Аллелям, которые не экспрессируются (нулевые аллели), присвоен суффикс N. Суффикс L используется для обозначения аллеля с низкой экспрессией на поверхности клеток по сравнению с нормальными уровнями. Суффикс Q используется, когда экспрессия аллеля «сомнительна» (табл. 11.12).

**Таблица 11.12.** Принятые обозначения в номенклатуре HLA 2010 г.

Номенклатура	Указывает
HLA	Область HLA и префикс гена <i>HLA</i>
<i>HLA-DRB1</i>	Конкретный локус HLA, то есть DRB1
<i>HLA-DRB1*13</i>	Группа аллелей, кодирующих антиген DR13
<i>HLA-DRB1*13:01</i>	Конкретный аллель HLA
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	Аллель, отличающийся синонимичным полиморфизмом от <i>DRB1*13:01:01</i>
<i>HLA-DRB1*13:01:01:02</i>	Аллель, содержащий полиморфизм вне кодирующей области от <i>DRB1*13:01:01:01</i>
<i>HLA-A*24:09N</i>	«Нулевой» аллель — аллель, который не экспрессируется
<i>HLA-A*30:14L</i>	Аллель, кодирующий белок со значительно сниженной или «низкой» экспрессией на клеточной поверхности
<i>HLA-A*24:02:01:02L</i>	Аллель, кодирующий белок со значительно сниженной или «низкой» экспрессией на клеточной поверхности, где полиморфизм обнаруживается за пределами кодирующей области
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	Аллель, кодирующий белок, который экспрессируется только как «секретируемая» молекула
<i>HLA-A*32:11Q</i>	Аллель, имеющий полиморфизм, который оказывает значительное влияние на экспрессию молекулы на клеточной поверхности, но это не было подтверждено и ее экспрессия остается «сомнительной»

Гены HLA наследуются кодоминантно, то есть у ребенка на поверхности клеток будут экспрессироваться продукты генов, полученные от обоих родителей. При этом HLA-гаплотип, совокупность HLA-генов, передается целиком, как отдельный менделевский признак. Два HLA-гаплотипа составляют HLA-генотип человека (рис. 11.3). У потомков одних и тех же родителей возможны четыре варианта наследования гаплотипов.





**Рис. 11.3.** Пример наследования HLA-генов

Кроссинговер генов HLA — чрезвычайно редкое событие, которое приводит к формированию нового гаплотипа.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.3. Трансплантационный иммунитет

Молекулы HLA являются сильными антигенами, на которые у реципиента развивается иммунный ответ, в результате чего пересаженные органы и ткани отторгаются. Презентация антигенов HLA донора Т-лимфоцитам реципиента осуществляется двумя способами. Прямая презентация подразумевает представление непротессированных молекул HLA, экспрессированных на антигенпрезентирующих клетках донора, присутствующих в качестве «пассажира» в трансплантате. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов и Th-реципиента молекулами HLA I и II классов донора сопровождается развитием преимущественно клеточного отторжения. При непрямой презентации антигенпрезентирующие клетки реципиента представляют Т-лимфоцитам протессированные антигены HLA. Этот тип презентации индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, определяемого Th2 или Th1.

В развитии реакции отторжения чужеродной ткани участвуют гуморальные и клеточные механизмы. Реакция Т-лимфоцитов на чужеродные антигены протекает подобно гиперчувствительности замедленного типа. В результате отмечается повреждение клеток донорской ткани путем прямой цитотоксичности или за счет секреции лимфокинов. Для повреждения трансплантата Т-клетками характерно развитие лимфоцитарной инфильтрации, фиброза и некроза паренхиматозных клеток. Гуморальный иммунный ответ опосредован антителами, которые могут присутствовать в сыворотке реципиента перед трансплантацией или образовываться в посттрансплантационный период. Гуморальные факторы повреждают пересаженную ткань механизмами, эквивалентными реакциям гиперчувствительности II и III типа. Антитела чаще всего связываются с антигенами на эндотелии трансплантированного органа. Это приводит к повреждению эндотелия, накоплению иммунных комплексов в кровеносных сосудах, активации комплемента и развитию острого некротизирующего васкулита или хронического фиброза интимы с сужением сосудов. Выделяют сверхострое, острое и хроническое отторжение трансплантата. Сверхострое отторжение вызывают присутствующие (предсуществующие) у реципиента до трансплантации антитела к антигенам донора. Клетка-мишень — эндотелиоцит, с которым связываются антитела в первые часы после пуска кровотока, в результате развивается тромбоз сосудов трансплантата. Острое отторжение регистрируют в течение первых 3 нед после трансплантации органа или ткани. Острое отторжение является типичным иммунным ответом на чужеродный антиген, может быть клеточно-опосредованным (антителонезависимым) или протекать по типу антителозависимой клеточной цитотоксичности с активацией комплемента иммунными комплексами. Хроническое отторжение развивается в более поздние сроки, так же как и острая форма, может быть опосредовано как иммунными клетками, так и антителами. Образование антител к HLA связано с контактом иммунной системы с чужеродными антигенами МНС. Наличие антител, как правило, связано с массивными гемотрансфузиями, трансплантацией тканей и органов. Антитела к HLA обычно образуются у женщин после беременностей и родов. Анти-HLA-антитела представлены Ig классов M и G. В листе ожидания трансплантации органа у 18–30% реципиентов детектируются анти-HLA-антитела (предсуществующие антитела). Присутствие у реципиента антител свидетельствует о высоком риске развития реакции отторжения и утраты трансплантата. Реципиенты, сенсibilизированные к HLA, требуют более тщательного подбора донорских органов, а также применения активных методов десенсибилизации на этапах подготовки к трансплантации органа и в ранний послеоперационный период, подбора оптимальных схем иммуносупрессии. Формирование анти-HLA-антител после трансплантации (*de novo* образованные антитела) наблюдают в среднем в 10–20% случаев. Образование антител к антигенам HLA может происходить как в ранний посттрансплантационный период (на 14–30-е сутки), так и в более поздние сроки, через несколько лет после трансплантации. Появление донор-специфических анти-HLA-антител сопряжено с развитием дисфункции трансплантата и требует назначения специфической терапии. В соответствии с клиническими рекомендациями определение наличия у пациента антител к HLA является обязательным тестом наряду с определением группы крови и HLA-типированием и выполняется при постановке в «лист ожидания». Определение антител следует проводить реципиентам, ожидающим трансплантацию почки, ПЖ, легких, сердца. При трансплантации печени исследование анти-HLA-антител не проводят. Изучение влияния анти-HLA-антител на исходы трансплантации показало, что при положительной перекрестной пробе между сывороткой реципиента и лимфоцитами донора в тесте комплементзависимой цитотоксичности (CDC) в 80% трансплантаций отмечается развитие реакции отторжения трансплантата, тогда как при отрицательной пробе

отторжение наблюдают только в 4% случаев. Поэтому выполнение перекрестной пробы (cross-match) между лимфоцитами донора и сывороткой крови реципиента является обязательным тестом, выполняемым непосредственно перед трансплантацией.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.4. HLA-типирование, методы

HLA-типирование может быть выполнено серологическим лимфоцитотоксическим методом (HLA-фенотипирование) или различными молекулярно-генетическими методами (HLA-генотипирование).

*Метод комплементзависимой цитотоксичности* использовали для определения наличия анти-HLA-антител.

Серологическое HLA-типирование заключается в микроскопическом подсчете живых и погибших лимфоцитов в реакции комплементзависимой цитотоксичности, поэтому метод называется микролимфоцитотоксическим тестом. Данный метод в последние годы практически не используется.

В настоящее время для определения анти-HLA-антител разработаны и внедрены в клиническую практику высокочувствительные, основанные на твердой фазе методы скрининга и идентификации. Принцип методов основан на использовании очищенных при помощи аффинной хроматографии гликопротеинов, мобилизованных на лунках микропланшета или на поверхности полистироловых микрочастиц, имеющих разные спектральные характеристики (мультиплексный анализ, Luminex). Метод позволяет идентифицировать специфичность антител, направленных против HLA I и II классов. Результат исследования оценивается по средней интенсивности флюоресценции, исходящей от микросфер, что позволяет косвенно оценить степень сенсибилизации реципиента к антигенам HLA.

**Степень разрешения.** HLA-типирование может быть выполнено с различной степенью разрешения: низкого разрешения (Low resolution), высокого разрешения (High resolution) и аллельного разрешения (Allelic resolution). Для пересадки солидных органов достаточно выполнить HLA-типирование низкого разрешения, для пересадки гемопоэтических стволовых клеток и костного мозга требуется HLA-типирование на высоком разрешении. Под низким разрешением понимают результат молекулярно-генетического HLA-типирования на уровне первого поля, например: HLA-A\*02; HLA-DRB1\*13. HLA-типирование с высоким разрешением подразумевает идентификацию аллелей, кодирующих аминокислотную последовательность внутри антигенсвязывающего сайта, то есть первое и второе поле согласно номенклатуре, например: HLA-A\*01:23; HLA-B\*07:02. Аллельное разрешение позволяет выявить уникальную нуклеотидную последовательность данного аллеля, например: HLA-A\*01:01:132; HLA-B\*07:06:01:01.

Ключевым этапом молекулярно-генетических методов типирования является ПЦР, которая выполняется в нескольких модификациях:

- SSP (Sequence specific primers) HLA-типирование — использование для определения HLA последовательностей специфических праймеров;
- SSO (Sequence specific oligonucleotides) HLA-типирование — использование последовательностей специфических олигонуклеотидных зондов;
- SBT (Sequencing based technologies) HLA-типирование — использование технологии, основанной на секвенировании;
- NGS HLA-типирование — использование методов NGS или массовое параллельное (высокопроизводительное) секвенирование.

Наиболее технически простой методикой типирования является метод ПЦР-SSP. Смесь праймеров соответствует каждому аллельному варианту. В процессе амплификации специфические праймеры связываются с искомыми участками ДНК. Детекция результатов типирования проводится методом электрофореза в агарозном геле, или выполняется ПЦР-РВ. Основным достоинством SSP-технологии является возможность осуществлять типирование как на низком, так и на высоком разрешении. Хотя этой методике уже около трех десятилетий, она по-прежнему имеет преимущество использования общедоступного лабораторного оборудования. Однако низкая производительность метода является существенным недостатком, ограничивающим его использование в практике.

Технология SSO подразумевает локус-специфическую амплификацию исследуемого гена HLA с последующим использованием зондов, специфичных уникальным участкам ДНК. Зонды с мечеными фрагментами ДНК фиксируются на микрочипе (технология DNA-microarray) или полистироловых микросферах (технология xMAP). Метод HLA-типирования на основе секвенирования по Сэнгеру основан на прямом определении нуклеотидной последовательности ДНК-специфических участков HLA-региона.

Метод NGS позволил значительно увеличить производительность и точность прочтения последовательностей нуклеотидов в исследуемой ДНК. NGS-технология массового параллельного секвенирования обеспечивает сверхвысокую пропускную способность, масштабируемость и скорость. Ее можно использовать для определения порядка нуклеотидов во всех геномах или целевых областях ДНК или РНК.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.5. Ассоциация генов главного комплекса гистосовместимости с заболеваниями

В настоящее время многие исследования посвящены изучению роли молекул HLA в развитии патологий, в том числе аутоиммунных заболеваний. Особенности презентации антигенных пептидов определенными продуктами генов МНС приводит к накоплению аутоагрессивных клонов в связи с нарушениями процессов центральных механизмов толерантности. В результате против собственных антигенов вырабатываются аутоантитела, что является одной

из причин развития аутоиммунных заболеваний. При этом аутоиммунные болезни, при которых вырабатываются аутоантитела, обычно ассоциированы с молекулами HLA II класса, тогда как заболевания, при которых аутоантитела не обнаруживаются, чаще ассоциированы с определенными аллелями I класса HLA. Наиболее изучена корреляция между HLA-B\*27 и болезнью Бехтерева (AC). У 90% больных этим заболеванием на клетках присутствует молекула HLA-B\*27. Анализ на наличие HLA-B\*27 входит в стандарты обследования пациентов с AC.

Связь генов HLA с высоким риском развития некоторых патологических состояний представлена в табл. 11.13.

**Таблица 11.13.** Ассоциация генов HLA с неинфекционными заболеваниями

Заболевание	Предрасполагающие гены	Протективные гены
СД I типа	DRB1*03:01; DRB1*04:01; DRB1*04:05; DQB1*02:01; DQB1*03:01	DRB1*04:03; DRB1*07:01 DRB1*14:01; DRB1*15:01
РА	DRB1*04:01; DRB1*04:04; DRB1*04:05; DRB1*01:01; DRB1*10:01; DRB1*14:02	DRB1*01:03; DRB1*04:02 DRB1*07:01; DRB1*11:02
AC	HLA-B*27	—
Нарколепсия	DQB1*06:02	DQB1*06:01
Рак ШМ	HLA-A*01:01	—
Рак желудка	DRB1*16:01	—
Болезнь Грейвса	DRB1*03:01	—
Высокий индекс массы тела	HLA-B*07; DRB1*07; DRB1*12	—
Рассеянный склероз	DRB1*15:01	DRB1*14
Целиакия	DQA1*05:01, DQB1*02:01; DQA1*02:01, DQB1*02:02; DQA1*03, DQB1*03:02	—

Связь определенных аллелей системы HLA с развитием аутоиммунной патологии может быть как обусловлена аминокислотным составом антигенпрезентирующей борозды, так и располагаться рядом с ней, в зоне непосредственного контакта с TCR. Полиморфизм системы HLA в этой области может приводить к связыванию аутореактивных эффекторных Т-клеток или к слабому отбору регуляторных клеток.

Различия в пептид-связывающей способности отдельных аллелей также определяют предрасположенность к некоторым инфекционным заболеваниям. Например, люди, несущие аллели HLA-A\*11; HLA-B\*35; HLA-DRB1\*10, предрасположены к гриппу H1N1, а при наличии HLA-A\*25:01; HLA-B\*46:01 — к коронавирусу SARS-CoV-2. Таким образом, определенные аллели генов HLA предрасполагают к ряду патологических состояний, в том числе аутоиммунных и онкологических заболеваний, нарушений репродуктивной функции, инфекций.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.7.6. Показания к назначению HLA-типирования

В соответствии с национальными клиническими рекомендациями по трансплантации солидных органов HLA-типирование проводят всем пациентам, встающим в «лист ожидания» трансплантации почки, сердца, ПЖ, легких, тонкой кишки. Пациентам, ожидающим трансплантацию печени, несмотря на ее низкую иммуногенность, рекомендуется проводить HLA-типирование как минимум по локусу HLA-B в связи с высоким риском развития реакции «трансплантат против хозяина». Также HLA-типирование выполняют при родственной трансплантации органов, в этом случае проводят типирование как реципиента, так и донора. Целью HLA-типирования является подбор пары «донор–реципиент». При этом критичным является соответствие донора и реципиента по антигенам локуса HLA-DRB1. Снижение значимости соответствия донора и реципиента по молекулам HLA можно выразить следующим образом: HLA-DRB1 > HLA-B > HLA-A.

Реципиентам солидных органов проводится плановое однократное HLA-типирование при поступлении в лист ожидания на трансплантацию на низком разрешении не менее чем по трем локусам: HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1. HLA-типирование доноров при трансплантации солидных органов рекомендуется выполнять более развернуто, например по пяти локусам (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1) на низком разрешении, чтобы избежать трансплантации от донора с HLA-мишенями донор-специфических антител, наличие которых в сыворотке крови реципиента может привести к острому или сверхострому отторжению. После трансплантации знание генотипа донора позволяет проводить мониторинг антидонорских антител, появление которых *de novo* увеличивает риск отторжения трансплантата.

При трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток типирование донора и реципиента проводят по пяти локусам — HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 — с высоким или аллельным разрешением.

При аутоиммунных заболеваниях проводят типирование для подтверждения диагноза. Так, исследование HLA-B\*27 выполняют при серонегативных спондилоартропатиях у детей и взрослых для верификации диагноза. Типирование локусов HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 выполняют для выявления предрасположенности к развитию следующих заболеваний:

- аутоиммунный тиреоидит;
- СД 1-го типа;
- СКВ;
- АИГ;

- первичный билиарный цирроз;
- целиакия;
- хроническая идиопатическая крапивница.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.8. Оценка донорского химеризма при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Успешность аллогенной ТГСК и трансплантации клеток костного мозга оценивается по клиническим и лабораторным данным обследования пациентов. Одним из ключевых лабораторных тестов является методика определения химеризма, ставшая рутинной в КЛД. Результаты теста позволяют осуществлять непрерывный мониторинг приживления трансплантата и имеют основополагающее значение для раннего терапевтического вмешательства. Понятие «химера» используется для обозначения организмов с генетическими неоднородными популяциями клеток, произошедшими от разных зигот. В трансплантологии состояние химеризма наблюдается у пациентов после ТГСК из-за сосуществования трансплантированных донорских гемопоэтических стволовых клеток и здоровых клеток других тканей реципиента. Замещение гемопоэза на донорское при этом может происходить не полностью, некоторая доля гемопоэтических клеток реципиента продолжает функционировать. Количественная оценка химеризма является обязательным исследованием после алло-ТГСК. Химеризм оценивается по соотношению ДНК донора и реципиента в исследуемом образце периферической крови и/или костного мозга и классифицируется следующим образом:

- «полный химеризм», или «полный донорский химеризм», при выявлении более 95–99% донорских клеток в исследуемом образце;
- «смешанный химеризм», или «смешанный донорский химеризм», при совместном выявлении генотипов донора и реципиента, донорские клетки составляют от 5 до 95% (либо от 1 до 99%).

Порог определения донорского химеризма, как полного, так и смешанного, может отличаться в зависимости от чувствительности используемого метода, его оценки и опыта трансплантационного центра. Донорский химеризм принято оценивать в динамике начиная с +30-го дня после трансплантации. Далее проводят исследования через каждые 30 дней, на +60-й, +90-й, +120-й, +180-й и +365-й дни в течение первого года после ТГСК. Спустя год от трансплантации исследование можно проводить реже при стабильном состоянии пациентов и отсутствии признаков развития осложнений.

Донорский химеризм оценивают как в общей фракции ДНК, выделенной из периферической крови реципиента, — общий химеризм, так и в отдельных клеточных субпопуляциях — линейно-специфический химеризм. Материалом для исследования служит периферическая кровь или костный мозг. Однако вопрос выбора материала остается дискуссионным.

Для оценки линейно-специфического химеризма чаще всего изучают линии CD3+ (Т-лимфоциты), CD19+ (В-лимфоциты), CD15+, CD33+ (клетки миелоидного ряда), CD34+ (стволовые клетки), CD71+ (эритроидный ряд), CD16+, CD56+ (NK-клетки) как показатели функции соответствующих ростков кроветворения донорского происхождения. С появлением возможности оценивать отдельные клеточные субпопуляции стали выделять понятие «расщепленный химеризм» — полный донорский химеризм в общей популяции клеток, но смешанный при исследовании отдельных клеточных линий.

Зарегистрирована связь между изменением донорского химеризма и такими посттрансплантационными событиями, как приживление трансплантата, его отторжение, развитие реакции «трансплантат против хозяина» и рецидив заболевания у пациентов с онкопатологией. В частности, наличие прогрессирующего смешанного донорского химеризма (увеличение ДНК реципиента более чем на 5%), по-видимому, указывает на рецидив заболевания, в отличие от транзитного или стабильного смешанного химеризма. Для оценки риска развития рецидива также применяют методику определения МОБ. МОБ — остаточная популяция опухолевых клеток, которую невозможно определить цитологически. Для ее определения применяют высокоточные молекулярные методы, такие как количественная ПЦР, проточная цитофлуориметрия и NGS.

Наиболее универсальным способом количественной оценки химеризма стал метод, основанный на детекции гипервариабельных участков ДНК. Основным преимуществом является возможность применения практически для всех пар донор–реципиент независимо от пола, HLA-совместимости, групп крови или диагноза. Единственным ограничением являются однопairoвые близнецы.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.9. Особенности обеспечения качества иммуногематологических исследований

#### 11.9.1. Обеспечение качества при определении групп крови

При переливании крови в принципе недопустимы ошибки по использованию несовместимых компонентов крови, поэтому здесь не ведется Гауссовская статистика, применяемая в традиционных лабораторных исследованиях. Тем не менее ошибки случаются, но каждая из них анализируется отдельно. Специализация, повышение квалификации в этом разделе проводятся по анализу возможных ошибок.

Контроль качества необходим и обязателен в иммуногематологии, так как:

- сотрудники лабораторий могут ошибаться;
- реактивы могут портиться из-за неправильного хранения;
- оборудование может давать сбои.

При обследовании доноров и реципиентов крови и ее компонентов действуют приказы МЗ РФ, в соответствии с которыми обязательно проведение контроля качества иммуногематологических исследований путем включения в каждую серию исследований как положительного, так и отрицательного контроля.

Приказом МЗ РФ 2020-1134н при обследовании доноров крови предписано, что в целях обеспечения соблюдения требований безопасности крови и ее компонентов применяются следующие правила исследования групп крови.

#### 1. Определение группы крови по системе АВ0.

- Проводится из образца донорской крови, взятого во время донации перекрестным способом со стандартными эритроцитами А1, В. При проведении анализа на плоскости используются также стандартные эритроциты группы крови 0.
- В каждую серию исследований включаются положительный и отрицательный контрольные образцы (эритроциты А1, В, 0).

2. При скрининге аллоиммунных антител в образцах крови доноров применяется панель стандартных эритроцитов, предназначенная для определения аллоиммунных антиэритроцитарных антител. Панель стандартных эритроцитов должна включать образцы эритроцитов не менее чем от трех доноров, не допускается применение смеси (пула) образцов эритроцитов. Скрининг проводится в непрямом антиглобулиновом тесте или в тесте с аналогичной чувствительностью.

3. В каждую серию исследований включаются «положительный» и «отрицательный» контроль (образцы сывороток, содержащие и не содержащие антитела).

При обследовании потенциальных реципиентов крови предписано следующее. Исследование образцов крови реципиента организуется в лаборатории МО и включает скрининг аллоиммунных антител к антигенам эритроцитов с использованием панели стандартных эритроцитов, состоящей не менее чем из трех видов клеток, типированных по антигенам С, с, Е, е, К, Kidd, Duffy, Lutheran, MNS, Lewis. Скрининг проводится в непрямом антиглобулиновом тесте. В каждую серию исследований включаются «положительный» и «отрицательный» контроль (образцы сывороток, содержащие и не содержащие антитела).

Контроль качества иммуногематологических исследований можно организовать с помощью коммерческого продукта «Модульная система» из восьми флаконов, содержащих взвесь человеческих эритроцитов, для комбинирования в соответствии с потребностями лаборатории.

Этот набор легко адаптируется к изменениям нормативной базы, подходит для ручных и автоматизированных методов. Комбинирование необходимых флаконов позволяет исключить потери КМ.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### 11.9.2. Обеспечение качества при HLA-типировании

Для HLA-типирования чаще всего используется цельная кровь, взятая из локтевой вены в одноразовую стерильную пробирку (например, вакутейнер) с антикоагулянтом ЭДТА или натрия цитратом в количестве не менее 2 мл. Нельзя использовать в качестве антикоагулянта гепарин, так как он существенно ингибирует ПЦР. Образец маркируют и сопровождают направлением на исследование с указанием необходимой информации. Не следует отправлять образцы, внешняя поверхность которых загрязнена кровью или другими биологическими жидкостями, в этом случае необходимо провести взятие другого образца.

Пробирки с кровью транспортируют в лабораторию в термоконтейнере с хладоэлементами при температуре 2–8 °С. Пробирки с кровью можно хранить в лаборатории при температуре 2–8 °С до 1 нед или при необходимости замораживать и хранить при –20 °С до 1 года.

Кроме цельной крови, в качестве биоматериала для выделения ДНК с целью HLA-типирования могут быть использованы буккальный эпителий, клетки костного мозга или суспензия лейкоцитов. Буккальный эпителий получают с помощью специальных щеточек или ватных тампонов соскобом в щечной области. Суспензию лимфоцитов («лимфоцитарное кольцо») получают центрифугированием цельной или разбавленной 1:1 крови в градиенте плотности (фиколл-верографин, гистопак, лимфолит и др.).

Выделение ДНК проводят с помощью специальных химических реактивов (например, фенол-хлороформная экстракция) или с помощью коммерческих наборов. Выделение ДНК может осуществляться либо ручным методом, либо автоматическим с использованием специальных автоматических (роботизированных) станций. Выделение ДНК из полученного биоматериала должно выполняться в отдельном помещении (зона 1) пре-ПЦР-зоны лаборатории.

Выделение ДНК рекомендуется проводить в ламинарном шкафу 2-го класса биобезопасности либо в автоматической станции, имеющей встроенную ультрафиолетовую лампу для деkontаминации и с возможностью обрабатывать внутренние поверхности дезинфицирующими растворами.

Основными методами экстракции ДНК являются: солевое осаждение, химическая экстракция, выделение на магнитных частицах, использование сорбента (например, «силика»), колоночные методы с последующей вакуумной фильтрацией или центрифугированием.

После этапа выделения ДНК необходимо оценить концентрацию и качество выделенного образца ДНК. Оценку концентрации и чистоты выделенной ДНК чаще всего проводят спектрофотометрически с использованием ультрафиолетового спектрофотометра. Известно, что оптическая плотность раствора ДНК, полученная измерением при длине волны 260 нм, равная 1 OD, соответствует концентрации ДНК 50 нг/мкл. Зная оптическую плотность исследуемого образца при измерении на 260 нм, можно сделать перерасчет концентрации ДНК. Чистоту ДНК определяют путем расчета коэффициента, равного отношению оптической плотности при 260 нм к оптической плотности при 280 нм. Так как известно, что ДНК и РНК имеют максимум поглощения при 260 нм, а белки — при 280 нм, можно оценить примеси белков и РНК в исследуемом образце.

В идеале коэффициент OD260/280 должен быть равен 1,8. Однако для большинства методик HLA-типирования допустимо использование образцов выделенной ДНК с коэффициентом OD260/280 в диапазоне 1,6–1,9. При получении коэффициента ниже 1,6 можно сделать заключение об избыточном белковом загрязнении образца, а при коэффициенте выше 1,9 — о присутствии избыточного количества РНК. Примеси, выявленные при измерении на длине волны 230 и 330 нм, считают небелковым загрязнением.

Оценку концентрации ДНК можно выполнить чувствительным флуориметрическим методом, когда образец ДНК смешивается с интеркалирующим флуоресцентным красителем, который специфически связывается именно с двуцепочечной ДНК и не связывается с РНК и белками. Для большинства методик HLA-типирования достаточно концентрации 15–30 нг/мкл геномной ДНК, однако существуют методики, позволяющие работать с минимальными концентрациями ДНК (порядка 3–4 нг/мкл) или, напротив, требующие больших количеств ДНК (порядка 50–100 нг/мкл).

*Неудачи при HLA-типировании* могут быть обусловлены разными факторами. Чаще всего это ошибки при взятии и хранении биоматериала. Следует помнить, что использование гепарина в качестве антикоагулянта недопустимо, так как гепарин блокирует Taq-полимеразу, что приводит к нарушению процесса амплификации и невозможности получить результат типирования. Низкая или слишком высокая концентрация выделенной ДНК, высокая примесь белков или солей в растворе ДНК также оказывают влияние на результат амплификации. Контаминация реакционной смеси или реактивов продуктами реакции, как правило, приводит к невозможности получить результат типирования или получению неверных результатов, поэтому крайне важной является организация работы лаборатории с минимизацией риска контаминации на всех этапах проведения HLA-типирования.

В России не предусмотрено проведение внешнего контроля качества в лабораториях, осуществляющих HLA-типирование. Аккредитация лаборатории в Европейской федерации иммуногенетиков (EFI) предполагает тестирование 10 образцов ДНК, предоставленных референс-лабораторией. В то же время EFI предлагает проводить обязательный внутренний контроль качества. Рекомендуется типирование двух-трех образцов биоматериала, ранее протестированного сотрудниками лаборатории, при получении новых лотов наборов реактивов. Важным является также плановое повторение типирования нескольких образцов биоматериала.

## Глава 11. Иммуногематологические исследования и HLA-типирование

### Рекомендуемая литература

1. Временные методические рекомендации, регламентирующие HLA-типирование доноров костного мозга/гематопоетических стволовых клеток и взаимодействие регистров доноров костного мозга / Под редакцией В.Г. Савченко. М., 2021. 34 с.
2. Доронина Н.В., Боровкова Н.В. и др. Методы определения антител к главному комплексу гистосовместимости В // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2012. № 4. С. 22–26.
3. Жибурт Е.Б. Новые клинические рекомендации по трансфузиологии: проблемы и решения // Справочник заведующего КДЛ. 2022. № 1. С. 22–23.
4. Жибурт Е.Б. Трансфузиологический словарь. Руководство для врачей. М.: РАЕН, 2012. 319 с.
5. Захарова М.Ю., Белянина Т.А. и др. Вклад генов главного комплекса гистосовместимости класса II в предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям // ACTA NATURAE. 2019. Т. 11. № 4 (43). С. 4–12.
6. Омарова Ф.А., Дроков М.Ю., Хамаганова Е.Г. Главный комплекс гистосовместимости: история открытия, эволюция, строение, значение при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток // Трансплантология. 2023. Т. 15. № 2. С. 251–265.
7. Трансфузиология. Национальное руководство. Краткое издание / Под ред. А.А. Рагимова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 704 с.
8. Трошина Е.А., Юкина М.Ю. и др. Роль генов системы HLA: от аутоиммунных заболеваний до COVID-19 // Проблемы эндокринологии. 2020. Т. 66. № 4. С. 9–15.
9. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 7th edition. Cham (CH): Springer, 2019. Chapter 9.
10. Barker D., Maccari G. et al. The IPD-IMGT/HLA // Database Nucleic Acids Research. 2023. Vol. 51. N. D1. P. D948–D955.
11. Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodmer W.F. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010 // Tissue Antigens. 2010. Vol. 75. N. 4. P. 291–455.
12. Nomenclature for Factors of the HLA System. [Electronic resource]. Available at: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.1. Основные понятия клинической фармакогенетики

*Клиническая фармакогенетика* — раздел клинической фармакологии и клинической генетики, тесно связанный с лабораторным мониторингом ЛС, использующий методы лабораторного исследования, изучающий два основных аспекта:

- 1) генетические особенности пациента, влияющие на индивидуальный фармакологический ответ (эффективность и безопасность применения ЛС);
- 2) особенности фармакологического ответа на ЛС у пациентов с наследственными (как правило, моногенными) заболеваниями.

Зарождение фармакогенетики связано с тремя основными событиями:

- в 1957 г. Арно Мотульский публикует статью о вкладе генетических факторов в развитие неблагоприятных лекарственных реакций;
- в 1959 г. Фридрих Вогель ввел термин «фармакогенетика»;
- в 1962 г. Вернер Калоу опубликовал монографию «Фармакогенетика».

В России развитие клинической фармакогенетики связывают с научной деятельностью медицинского генетика академика Н.П. Бочкова и клинического фармаколога академика В.Г. Кукеса.

Грубые хромосомные альтерации, включая ploидность хромосом, делеции с переносом хромосомного материала, вовлекающие комплексы генов, — задача, выходящая за рамки фармакогенетики. Эта проблема *фармакогеномики*, под которой понимается влияние всего генома на развитие индивидуального фармакологического ответа. Переход от фармакогенетики к фармакогеномике станет возможен в будущем, когда будет доступным полногеномный анализ пациентов, то есть идентификация всей нуклеотидной последовательности ДНК пациента.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.1.1. Генетические особенности, рассматриваемые фармакогенетикой

*Генетические особенности пациента, влияющие на фармакологический ответ*, представляют собой SNP в генах, кодирующих белки, участвующие в фармакокинетике и/или фармакодинамике ЛС.

*SNP* (ОНП; в современной иностранной литературе все чаще заменяется на SNV — Single Nucleotide Variant) — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом. Если две последовательности ДНК — *AAGCCTA* и *AAGCTTA* — отличаются на один нуклеотид, в таком случае говорят о существовании двух аллелей — С и Т. SNP возникают в результате точечных мутаций. Тем не менее в понятие SNP (синонимы: полиморфный маркер, аллельный вариант) включено более широкое представительство мутаций. Это может быть не только замена в последовательности ДНК одного нуклеотида на другой, но также вставка одного нуклеотида, делеция («выпадение») одного нуклеотида.

Результатом таких однонуклеотидных полиморфизмов у пациентов является:

- изменение активности белка (фермента, транспортера, ионного канала, сопряженных белков), если имеет место SNP в структурной части гена (кодирует аминокислотную последовательность белка);
- изменение количества белка, если имеет место SNP в регуляторной части гена (не кодирует аминокислотную последовательность белка, но выполняет регулируемую роль по отношению к работе самого гена, к процессу транскрипции).

Существование SNP в том или ином гене, передаваемое из поколения в поколение, может определять генетически обусловленный вклад в индивидуальный фармакологический ответ:

- развитие неблагоприятной побочной реакции;
- резистентность (низкая эффективность или ее отсутствие) к ЛС.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.1.2. Номенклатура однонуклеотидного полиморфизма

Единой номенклатуры для ОНП нет: существует несколько вариантов названия для одного конкретно выбранного ОНП. Приведем пример обозначения SNP в соответствии с общепринятой номенклатурой.

*CYP2C9\*3* — это SNP гена, кодирующего изофермент цитохрома Р-450 2C9 (*CYP2C9*), который представляет замену аденилового (А) нуклеотида на тимидиловый (Т) в нуклеотидной последовательности ДНК гена в положении 1075. Иначе в литературе этот SNP обозначается как *A1075C* гена *CYP2C9*. При этом гены и однонуклеотидные полиморфизмы принято обозначать курсивом, а название белков — продуктов этих генов — без курсива. ОНП также обозначают по их положению в целом в геноме человека, в данном примере — rs1057910. Носительство данного SNP у пациента приводит к тому, что синтезируется фермент *CYP2C9*, в аминокислотной последовательности которого изолейцин в положении 359 заменен на лейцин, который обладает низкой активностью. Следовательно, фармакокинетическое взаимодействие ЛС, метаболизируемых изоферментом цитохрома Р450 *CYP2C9*, у этой категории пациентов будет замедлено. К этим ЛС относятся антагонисты витамина К (*варфарин*), нестероидные противовоспалительные препараты [ацетилсалициловая кислота (Аспирин<sup>®</sup>), амидопирин<sup>®</sup>, метамизол натрия (Анальгин<sup>®</sup>), пироксикам, диклофенак, кетопрофен, индометацин, ибупрофен и др.], пероральные гипогликемические средства (бигуаниды, производные сульфонилмочевины, ингибиторы α-глюкозидазы, аналоги рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 и др.). У этой категории пациентов концентрации в плазме крови перечисленных ЛС или их метаболитов могут быть более высокими по сравнению с пациентами, не несущими данный ОНП. В результате недоучет этого фактора сопряжен с высоким риском развития неблагоприятных побочных реакций. ОНП могут существовать у пациентов в следующих видах.

- «Дикий» генотип, когда не обнаруживается ОНП. Для вышеприведенного примера в этом случае генотип обозначается как *CYP2C9\*1/\*1*. У этой категории пациентов активность *CYP2C9* не изменена.
- Гетерозиготное носительство ОНП — *CYP2C9\*1/\*3*. У этой категории пациентов активность *CYP2C9* снижена.

- Гомозиготное носительство ОНП — *CYP2C9\*3/\*3* — активность *CYP2C9* снижена значительно или вообще не выявляется.

Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

12.1.3. Однонуклеотидный полиморфизм и персонализированная медицина  
Фармакогенетическое тестирование рассматривается как инструмент *персонализированной (персонифицированной) медицины* — методологии использования профилактических и лечебных вмешательств (в том числе с использованием ЛС) с учетом индивидуальных особенностей пациентов, выявляемых с помощью лабораторных *биомаркеров*. ОНП, определяющие генетически обусловленный индивидуальный фармакологический ответ, могут быть в генах, кодирующих белки, которые принимают участие в процессах.

**Фармакокинетика** (*фармакокинетические полиморфизмы*) — гены, кодирующие:

- ферменты биотрансформации (I или II фазы реакций), принимающие участие в метаболизме ЛС;
- транспортеры ЛС (Р-гликопротеин, транспортеры органических анионов, органических катионов и т.д.), принимающие участие в процессах всасывания, распределения и выведения.

**Фармакодинамика** (*фармакодинамические полиморфизмы*) — гены, кодирующие:

- молекулы-мишени для ЛС (рецепторы, ферменты, ионные каналы и т.д.);
- белки, сопряженные с молекулами-мишенями ЛС (G-белки) или участвующие в патогенетических путях заболевания, при котором применяется ЛС (ген, кодирующий NO-синтазу-NOS), или неблагоприятной побочной реакции (гены HLA).

Выявление подобного рода генетических особенностей (*фармакогенетическое тестирование*) будет способствовать прогнозированию индивидуального фармакологического ответа. Фармакогенетический тест — это выявление конкретных генотипов по SNP, ассоциированным с изменением фармакологического ответа. В основе таких тестов лежит ПЦР в разных вариантах. В настоящее время все чаще используются ДНК-чипы, позволяющие выявлять одномоментно несколько тысяч различных SNP. В будущем, очевидно, будет возможно идентифицировать все SNP генома человека (полногеномный анализ методом секвенирования ДНК). При этом в качестве источника ДНК для ПЦР или секвенирования используется или кровь больного, или соскоб буккального эпителия, или даже слюна. Сбор этого биологического материала у больного не требует предварительной подготовки. Результаты фармакогенетического теста представляют собой идентифицированные генотипы больного по тому или иному однонуклеотидному полиморфизму. Врач КЛД будет контролировать адекватность получаемого результата, представлять его врачу — клиническому фармакологу, который интерпретирует результаты фармакогенетического теста и формулирует рекомендации по выбору ЛС и его режима дозирования для конкретного пациента. Фармакогенетическое тестирование разработано для персонализации применения пока небольшого числа ЛС (**табл. 13.1**), в клинической практике используется в следующих случаях:

- применение ЛС с большим спектром и значительной выраженностью неблагоприятных побочных реакций, как правило, с узким терапевтическим диапазоном, которое используется длительно (пожизненно);
- применение ЛС с большим межиндивидуальным разбросом эффективности;
- у пациентов с высоким риском неблагоприятных побочных реакций и/или неэффективности лечения, в том числе с наследственным анамнезом ЛС.

**Таблица 13.1.** Фармакогенетические тесты, используемые в клинической практике для персонализации применения лекарственных средств

ЛС или группа ЛС	Цель проведения фармакогенетического тестирования	ОНП, которые следует определять у пациентов
Варфарин	Персонализация выбора режима дозирования у пациентов с высоким риском тромботических осложнений	<i>CYP2C9*2</i> , <i>CYP2C9*3</i> , <i>A1639G</i> гена <i>VKORC1</i>
Клопидогрел	Прогнозирование резистентности к антиагрегантному действию клопидогрела после стентирования коронарных сосудов	<i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i>
Статины	Прогнозирование развития миопатий (в том числе и рабдомиолиза) при планировании применения статинов, персонализированный выбор максимальной дозы статинов	<i>SLCO1B1*5</i>
Метопролол	Прогнозирование неблагоприятных побочных реакций при применении метопролола, выбор других $\alpha$ -адреноблокаторов у пациентов с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией, хронической сердечной недостаточностью	<i>CYP2D6*4</i> (для европейцев), <i>CYP2D6*10</i> (для монголоидов), <i>CYP2D6*17</i> (для негроидов), дупликация аллеля <i>CYP2D6*1</i> или <i>CYP2D6*2</i>
Пропафенон	Выбор режима дозирования пропафенона, а также необходимости проведения терапевтического	



	лекарственного мониторинга при нарушениях сердечного ритма	
Антидепрессанты	Выбор антидепрессантов и их режимов дозирования при депрессивном синдроме	
Антипсихотические средства (нейролептики)	Выбор антипсихотических ЛС, их режимов дозирования при психозах (шизофрения, маниакально-депрессивный психоз)	
Трамадол	Выбор режима дозирования трамадола или других обезболивающих ЛС у пациентов с болевыми синдромами	
Тамоксифен	Прогнозирование низкой эффективности тамоксифена у пациенток с постменопаузальным эстрогенположительным раком МЖ	
Карбамазепин	Прогнозирование развития синдрома Стивенса–Джонсона или синдрома Лайелла при применении абакавира у пациентов с эпилепсией и эписиндромами, которые сами себя идентифицируют как представители монголоидной расы	<i>HLA-B*1502</i>
Фенитоин	Выбор режима дозирования фенитоина у пациентов с эпилепсией и эписиндромами	<i>CYP2C9*2, CYP2C9*3</i>
Ингибиторы H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФазы	Выбор дозы ингибиторов H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -АТФазы (омепразола, эзомепразола, лансопризола) у пациентов с кислотозависимыми заболеваниями (язвенная болезнь желудка, двенадцатиперстной кишки, гастроэзофагеально-рефлюксная болезнь), в том числе в составе антихеликобактерной терапии	<i>CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17</i>
Иринотекан	Прогнозирование развития нейтропении при применении иринотекана у пациентов с колоректальным раком	<i>UGT1A1*28</i>
Азатиоприн, 6-меркаптопурин	Прогнозирование развития гематологической токсичности при применении азатиоприна и 6-меркаптопурина у пациентов с болезнью Крона или неспецифическим язвенным колитом	<i>TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C</i>
5-фторурацил, капецитабин	Прогнозирование высокой токсичности (нейротоксичности, кардиотоксичности и т.д.) фторурацила и капецитабина, выбор режима дозирования данных препаратов	<i>G735A гена DPYD</i>
Гефитиниб, эрлотиниб	Прогнозирование высокой эффективности или резистентности к селективным ингибиторам тирозинкиназы гефитинибу и эрлотинибу у пациентов с немелкоклеточным раком легкого	Мутации гена <i>EGFR</i> в опухолевых клетках
Цетуксимаб, панитумумаб	Прогнозирование резистентности к моноклональным антителам к рецептору EGFR при метастатическом раке толстой и прямой кишки	KRAS-мутации в опухолевых клетках
Трастузумаб	Прогнозирование эффективности трастузумаба у пациенток с метастазирующим раком МЖ	HER2-статус в опухолевых клетках
Вориконазол	Прогнозирование развития гепатотоксичности при применении вориконазола и определение необходимости проведения терапевтического лекарственного мониторинга (контроль концентрации вориконазола в плазме крови)	<i>CYP2C19*2, CYP2C19*3</i>
Абакавир	Прогнозирование развития синдрома гиперчувствительности при применении абакавира у пациентов с ВИЧ-инфекцией	<i>HLA-B*570</i>
Такролимус	Персонализация дозирования такролимуса для профилактики развития нейротоксичности у пациентов на диализе	<i>CYP3A5*3</i>
Гормональные контрацептивы	Прогнозирование развития тромботических осложнений (ТЭЛА) при применении комбинированных гормональных контрацептивов	<i>G506A гена F5, G20210A гена F2</i>

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

## 12.2. Фармакокинетические полиморфизмы генов

SNP, влияющие на фармакокинетику ЛС, располагаются в генах, кодирующих ферменты биотрансформации (изменения метаболизма ЛС) и транспортеры ЛС (изменение всасывания, распределения и выведения ЛС). SNP характерны как для генов, кодирующих ферменты как I фазы биотрансформации (изоферменты цитохрома P-450, бутирилхолин эстераза, параоксоназа), так и II фазы биотрансформации (N-ацетилтрансфераза, тиопуриметилтрансфераза, оксид гидролаза). При этом в зависимости от того, к каким последствиям для скорости биотрансформации ЛС приводит носительство (гетерозиготное/гомозиготное) или неносительство («дикий» генотип) ОНП, пациенты могут быть разделены на распространенные метаболизаторы, медленные метаболизаторы, сверхактивные или быстрые метаболизаторы.

**Распространенные метаболизаторы** (*extensive metabolism, EM*) — пациенты с нормальной скоростью биотрансформации определенных ЛС, они не несут ОНП по тому или иному гену, кодирующему фермент биотрансформации, то есть они имеют «дикий» генотип. Для этих пациентов применяются стандартные (регламентированные инструкцией) режимы дозирования в виде средних доз.

**Медленные метаболизаторы** (*poor metabolism, PM*) — пациенты со сниженной скоростью биотрансформации определенных ЛС. Обычно такие пациенты являются гомозиготами или гетерозиготами (*intermedium metabolism, IM*) по ОНП того или иного гена, кодирующего фермент биотрансформации. У таких пациентов происходит синтез «дефектного» фермента либо вообще отсутствует соответствующий фермент биотрансформации, в результате чего ферментативная активность снижается (гетерозиготное носительство) или вообще отсутствует (гомозиготное носительство). Это может приводить к разным последствиям в зависимости от особенностей биотрансформации ЛС.

- У медленных метаболизаторов ЛС, которые изначально являются активными соединениями, накапливаются в организме в высоких концентрациях, что приводит к появлению серьезных неблагоприятных побочных реакций, вплоть до интоксикации. Поэтому для медленных метаболизаторов должен быть осуществлен тщательный подбор дозы ЛС, которая должна быть меньше, чем для экстенсивных метаболизаторов. Например, у пациентов гетерозигот и гомозигот по однонуклеотидному полиморфизму *CYP2C9\*3* (генотипы *CYP2C9\*1/\*3* и *CYP2C9\*3/\*3* соответственно) при назначении непрямого антикоагулянта варфарина в средней дозе (5 мг/сут) отмечаются более высокие по сравнению с пациентами с «диким» генотипом (*CYP2C9\*1/\*1*) значения максимальной концентрации, период полувыведения, площадь под фармакокинетической кривой варфарина и, следовательно, чаще отмечается развитие кровотечений. У этой категории пациентов необходимо начинать лечение с дозы варфарина 1,25–2,5 мг/сут.
- Если ЛС является *пролекарством* (то есть действует не само ЛС, а его активный метаболит, образующийся из исходного ЛС в ходе биотрансформации), то у медленных метаболизаторов образуется меньше активного метаболита, что может привести к неэффективности лечения. В таких случаях требуется увеличение дозы или применение других ЛС, биотрансформация которых не зависит от данного фермента. Например, у пациентов — гетерозигот и гомозигот по однонуклеотидному полиморфизму *CYP2C19\*2* (генотипы *CYP2C19\*1/\*2* и *CYP2C19\*2/\*2* соответственно) при назначении антиагреганта клопидогрела в средних дозах (нагрузочная — 300 мг/сут и поддерживающая — 75 мг/сут) отмечаются более низкие по сравнению с пациентами с «диким» генотипом (*CYP2C19\*1/\*1*) концентрации активного метаболита в крови, обладающего антиагрегантным действием. Поэтому у данных пациентов чаще развиваются тромбозы стентов (на фоне применения комбинации ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела), то есть лечение неэффективно. В этом случае рекомендуют или применять клопидогрел в более высоких дозах (нагрузочная — 600 мг/сут, поддерживающая — 150 мг/сут), или использовать другой антиагрегант, метаболизируемый другим изоферментом цитохрома P-450 (тикагрелор или прасугрел).

**Сверхактивные, или быстрые, метаболизаторы** (*ultraextensive metabolism, UM*) — пациенты с повышенной скоростью биотрансформации определенных ЛС. Такое состояние возникает в следующих случаях.

- Носительство ОНП, приводящего к синтезу фермента с высокой активностью. Например, ОНП *CYP2C19\*17*: у гетерозигот (генотип *CYP2C19\*1/\*17*) и гомозигот (генотип *CYP2C19\*17/\*17*) при применении ингибитора  $H^+, K^+$ -АТФазы *омепразола* в стандартных дозах (20–40 мг/сут) отмечаются более низкие концентрации данного ЛС в крови по сравнению с носителями «дикого» генотипа (*CYP2C19\*1/\*1*) и, соответственно, низкая эффективность эрадикационной антихеликобактерной терапии. В этом случае рекомендовано применять *омепразол* в максимально допустимой дозе — 80 мг/сут.
- Наличие дупликаций (удвоений) или даже мультипликаций (умножений) функционально нормальных аллелей (в которых нет ОНП) сопровождается низкими значениями концентраций ЛС. Следствие этого — недостаточная для достижения терапевтического эффекта концентрация в крови ЛС, которые изначально являются активными соединениями. Для сверхактивных метаболизаторов доза ЛС должна быть выше, чем для распространенных метаболизаторов — максимально допустимая доза, или необходимо выбирать ЛС, в метаболизме которого не принимает участие данный изофермент. Например, у носителей дупликаций гена *CYP2D6* при применении  $\beta$ -адреноблокатора *метопролола* отмечаются более низкие по сравнению с носителями дикого генотипа (генотип *CYP2D6\*1/\*1*) значения концентрации в плазме крови, следовательно, и низкая антигипертензивная и антиангинальная эффективность. В этом случае рекомендуется выбрать другой  $\beta$ -адреноблокатор (*бисопролол*), в метаболизме которого *CYP2D6* играет меньшее значение. Наоборот, если ЛС является *пролекарством*, то у сверхактивных метаболизаторов образуется больше активного метаболита, что может привести к развитию неблагоприятных побочных реакций из-за высоких значений концентрации активного метаболита в крови. Таким пациентам доза ЛС, являющегося *пролекарством*, необходима меньше, чем экстенсивным метаболизаторам, или от таких ЛС необходимо в данном случае вообще отказаться. Например, применение

у пациентов с дупликацией гена *CYP2D6* анальгетика *трамадола* (пролекарство) в стандартной дозе приводит к высоким значениям концентрации активного метаболита в крови и более высокой частоте и выраженности неблагоприятных побочных реакций в виде тошноты, дыхательных нарушений. В этих случаях рекомендуется начинать применение *трамадола* с разовой дозы 25 мг, а суточная доза не должна превышать 300 мг/сут, или выбрать альтернативные обезболивающие (нестероидные противовоспалительные препараты).

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

ОНП в генах, кодирующих транспортеры ЛС, также приводят к изменениям фармакокинетики, так как транспортеры участвуют в процессах всасывания, распределения и выведения ЛС. Например, транспортер органических анионов *SLCO1B1* осуществляет захват печенью ряда гиполипидемических ЛС из группы статинов из крови. Гетерозиготное, а особенно гомозиготное носительство SNP *SLCO1B1*\*5 приводит к синтезу транспортера со сниженной активностью, при этом статины хуже захватываются в гепатоцитах, задерживаются в системном кровотоке, вызывая неблагоприятные побочные реакции, прежде всего миопатию, вплоть до рабдомиолиза. Поэтому для снижения риска поражения мускулатуры при выявлении гетерозиготного носительства (генотип *SLCO1B1*\*1/\*5) максимальная доза *симвастатина* и *аторвастатина* не должна превышать 40 мг/сут, а при выявлении гомозиготного носительства (*SLCO1B1*\*1/\*5) — 20 мг/сут.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.3. Фармакодинамические полиморфизмы генов

ОНП в генах, кодирующих молекулы-мишени для ЛС или белки, сопряженные с ними, могут менять фармакодинамику ЛС без влияния на фармакокинетические процессы.

Например, молекулой-мишенью для антагонистов витамина К (варфарин, аценокумарол, фениндион) является субъединица 1 витамин К–эпоксидредуктазного комплекса (*VKORC1*). У носителей генотипа *AA* по ОНП *G1639A* гена *VKORC1* отмечается высокая чувствительность к антагонистам витамина К, поэтому необходима поддерживающая доза варфарина менее 2,5 мг/сут (средняя поддерживающая доза варфарина — 5 мг/сут).

ОНП в генах, кодирующих белки, которые связаны с патогенезом неблагоприятных побочных реакций, могут влиять на фармакодинамику ЛС. Например, у носителей ОНП *G506A* гена лейденской мутации фактора V отмечается более выраженное протромботическое действие комбинированных гормональных контрацептивов (за счет эстрогенного компонента). При гомозиготном носительстве по данному SNP риск развития тромботических осложнений (в частности, ТЭЛА) при применении комбинированных гормональных контрацептивов повышается в 100 раз, при гетерозиготном — в 15 раз. При выявлении данных генетических особенностей следует отказаться от применения комбинированных гормональных контрацептивов.

Еще один пример: у носителей ОНП одного из генов МНС *HLA-B\*5701* (как у гетерозигот, так и у гомозигот) в 50% случаях развивается опасная для жизни аллергическая реакция по типу гиперчувствительности замедленного типа при применении противовирусного препарата из группы ингибиторов ВИЧ-протеиназы *абакавира* у пациентов с ВИЧ-инфекцией. При выявлении у пациента ОНП *HLA-B\*5701* следует отказаться от применения *абакавира*.

Изменяют фармакодинамику таргетных противоопухолевых ЛС ОНП в генах опухолей соматических мутаций, возникающих только в генетическом аппарате опухолевых клеток. Например, ОНП в гене *KRAS* (кодирует белок, сопряженный с рецептором к эпидермальному фактору роста) в опухоли ассоциируются с неэффективностью таких дорогостоящих таргетных противоопухолевых ЛС, как *цетуксимаб* или *панитумумаб*.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.4. Особенности фармакологического ответа на лекарственные средства у пациентов с наследственными заболеваниями

Задачей клинической фармакогенетики является изучение изменений фармакологического ответа при моногенных генетических (наследственных) заболеваниях. Характерные примеры подобных заболеваний — порфирия и врожденные метгемоглобинемии.

Порфирия — наследственная патология, в основе которой лежит повышение активности синтетазы  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты, что сопровождается избыточной продукцией данной кислоты и порфобилиногена.

Клиническая картина обострения заболевания складывается из резких абдоминальных болей, полиневрита, психических нарушений, эпилептических припадков. Некоторые ЛС могут провоцировать обострение порфирии. Механизм этого феномена, по-видимому, связан с повышением активности синтетазы  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты под действием некоторых ЛС, таких как блокаторы медленных кальциевых каналов, барбитураты, сульфаниламиды, эстрогены, гризеофульвин, эналаприл, диклофенак, метоклопрамид. Для этих ЛС порфирия является противопоказанием к назначению, что отражено в инструкциях по медицинскому применению данных ЛС. Поэтому фармакотерапию больных порфирией следует проводить с особой осторожностью, выдавая памятку для пациента с перечнем ЛС, запрещенных для использования.

## Глава 12. Фармакогенетическое тестирование

### 12.5. Основы персонализированной медицины: аспекты внедрения фармакогенетического тестирования

В соответствии со Стратегией научно-технологического развития России до 2035 г. **приоритетами научно-технологического развития** Российской Федерации следует считать те направления, которые позволяют получить научные и научно-технические результаты и создать технологии, являющиеся основой инновационного развития внутреннего рынка продуктов и услуг, устойчивого положения России на внешнем рынке и обеспечат в числе прочих переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения за счет рационального применения лекарственных препаратов с использованием генетических технологий. МЗ РФ была разработана и утверждена Концепция предиктивной, превентивной и персонализированной медицины. В соответствии с этим документом под персонализированной медициной понимают «медицину, в основе которой лежит анализ характеристик, которые можно объективно измерить и которые могут служить в качестве индикатора физиологических и патологических биологических процессов или фармакологических ответов на проводимое лечение, называемых биомаркерами». С этих позиций перспективными с точки зрения персонализации медикаментозной терапии являются биомаркеры, которые позволяют детектировать индивидуальные для каждого пациента особенности клинико-фармакологических подходов, таких как фармакогенетическое тестирование, терапевтический лекарственный мониторинг, определение нанокolicеств лабораторных аналитов и фенотипирование индивидуальной реактивности на введение ЛС. Технологии персонализации медикаментозной терапии на основе биомаркеров являются примером для иллюстрации механизмов имплементации подобного рода наукоемких подходов в клиническую практику. При этом комплексы таких научных исследований от идеи до применения в реальной клинической практике могут быть представлены в виде модели имплементации подходов к персонализации медикаментозной терапии на основе биомаркеров.

Проблемы, которые можно решить с помощью персонализированной медикаментозной терапии (применение как новых, так и уже используемых в клинической практике лекарственных препаратов, прежде всего жизненно важных) на основе биомаркеров у пациентов с социально значимыми заболеваниями, следующие.

- Фармакоэпидемиологические исследования и активный мониторинг неблагоприятных побочных реакций.
- Формирование регистров пациентов с «проблемами» медикаментозной терапии (неблагоприятные лекарственные реакции, неэффективность/резистентность терапии).
- Разработка и клиническая валидация подхода к персонализации медикаментозной терапии на основе биомаркеров.
- Выбор биомаркера — кандидата для включения в алгоритм персонализации медикаментозной терапии.
- Оценка ассоциаций биомаркеров для оценки эффективности и безопасности лекарственных препаратов в клинических исследованиях.
- Разработка алгоритмов персонализации медикаментозной терапии на основе биомаркеров с использованием биоинформатики, а также «проверка» алгоритма на «пригодность» в данной популяции с учетом этнического состава (этнофармакогенетика).
- Клиническая валидация алгоритмов персонализации медикаментозной терапии в рандомизированных сравнительных клинических исследованиях.
- Усиление доказательной базы путем проведения метаанализов и систематических обзоров.
- Клинико-экономическая оценка/анализ разработанных алгоритмов персонализации медикаментозной терапии.
- Публикация результатов исследований в высокорейтинговых научных журналах и патентование.
- Имплементация алгоритмов персонализации медикаментозной терапии в клиническую практику.
- Внесение алгоритмов персонализации медикаментозной терапии в клинические рекомендации, стандарты оказания медицинской помощи, профессиональные стандарты на основе методологии оценки технологий здравоохранения.
- Разработка компьютеризированных систем поддержки принятия решений с заложенным алгоритмом персонализации медикаментозной терапии, интегрированных с МИС МО.
- Интеграция на уровне высшего образования — внесение алгоритмов персонализации медикаментозной терапии в федеральные государственные образовательные стандарты (специалитет, ординатура) с последующей разработкой примерных и рабочих программ дисциплин/модулей (в вариативной части) в образовательных и научных организациях.
- Интеграция в систему непрерывного медицинского образования — внесение алгоритмов в примерные программы профессиональной переподготовки, разработка и реализация дополнительных профессиональных программ, интерактивных образовательных модулей, образовательных мероприятий.
- Создание системы популяризации научных достижений в области персонализированной медицины.

Основу для персонализированной медицины, включая аспекты внедрения фармакогенетического тестирования, предоставляют современные лабораторные технологии, которые позволяют исследовать в том числе генные SNP и белковые и иные лабораторные маркеры на уровне нанокolicеств.

#### **Рекомендуемая литература**

1. Бочков Н.П. Генетические подходы к оценке безопасности и эффективности лекарственных средств // Клинические исследования лекарственных средств в России. 2002. № 2. С. 4–6.

## **Глава 12. Фармакогенетическое тестирование**

2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24.04.2018 № 186 «Об утверждении Концепции предиктивной, превентивной и персонализированной медицины». URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71847662/>.

3. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: учебное пособие / Под ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 245 с.
4. Указ Президента Российской Федерации от 06.06.2019 № 254 «О Стратегии развития здравоохранения в Российской Федерации на период до 2025 года». URL: <http://static.kremlin.ru/media/events/files/ru/c6zjQF82Y5ZKwoEiziMVNZY76MgZS9XI.pdf>.
5. Указ Президента Российской Федерации от 01.12.2016 № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». URL: <http://static.kremlin.ru/media/acts/files/0001201612010007.pdf>.
6. Abou Diwan E., Zeitoun R.I. et al. Implementation and obstacles of pharmacogenetics in clinical practice: An international survey // Br. J. Clin. Pharmacol. 2019. Vol. 85. N. 9. P. 2076–2088.
7. Personalized Medicine Coalition (PMC). URL: <http://www.personalizedmedicinecoalition.org/>.
8. Relling M.V., Evans W.E. Pharmacogenomics in the clinic // Nature. 2015. Vol. 15. N. 526(7573). P. 343–350.
9. Roden D.M., McLeod H.L. et al. Pharmacogenomics // Lancet. 2019. Vol. 10. N. 394(10197). P. 521–532.
10. Wang L., Weinshilboum R. Pharmacogenomics in Practice // Clin. Pharmacol. Ther. 2019. Vol. 106. N. 5. P. 936–938.