



# ЛАБОРАТОРИЯ

ЛАБОРАТОРИЯ

**№4  
2012**

- 20-ЛЕТНИЙ ЮБИЛЕЙ ГРУППЫ КОМПАНИЙ АЛКОР БИО
- ГОРМОНАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И БЕСПЛОДИИ
- ДИАГНОСТИКА МУКОВИСЦИДОЗА В ФОРМАТЕ МИКРОЧИПА
- КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ HBsAg
- СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА

# ЛАБОРАТОРИЯ

ЖУРНАЛ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Выходит один раз в квартал

LABORATORY

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Главный редактор               | профессор В.В. Долгов   |
| Заместитель главного редактора | профессор О.П. Шевченко   |
| Редакционная коллегия          | профессор С.А. Луговская<br>профессор Е.А. Лукина<br>к.м.н. А.В. Селиванова<br>профессор И.П. Шабалова<br>к.б.н. Б.Ф. Щуляк |
| Верстка                        | И.В. Постникова   |
| Издатель                       | Лабдиаг   |

Телефоны:

Главный редактор: (495) 945 8222  
Зам. главного редактора: (499) 190 5341  
Редакция: 8 916 124 7781  
e-mail: kafedra-kdl@list.ru

Распространение журнала:

[sale@labdiag.ru](mailto:sale@labdiag.ru)

## ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ!



Российское научно-практическое общество специалистов лабораторной медицины, кафедра клинической лабораторной диагностики РМАПО, редакция журнала «Лаборатория» и лабораторная общественность выражают свою признательность и поздравляют коллектив Группы компаний Алкор Био с 20-летним юбилеем.

Компания «Алкор Био», созданная 20 лет назад научным сотрудником Д.Г. Полынцевым, в настоящее время безусловный лидер отечественного производства изделий для здравоохранения. Отличительными чертами компании являются высочайший профессиональный уровень в создании современных диагностических средств для лабораторной диагностики, постоянном предложении новых разработок и деятельность по внедрению и реализации выпускаемой продукции. Немного отечественных компаний и производят и предлагают продукцию потребителю; первой среди них является компания «Алкор Био». Компания начиналась с производства одного единственного набора для определения кортизола. Этот набор до настоящего времени остается уникальным на рынке отечественных лабораторных диагностических средств для болезни Кушинга. Сейчас «Алкор Био» — это холдинг из 10 компаний, руководит которым Д.Г. Полынцев; это производство реагентов для ИФА и ПЦР, аллергодиагностики, ВИЧ-инфекции, гепатитов В, С, ToRCH-инфекции, гормональной диагностики, онкомаркеров, контрольных материалов и молекулярно-генетической диагностики, это программный комплекс для расчета риска развития синдрома Дауна «Исида», программа «ИФА-Мастер», это автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei Q.S.». В современной российской действительности очень сложно поддерживать и развивать отечественное производство, гораздо проще перепродавать импортные разработки. Тем ценнее опыт, устремленность в будущее и постоянная нацеленность на собственные научные необходимые практическому здравоохранению разработки.

Мы очень признательны компании «Алкор Био» и ее генеральному директору Д.Г. Полынцеву, что они не позволили упасть науке в России, сохранили высокий потенциал отечественных разработок, сумели в очень сложных как моральных, так и материальных условиях обеспечить производство и реализацию диагностических средств в лабораторную службу и практическое здравоохранение. Желаем Группе компаний Алкор Био дальнейших успехов, процветания, эффективной деятельности на благо клинической лабораторной диагностики в России и всего российского здравоохранения, а сотрудникам компании — здоровья, личного счастья, реализации задумок и надежд, благополучия и высокого жизненного тонуса.

С праздником, с замечательным юбилеем, чтобы Вы отмечали юбилеи еще много-много раз.

# ИНТЕРВЬЮ С ПРЕЗИДЕНТОМ ГРУППЫ КОМПАНИЙ АЛКОР БИО к.б.н. ПОЛЫНЦЕВЫМ ДМИТРИЕМ ГЕНРИХОВИЧЕМ



**Полынцев Д.Г.,**

к.б.н.,  
президент  
Группы компаний  
Алкор Био

**20** лет назад, 4 сен-тября в Санкт-Петербурге была создана компания «Алкор Био». Сейчас это крупнейший на Северо-Западе России биотехнологический

холдинг, который объединяет 10 компаний.

Основные направления деятельности ГК Алкор Био: разработка, производство и реализация наборов для иммуноферментного и молекулярно-генетического анализа; проведение лабораторных исследований для населения; разработка новых клеточных технологий и дальнейшее их внедрение в клиническую практику; банкирование гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови; инвестиции в высокотехнологичные проекты в области биотехнологий.

Ежегодно ГК Алкор Био производит свыше 300 тысяч наборов реагентов более 60 наименований.

ГК Алкор Био — многократный победитель конкурса на присуждение премии Правительства Санкт-Петербурга за лучший инновационный проект, реализуемый в рамках кластера; двукратный победитель конкурса «Лучший экспортёр Санкт-Петербурга»; победитель конкурса на лучшие инновационные проекты в сфере науки и высшего профессионального образования Санкт-Петербурга; участник федеральной гранд-выставки «Лучшие проекты России»; участник национальной программы «Онкология»; Президент Группы компаний Алкор Био Дмитрий Генрихович Полынцев — лауреат независимой бизнес-премии «Шеф года» в номинации «Шеф-Инновация-производство».

— Дмитрий Генрихович, что было на старте компании?

— На старте не было ничего. Начинали не просто с нуля, а с долгов. Компания началась с получения кредита в 700 тысяч рублей под 30% годовых.

— Сколько в 1992 году в компании «Алкор Био» было сотрудников, какие продукты она выпускала?

— Сотрудников на старте было всего двое, я и мой партнер, с которым мы основали компанию. Но партнер находился в Минске, а производство осуществлялось в Петербурге, поэтому производством занимался я один. В те годы я был научным сотрудником Института мозга человека РАН, в 1992 году институт толком не работал, лаборатория, в которой я числился, простоявала. На базе пустующей лаборатории я и занимался производством. Первые наемные сотрудники в «Алкор Био» появились примерно через год после ее создания: в октябре 1993 года у нас начали работать две лаборантки. В те годы мы выпускали всего один единственный продукт: набор для количественного определения кортизола.

— Какие достижения «Алкор Био» вы считаете наиболее значимыми?

— За эти 20 лет в «Алкор Био» произошло очень много важных событий, но ключевыми, на мой взгляд, являются два.

Первое — это то, что нам удалось понять, как собственно устроен рынок, на котором мы присутствовали. Формируют рынок пусть даже не высоко прибыльные, но высоко востребованные наборы реагентов, а не уникальные, но редко используемые продукты. На рынке гормональной диагностики это в основном реагенты для диагностики функции щитовидной железы, далее реагенты для диагностики репродуктивной функции и уже потом все остальное. Интенсивное развитие компании началось именно после того, как стало понятно, какие продукты и в каком количестве востребованы. Второе событие связано с тем, что пришло понимание в необходимости создания мощной производственной базы. С этого момента деньги постоянно инвестировались и продолжают инвестироваться в производство, высококвалифицированный персонал, во все необходимые коммуникации. Мы постоянно приобретаем самое современное оборудование, которое можно купить.

— Что позволяет «Алкор Био» стабильно развиваться?

— К тому, что уже сказал, могу только добавить: это — элементарное упрямство. Всегда было понимание, что создание биотехнологической компании «Алкор Био» — это такой забег на длинную дистанцию, что не получится быстро и легко. Всегда было ощущение, что это будет долго и очень не просто, но что в результате мы обязательно придем к хорошему результату.

— В ГК Алкор Био работает шесть научно-исследовательских лабораторий. Зачем «Алкор Био» инвестирует в научную деятельность?

— Очень не дальновидно монетизировать первый успех и этим ограничиться. Совершенно очевидно, что ГК Алкор Био требуются новые разработки, сопутствующие исследования, требуется создание новых алгоритмов изготовления тех или иных компонентов, необходимы новые подходы к организации производства, прежде всего — автоматизация. Да, все это требует серьезных затрат, но всем этим мы занимались, занимаемся и будем заниматься.

— Какие разработки «Алкор Био», на ваш взгляд, самые важные?

— Самыми важными разработками в предыдущие годы были наборы реагентов для диагностики функции щитовидной железы, всего их у нас — 9 наименований. Производство и реализация этих реагентов дает порядка 50% оборота компании. А в целом, если говорить о реагентах для гормональной диагностики, «Алкор Био» занимает более 40% российского рынка в этом секторе. Но на самом деле тест-системы для гормональной диагностики — это повторение уже известных вещей. Если же говорить о каких-то интересных новых продуктах Группы компаний Алкор Био, то, конечно, это биочип для диагностики муковисцидоза.

— Дмитрий Генрихович, пожалуйста, несколько слов клиентам ГК Алкор Био.

— Большое спасибо, что Вы сохраняете верность продукции компании «Алкор Био». Мы всегда стремились и стремимся к тому, чтобы наша продукция отличалась высоким качеством и отвечала Вашим самым изысканным требованиям. Мы работали и будем продолжать работать для Вас, для нашего отечественного здравоохранения.

# ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

**В.В. Потин, Н.Н. Ткаченко,**

*Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН*



**Потин В.В.,**

**Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН**

**В**о время беременности патология щитовидной железы выявляется у 5-15% женщин. Несмотря на то, что диффузный токсический зоб и гипотиреоз относительно редко встречаются при беременности, каждый случай выявления этих заболеваний у беременных женщин ставит перед врачами комплекс трудно решаемых проблем, поскольку неустранимый тиреотоксикоз и некомпенсированный гипотиреоз оказывают неблагоприятное воздействие на течение беременности, родов, состояние плода и новорожденного.

При своевременном выявлении и коррекции патология щитовидной железы не является противопоказанием к планированию и пролонгированию беременности. Диагностика заболеваний щитовидной железы во время беременности может представлять определенные трудности, что связано с вовлечением комплекса свойственных этому состоянию факторов, таких как возрастание степени связывания тиреоидных гормонов с белками крови; повышение в крови уровня хорионического гонадотропина (ХГ); развитие относительного дефицита йода.

Под влиянием плацентарных эстрогенов (эстриола, эстрона и эстрадиола) уже через несколько недель после зачатия увеличивается уровень тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ) в крови. Содержание ТСГ увеличивается вплоть до середины беременности (18-20 неделя), а затем до родов практически не меняется. Уровень общих Т3 и Т4 возрастает соответственно повышению уровня ТСГ. При этом свободные фракции Т3 и Т4 несколько снижаются и, при достаточном поступлении йода в организм матери, остаются в пределах нормальных значений. Более выраженное снижение уровня свободных тиреоидных гормонов наблюдается у беременных женщин, испытывающих дефицит поступления йода в организм. Снижение св.Т3 и св.Т4 в крови связано, с одной стороны, с повышением уровня ТСГ, а с другой — с образованием в плаценте большого количества 3,5'-дийодиназы (D3), осуществляющей трансформацию Т4 и Т3 в неактивные метаболиты.

У 15-20% женщин в I триместре беременности определяется снижение уровня ТТГ ниже 0,20 мМЕ/л и некоторое повышение уровня св.Т4 в крови [2, 6]. Это связано с неспецифическим действием ХГ. Тиреотропная активность ХГ может быть объяснена некоторым сходством между специфическими  $\beta$ -субъединицами ТТГ и ХГ, а также общностью G-протеина, присоединяющегося к рецептору, что создает основу для перекрестных реакций ХГ с рецептором ТТГ [8]. ХГ стимулирует выработку Т4, что в соответствии с принципом отрицательной обратной связи тормозит секрецию ТТГ гипофизом. У большинства здоровых беременных женщин стимулирующий эффект ХГ на щитовидную железу является коротким и не требует лечения. Другим фактором, оказывающим влияние на щитовидную

железу во время беременности, является относительный дефицит йода, связанный с увеличением почечного клиренса йода за счет усиления клубочковой фильтрации и переходом части йода через плаценту к плоду. В регионах с дефицитом йода у женщин во время беременности может происходить постепенное увеличение размеров щитовидной железы, обусловленное усилением тиреотропной функции гипофиза, при этом уровень ТТГ в крови беременных женщин не выходит за пределы физиологических колебаний.

Таким образом, на фоне беременности происходит изменение функционального статуса щитовидной железы, что необходимо учитывать при гормональном исследовании. В связи с этим для правильной интерпретации тиреоидного статуса беременных женщин следует помнить о следующих моментах:

- Необходимо сочетанное определение уровня ТТГ и св.Т4;
- Определение уровня общего Т3 и общего Т4 неинформативно;
- В первом триместре беременности уровень ТТГ снижен у 20% здоровых женщин при однoplодной беременности и почти в 100% — при многоплодной;
- На поздних сроках беременности уровень св. Т4 бывает снижен при нормальной концентрации ТТГ.

Патология щитовидной железы встречается у беременных достаточно часто, при этом наиболее распространенным состоянием является эутиреоидный зоб (24%), и аутоиммунный тиреоидит (23%). Гипотиреоз и гипертиреоз встречаются значительно реже.

**Диффузный нетоксический зоб (ДНЗ)** — самая распространенная эндокринная патология, представляет собой диффузное увеличение щитовидной железы, не сопровождающееся усилением ее функциональной активности. При ДНЗ превалирует стимулирующее действие ТТГ на щитовидную железу над ингибирующим действием тиреоидных гормонов на гипофиз [4, 5]. Увеличение щитовидной железы — компенсаторная гиперплазия в ответ на низкое поступление йода в организм. Во время беременности у женщин с ДНЗ происходит дальнейшее увеличение щитовидной железы, в среднем на 20-30%. Выраженный дефицит йода может приводить к развитию гипофункции щитовидной железы матери и плода. В эндемичных по зобу местностях увеличена частота рождения детей с врожденным гипотиреозом. Описанную в литературе высокую частоту осложнений беременности при ДНЗ, по-видимому, можно связать с недиагностированным аутоиммунным тиреоидитом и гипотиреозом.

**Лабораторные исследования.** Содержание св.Т4 и ТТГ, как правило, не выходит за пределы физиологических колебаний. На этапах планирования беременности и в первом триместре беременности необходимо провести определение в крови антител к тиреоглобулину и тиреоидной пероксидазе (ТПО) для исключения сопутствующего аутоиммунного тиреоидита. Определение общего и свободного Т3 не информативно.

**Аутоиммунный тиреоидит** чаще встречается у женщин моложе 40 лет и является одной из наиболее частых причин первично-го гипотиреоза. Поражает женщин в 10 раз чаще, чем мужчин. Признаки аутоиммунного тиреоидита — безболезненное уплотнение щитовидной железы, лимфоцитарная инфильтрация, наличие антител к тиреоглобулину и/ или к ТПО. На УЗИ —

гетероэхогенность структуры. Антитела к ТПО выявляются у 15-20% женщин в I триместре беременности. Беременность на фоне аутоиммунного тиреоидита чаще сопровождается невынашиванием, развитием плацентарной недостаточности и гестоза. Антитела к ТПО и тиреоглобулину свободно проходят через плаценту, но не оказывают повреждающего действия на щитовидную железу плода. Антитела к ТПО способны фиксировать С1/3 фракцию комплемента, приводя к образованию патогенных иммунных комплексов. Патогенные иммунные комплексы участвуют в повреждении тканей последа и формировании плацентарной недостаточности.

**Лабораторные исследования.** В крови больных определяются антитела к ТПО и/или тиреоглобулину. Определение антител следует проводить до 16 недель беременности, т.к. затем титр антител заметно снижается из-за нарастающей иммуносупрессии. Содержание св.Т4 и ТТГ в крови зависит от фазы заболевания (гипертиреоидная, гипотиреоидная).

**Дифференциальная диагностика.** Отличить гипертрофическую форму аутоиммунного тиреоидита от ДНЗ позволяют плотность железы, характерная ультразвуковая картина и наличие в крови антител к ТПО и тиреоглобулину. Деструктивный тиреотоксикоз при аутоиммунном тиреоидите отличается от тиреотоксикоза, вызванного диффузным токсическим зобом (ДТЗ), слабой выраженностью клинических проявлений заболевания, отсутствием глазной симптоматики и антител к рецептору ТТГ в крови.

**Послеродовый тиреоидит** является относительно редко диагностируемым заболеванием. По нашим данным, послеродовый тиреоидит поражает щитовидную железу в 5,9% случаев [1]. Послеродовый тиреоидит развивается у трети женщин, в крови которых определялись антитиреоидные антитела до или на ранних стадиях беременности. Послеродовый тиреоидит имеет фазное течение. Через 8-14 недель после родов может развиться транзиторный тиреотоксикоз. При лабораторном исследовании определяется сниженный уровень ТТГ и повышенные значения св.Т4 и св.Т3 (или могут находиться в пределах нормальных значений). Затем, через 5-7 месяцев, наступает фаза гипотиреоза. Клинические проявления этой фазы типичны для гипотиреоза. Однако функциональные нарушения щитовидной железы у больных послеродовым тиреоидитом не всегда проявляются клинически. Они могут проявляться лишь незначительным изменением содержания тиреоидных гормонов в крови, не выходящими за пределы физиологических колебаний. Нередко стертая клиническая картина заболевания делает невозможной диагностику послеродового тиреоидита без целенаправленного лабораторного обследования. Существует распространенное мнение о том, что послеродовый тиреоидит является преходящим заболеванием и, приблизительно, через год после родов функция щитовидной железы полностью нормализуется. Однако, по данным Крихели и соавт. [1] в 19% случаев причиной стойкого первичного гипотиреоза у женщин является послеродовый тиреоидит.

**Гипотиреоз.** Наиболее частой причиной развития гипотиреоза является деструкция щитовидной железы в результате аутоиммунного тиреоидита. Первичный гипотиреоз подразделяется на врожденный и приобретенный. Приобретенный гипотиреоз может быть клинически выраженным — явным и субклиническим, выявляемым с помощью лабораторного обследования. Наступление беременности при явном нелеченном первичном гипотиреозе явление довольно редкое. Субклинический гипотиреоз во время беременности может стать манифестиальным, т.к. потребность в тиреоидных гормонах и йоде после зачатия увеличивается на 25-50% [7]. Беременная женщина с гипотиреозом имеет повышенный риск акушерских осложнений, таких как невынашивание беременности, отслойка плаценты, внутри-

утробная гибель плода. Раннее выявление гипотиреоза и своевременное лечение предотвращает возможные осложнения.

**Лабораторные исследования.** Диагноз гипотиреоза должен быть обязательно подтвержден результатами гормонального обследования. При явном первичном гипотиреозе содержание в крови св.Т4 не превышает 10 пмоль/л, уровень ТТГ в крови адекватно повышен — более 10 мМЕ/л. Как указывалось выше, для ранних сроков беременности в норме характерен более низкий или даже подавленный уровень ТТГ. При наличии аутоиммунного тиреоидита повышенный уровень ТТГ в крови выше 2,0 мМЕ/л на ранних сроках беременности свидетельствует о снижении функциональных резервов щитовидной железы и требует заместительной терапии (3).

Поскольку основным диагностическим критерием субклинического гипотиреоза является уровень ТТГ в крови, необходимо учитывать другие возможные причины, приводящие к повышению уровня ТТГ (например, влияние некоторых фармакологических препаратов, таких как церукал, сульпирид, кордарон).

**Врожденный гипотиреоз.** Врожденный гипотиреоз выявляется с частотой 1:3000-1:4000 новорожденных. Субклиническая форма врожденного гипотиреоза встречается на порядок чаще. Изолированное определение ТТГ в крови новорожденного может приводить к гипердиагностике этого заболевания, т.к. у части детей наблюдается физиологический гипотиреоз новорожденных. Более точным методом оценки состояния щитовидной железы является определение в пуповинной крови св.Т4 и ТТГ с последующим расчетом коэффициента. Коэффициент ТТГ/св.Т4 у здоровых новорожденных колеблется при  $p=0,001$  от 0,27 до 0,72. Значения, выходящие за указанные пределы, будут свидетельствовать о наличии у новорожденного гипотиреоза или гипертиреоза [3].

**Диффузный токсический зоб (ДТЗ)** — аутоиммунное заболевание, центральным звеном патогенеза которого является появление в циркуляции антител к рецептору ТТГ, которые не блокируют, а стимулируют функцию щитовидной железы. Тиреотоксикоз способствует невынашиванию беременности, развитию гестоза, увеличивает частоту мертворождения. В связи с переходом тиреостимулирующих иммуноглобулинов через плацентарный барьер примерно у 2-3% плодов развивается гиперфункция щитовидной железы, сохраняющаяся после родоразрешения (врожденный тиреотоксикоз). Врожденный тиреотоксикоз — транзиторное заболевание, проходящее вместе с исчезновением иммуноглобулинов матери из крови ребенка. Частота встречаемости ДТЗ при беременности невысока.

**Лабораторные исследования.** Диагностика ДТЗ при беременности может вызывать определенные трудности. Как уже отмечалось ранее, во время беременности примерно у 20% женщин в I триместре определяется сниженный уровень ТТГ в крови (ниже 0,20 мМЕ/л). Поэтому для подтверждения диагноза ДТЗ необходимо исследование свободных фракций Т3 и Т4. В крови при ДТЗ выявляются антитела к рецептору ТТГ. При гестационном гипертиреозе в крови определяются сниженный уровень ТТГ и умеренно повышенные значения св.Т3 и св.Т4, однако отсутствуют тиреостимулирующие антитела, а также антитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе.

### Заключение

Учитывая широкое распространение заболеваний щитовидной железы в популяции и роль тиреоидных гормонов в формировании плода, целесообразно определять содержание в крови женщин св.Т4, ТТГ, антител к ТПО и проводить эхографию щитовидной железы на этапе планирования беременности.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН

Н.Д. Фанченко, Т.Ю. Иванец,

ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития России, Москва



**Фанченко Н.Д.,**

ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова»  
Минздрав-  
соцразвития  
России, Москва

но и экономическое значение. Среди супружеских пар детородного возраста бесплодие во многих странах, в том числе и в России, достигает 15%. Женский фактор бесплодия составляет более 50% в структуре бесплодия у супружеских пар. Бесплодие является симптомом самых разнообразных нарушений соматического и психического здоровья и возникает на фоне системных заболеваний (эндокринных, инфекционных, аутоиммунных, психосоматических). К нарушению генеративной функции могут привести резкие изменения массы тела, повреждения ткани гонад в результате лечения онкозаболеваний (радиотерапия, химиотерапия), хронический стресс, интенсивные занятия спортом и т.д. [1, 5, 20].

Соответственно, перед клиницистами, занимающимися восстановлением репродуктивного здоровья с применением современных вспомогательных медицинских технологий (ВРТ), всталая проблема диагностики конкретных причин бесплодия [1, 4]. Это потребовало разработки алгоритма обследования супружеских пар и лабораторного мониторинга процесса терапии [10, 13]. В данной статье основное внимание уделяется современным методам лабораторного обследования женщин, нуждающихся в восстановлении генеративной функции.

## Гормональная регуляция менструального цикла

Нормальный менструальный цикл обеспечивается функционированием трех основных компонентов: аркуатных ядер гипоталамуса, гонадотрофов гипофиза и фолликулов яичников [14, 16, 18].

Аркуатные ядра секрецируют в портальную систему гонадолиберин приблизительно один раз в час. Гонадолиберин, взаимодействуя со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности гонадотрофов, стимулирует синтез, накопление и высвобождение лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. Высвобождение ЛГ и ФСГ из гипофиза происходит в импульсном режиме с частотой приблизительно 1 импульс в час [15, 16].

Гонадотропины в яичниках регулируют рост фолликулов и синтез половых гормонов. Половые гормоны яичника, в свою очередь, оказывают воздействие на гормон-секретирующую систему гипофиза, и тем самым, синхронизируют гормональные профили на протяжении менструального цикла [7]. В начале фолликулиновой фазы цикла вступившие в рост под воздействием ФСГ фолликулы яичника увеличиваются в объ-



Проблемы изучения и коррекции нарушений репродуктивной функции в настоящее время приобретают не только медицинское, социально-демографическое,

демографическое значение. Среди супружеских пар детородного возраста бесплодие во многих странах, в том числе и в России, достигает 15%. Женский фактор бесплодия составляет более 50% в структуре бесплодия у супружеских пар. Бесплодие является симптомом самых разнообразных нарушений соматического и психического здоровья и возникает на фоне системных заболеваний (эндокринных, инфекционных, аутоиммунных, психосоматических). К нарушению генеративной функции могут привести резкие изменения массы тела, повреждения ткани гонад в результате лечения онкозаболеваний (радиотерапия, химиотерапия), хронический стресс, интенсивные занятия спортом и т.д. [1, 5, 20].

Соответственно, перед клиницистами, занимающимися восстановлением репродуктивного здоровья с применением современных вспомогательных медицинских технологий (ВРТ), всталая проблема диагностики конкретных причин бесплодия [1, 4]. Это потребовало разработки алгоритма обследования супружеских пар и лабораторного мониторинга процесса терапии [10, 13]. В данной статье основное внимание уделяется современным методам лабораторного обследования женщин, нуждающихся в восстановлении генеративной функции.

Желтое тело, образующееся на месте разорвавшегося фолликула, играет роль самостоятельной эндокринной железы, основная функция которой заключается в продукции прогестерона, эстрогенов и ингибицина. Максимальная активность желтого тела отмечается в середине лютеиновой фазы. В конце нефертильного цикла желтое тело регрессирует.

Установлено, что помимо ЛГ и ФСГ на функциональную активность гонад могут оказывать влияние пролактин, гормоны коры надпочечников и щитовидной железы.

Для обеспечения нормальной функциональной активности яичников необходим строго определенный уровень пролактина. Высокие концентрации этого гормона могут оказывать ингибирующее воздействие на процессы фолликулогенеза, снижать секреторную активность желтого тела.

Во многих случаях нарушения системы гипоталамус-гипофиз-гонады обусловлены патологией коры надпочечников. Часто наблюдается функциональная гиперанддрогения, при которой повышается секреция дегидроэпиандростерона (ДГЭА), дегидроэпиандростерона-сульфата (ДГЭА-С) и тестостерона (T), при этом нет изменений активности ферментов стероидогенеза [9, 12]. В отличие от функциональной гиперанддрогении врожденная гиперплазия коры надпочечников (адреногенитальный синдром, АГС) возникает вследствие врожденных генетически обусловленных дефектов ферментных систем, обеспечивающих синтез кортизола (F). Если эти дефекты присутствуют, даже у гетерозиготных носителей соответствующих мутаций повышенное содержание андрогенов в крови сопровождается повышением уровня 17-гидроксипрогестерона (17-ОП). Диагностика АГС основана на измерении концентрации 17-ОП в крови после введения кортикотропина (проба с АКТГ) [20].

Нарушения функции щитовидной железы (гипо- и гипертиреоз), также являются факторами, препятствующими реализации репродуктивной функции как у мужчин, так и у женщин. Исходя из приведенных выше закономерностей для установления причин дисфункции яичников необходимо получение данных о концентрации таких гормонов как ЛГ, ФСГ, тиреотропного гормона (ТТГ), пролактина, эстрадиола, тестостерона, гормонов коры надпочечников (кортизол, ДГЭА-С, 17-ОП) и гормонов щитовидной железы (трийодтиронин — Т3, тироксин — Т4 и их свободные формы).

### **Ановуляция и недостаточность лuteиновой фазы**

Для дифференциальной диагностики овуляторных и неовуляторных менструальных циклов достаточно определения концентрации прогестерона в середине лuteиновой фазы цикла. При ановуляторном цикле сохраняются циклические кровотечения (менструации), но не происходит овуляции и формирования желтого тела, в связи с чем концентрация прогестерона значительно ниже нормативной.

Недостаточность лuteиновой фазы (НЛФ) — нарушение функциональной активности желтого тела — наблюдается у половины всех пациенток с дисфункцией яичников и характеризуется более низкой концентрацией прогестерона на 21-23 день менструального цикла по сравнению с таковой при наличии активно функционирующего желтого тела.

Однако, учитывая тот факт, что у здоровых fertильных женщин репродуктивного возраста далеко не все циклы могут быть овуляторными, при обнаружении низкой концентрации прогестерона определение уровня этого гормона необходимо повторить на 21-23 день трех последовательных менструальных циклов. Отсутствие выраженного повышения концентрации прогестерона в середине лuteиновой фазы трех последовательных менструальных циклов свидетельствует о НЛФ или ановуляции в зависимости от уровня прогестерона [5, 6, 11].

Для установления причин НЛФ или отсутствия овуляции необходимо определение концентрации ТТГ, ПРЛ, ЛГ, ФСГ, Е2, Т, F, ДГЭА-С и гормонов щитовидной железы (Т3, Т4) в раннюю (2-3 день) фолликулиновую fazу менструального цикла.

Выявленные и адекватно скорректированные нарушения функции щитовидной железы, как правило, приводят к восстановлению функции яичников и, тем самым, способности к репродукции.

При гиперпролактинемии пациентку направляют на соответствующее обследование для исключения или подтверждения наличия опухоли гипофиза. При проведении адекватной терапии и нормализации уровня пролактина способность к репродукции, как правило, восстанавливается. При нормальном уровне пролактина следует обратить внимание на концентрацию белковых (ЛГ, ФСГ) и стероидных (Е2, Т, F, ДГЭА-С) гормонов.

Высокий уровень гонадотропинов при низком уровне эстрадиола свидетельствует о первичном поражении гонад — ситуации, неблагоприятной для терапии. Наоборот, низкий уровень гонадотропинов указывает на центральный генез заболевания и позволяет предположить эффективность применения заместительной гормональной терапии.

### **Аменорея**

Первым диагностическим тестом при amenорее для исключения беременности или опухолей является определение концентрации хорионического гонадотропина (ХГЧ).

Для выявления нарушений в системе гипоталамус/гипофиз необходимо определение концентрации пролактина, для исключения гиперандрогенеза — тестостерона и ДГЭА-С, а

для исключения патологии тиреоидной системы — концентрации ТТГ и гормонов щитовидной железы. Если результаты этих определений не отличаются от нормативных показателей, целесообразно провести пробу с прогестероном.

При первичной amenорее наиболее важным лабораторным тестом является определение ФСГ, т.к. первичные нарушения функции гонад сопровождаются высоким уровнем ФСГ в крови. Желательно одновременно определять и концентрацию ЛГ, так как повышенный уровень ЛГ позволит подтвердить диагноз, особенно если соотношение концентраций ЛГ/ФСГ <1. Соответственно, при первичной amenорее в крови должно быть низкое содержание эстрадиола.

При вторичной amenорее после исключения беременности необходимо провести те же исследования.

При олигоменорее обследование проводится или по алгоритму обследования регулярного менструального цикла, или по алгоритму обследования amenorei (в зависимости от срока последней менструации).

### **Алгоритм обследования бесплодных пар**

Следует особо отметить, что лабораторное диагностическое обследование пациентов (супружеских пар), нуждающихся для восстановления fertильности в использовании вспомогательных репродуктивных технологий (стимуляция овуляции, искусственная инсеминация, экстракорпоральное оплодотворение) не может ограничиться только обследованием состояния репродуктивной системы. Известно, что бесплодие не заболевание, а состояние, являющееся симптомом многих соматических заболеваний и нарушений регуляторных процессов на уровне гипоталамуса.

Расширенный алгоритм первичного обследования бесплодных пациенток включает определение состояния репродуктивной системы (гонадотропины, эстрадиол, тестостерон), тиреоидной системы, адреналовой системы (кортизол, ДГЭА-С), соматотропной и пролактинсекретирующей функций гипофиза [10]. Кроме того, необходимо проведение исследования инфекционного статуса организма (наличие в крови специфических антител к инфекциям, передающимся половым путем) (см. таблицу 1) [20].

Включение в алгоритм обследования маркера СА-125 обусловлено тем, что стимуляция овуляции сопровождается активацией продукции эстрадиола пролиферативных процессов. Антиген СА-125 является маркером процессов пролиферации [2, 8].

При концентрации СА-125 >20 МЕ/мл вероятность развития синдрома гиперстимуляции яичников достаточно велика.

**Таблица 1. Первичное обследование пациенток с нарушением репродуктивной функции.**

1. Сбор анамнеза, бимануальное и УЗ исследование;
2. Эндокринное обследование в раннюю фолликулиновую fazу: ЛГ, ФСГ, ПРЛ, СТГ, Е2, Т, F, ТТГ, Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub>;
3. При повышенном уровне базального Е2 -определение СА-125, повторное УЗИ репродуктивной системы
4. Эндокринное обследование в середине лuteиновой фазы: Р, Т, F;
5. Инфекционное обследование:
  - 1) Общеклиническое исследование отделяемого мочеполовых органов (мазок);
  - 2) Бактериологический анализ отделяемого мочеполовых органов;
  - 3) Определение антител к ВПГ, ЦМВ, токсоплазме, вирусу краснухи, хламидиям.

При обнаружении отклонений — дополнительное обследование и/или назначение соответствующего лечения. Контрольные исследования после лечения.

## Проблемы, возникающие при интерпретации результатов лабораторных исследований

Чаще всего эти проблемы связаны с ошибками на преаналитическом этапе обследования. Секреция многих гормонов (пролактин, АКТГ, ТТГ, кортизол) имеет суточный (циркадианный) ритм, поэтому взятие крови необходимо осуществлять в определенное время (как правило, в 8-9 часов утра). У молодых мужчин секреция гонадотропинов также имеет суточный и почасовой (цирхоральный) ритм секреции. При однократном взятии крови возможно попадание как на максимальное, так и на минимальное содержание гормона в данной пробе. Нередко при диагностике гипо- и гипергонадотропных состояний содержание гонадотропинов в крови соответствует низким или верхним значениям «нормы», что вызывает недоумение у клиницистов и недоверие к работе лаборатории и качеству тест-систем [3]. В этих случаях во избежание диагностических ошибок необходимы повторные определения концентрации ЛГ и ФСГ или определение содержания гормонов в смешанной пробе, полученной от 2-кратного взятия крови с интервалом 30 минут.

При интерпретации лабораторного обследования необходимо учитывать возможную фармакотерапию пациента. Так, нейролептики, трициклические антидепрессанты снижают уровень ФСГ и увеличивают концентрацию пролактина в сыворотке. Низкий уровень тестостерона может быть связан с терапией эстрогенами, глюкокортикоидами, гипотиреозом. Гиперпродукцию тестостерона вызывают бромокриптин и рак предстательной железы. Высокий уровень эстрадиола может быть обусловлен гипертиреозом. Гиперпролактинемию часто обнаруживают при стрессе, гипотиреозе и хронических заболеваниях почек.

Определенные трудности возникают при интерпретации результатов. Лабораторный мониторинг пациента желательно осуществлять в одной и той же лаборатории для того, чтобы избежать некорректного сравнения результатов, полученных на разном оборудовании, разными методами с использованием различных реагентов. С осторожностью следует интерпретировать пограничные значения, поскольку любой лабораторный метод имеет свою вариабельность. В ряде случаев даже у здоровых людей выявляются показатели, выходящие за пределы референсных значений.

Современные знания закономерностей функционирования репродуктивной системы позволили не только понять механизмы нарушений генеративного процесса, но и разработать адекватные лабораторные методы их диагностики и мониторинга. Более того, во многих случаях постановка правильного диагноза невозможна без соответствующих лабораторных исследований. Современные технологии предоставляют клиницистам спектр диагностических методов, позволяющих достоверно и быстро решать проблемы выбора эффективной терапии. Затруднения, возникающие при интерпретации результатов исследований, чаще всего связаны с преаналитическим этапом анализа и с упрощенной трактовкой референсных (нормативных) пределов. В настоящее время лабораторная служба практически на всей территории страны имеет возможности для своевременного и достоверного выявления нарушений генеративной функции и мониторинга терапии.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НА ТРОМБОФИЛИЮ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Т.В. Вавилова,<sup>1,2</sup> О.В. Сироткина,<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,

<sup>2</sup> Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России,

<sup>3</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова



**Вавилова Т.В.,**

Северо-Западный государственный  
медицинский университет  
им. И.И. Мечникова,  
Всероссийский центр экстренной  
и радиационной медицины  
им. А.М. Никифорова МЧС России



реди сердечно-сосудистой патологии важное место отводится венозным тромбоэмбolicким осложнениям (ВТЭО), которые объединяют несколько клинических форм: тромбоз глубоких вен (ТГВ), подкожных вен (тромбофлебит) и тромбоэмболию лёгочных артерий (ТЭЛА). ВТЭО являются мультифакторными заболеваниями

[1]. Риск их развития связан с комплексом наследственных и приобретенных причин. К сожалению, отчетливых статистических данных, популяционных исследований или регистров в Российской Федерации не существует. Международные исследования и регистры определяют ежегодную частоту возникновения ВТЭО, как 50-70 новых случаев заболевания на 100 000 населения. По другим данным в Северной Америке и Европе возникает 100-160 случаев ТГВ на 100 000 населения в год, 20 случаев симптомной и нефатальной ТЭЛА и 50 случаев фатальной лёгочной эмболии, найденной на секции [2].

Прогресс в развитии патофизиологии, молекулярной биологии, фармакокинетики и фармакогенетики позволяет говорить о необходимости персонализированного подхода к диагностике и терапии во многих областях медицины, в том числе — ВТЭО [3]. Разумное сочетание применения обобщенных рекомендаций и индивидуальной оценки состояния больного, особенностей его метаболизма, восприятия влияния окружающей среды и индивидуальных факторов риска дает оптимальный эффект

лечения и профилактики. В том случае, если активность факторов, составляющих плазменный гемостаз, повышается, а антикоагулянтная способность системы падает, возникает патологическое тромбообразование в неповрежденных сосудах или безудержный рост тромбов при травматизации сосудистой стенки.

Влияние наследственной предрасположенности к тромбозам активно изучается с конца XX века после открытий R.M. Bertina и B. Dahlbach [4, 5]. Для некоторых мутаций вклад в формирование такой предрасположенности признан несомненным, в отношении других позиций мнения экспертов расходятся, а исследования продолжаются.

Современные представления позволяют выделить группы факторов риска, которые ведут к формированию ВТЭО и могут быть определены как приобретенные и врожденные. Классификация факторов риска, которую приводят ведущие специалисты в области изучения венозных тромбозов F.R. Rosendaal и P.H. Reitsma [6], представлена в *Таблице 1*. Присутствие одного из указанных факторов или их сочетания формирует индивидуальный риск тромбоза и может приводить как к идиопатическим (без видимой причины), так и провоцированным ВТЭО.

Склонность к повышенному тромбообразованию и развитию ВТЭО получила название **тромбофилии**. Причем первоначально этот термин принадлежал именно опасности ВТЭО у лиц с наследственными причинами. Систематический генетический поиск у больных с ТГВ у 25-50% выявляет те или иные генетически обусловленные нарушения факторов свертывающей системы крови. Однако, не все мутации и полиморфизмы строго предрасполагают к ВТЭО. Стойкие изменения генотипа (мутации) встречаются относительно редко — не более чем у 1-5% населения; широко распространенные варианты гена (полиморфизмы) — до 50% населения и необязательно проявляются фенотипически. Гетерозиготное носительство измененного аллеля, как правило, имеет меньшее клиническое значение, так как неповрежденный аллель (аллель «дикого» типа) не дает в полной мере развиться фенотипическим проявлениям данного генотипа.

Под термином наследственная или генетическая тромбофилия понимаются нарушения в генах, кодирующих компоненты системы гемостаза, строго ассоциированные с повышением риска развития ВТЭО. Требуются серьезные исследования и доказательная база степени риска носительства дефекта для того, чтобы причислить его к наследственной тромбофилии. Именно поэтому количество таких генетических дефектов на сегодняшний день строго ограничено следующими [7]:

- 1. Дефицит естественных антикоагулянтов.** Первые описания «семейных» тромбозов относятся к 1965-1984 годам и связаны с обнаружением дефицита антикоагулянтных компонентов плазмы — антитромбина, протеина С и протеина S. К этому же времени относится и первое применение термина «наследственная тромбофилия», т.е. первичная генетически обусловленная склонность к тромбозам, хотя «эссенциальная

**Таблица 1. Факторы риска тромбозов (по F.R. Rosendaal и P.H. Reitsma [6]).**

| Приобретенные факторы риска   | Врожденные факторы риска  | Смешанные (или неизвестные по принадлежности)  |
|---|---|--|
| Иммобилизация<br>Гипсовая повязка<br>Травма<br>Большие хирургические вмешательства<br>Ортопедические операции<br>Злокачественные новообразования<br>Оральные контрацептивы<br>Гормональная заместительная терапия<br>Антифосфолипидный синдром<br>Миелопролиферативные заболевания<br>Эссенциальная полицитемия<br>Наличие центрального венозного катетера<br>Возраст<br>Ожирение | Дефицит антитромбина<br>Дефицит протеина C<br>Дефицит протеина S<br>Фактор V Лейден<br>Фактор II 20210A<br>Дисфибриногенемия<br>Фактор XIII 34val<br>Фибриноген (G) 10034T<br>Группа крови не O(II) | Высокий уровень факторов:<br>Фактора VIII<br>Фактора IX<br>Фактора XI<br>Фактора I (фибриногена)<br>TAFI<br>Низкий уровень TFPI<br>aPC-резистентность<br>Гипергомоцистеинемия<br>Высокий уровень ингибитора протеина C (PAI-3) |

TAFI — активируемый тромбином ингибитор фибринолиза;

TFPI — ингибитор пути тканевого фактора;

PAI-3 — ингибитор активатора плазминогена 3 типа.

тромбофилия» описана на примере 5 случаев Nygaard KK, Brown GE в 1937 году [8]. В 1965 г. O. Egeberg описал семью с наследственным дефицитом антитромбина [9]. Частота встречаемости этих нарушений в популяции очень мала — менее 1%. Наследственный дефицит антитромбина обнаруживается у 1 на 5 000 населения [7]. Спектр мутаций, вызывающих дефицит антитромбина, протеина C или протеина S, очень широк; только для протеина C их найдено более 160 [10]. Поэтому методом выявления дефицита естественных антикоагулянтов являются функциональные исследования их активности, но не генетический анализ.

- 2. Мутация фактора V — фактор V Лейден [11, 12].** Мутация в гене фактора V вносит существенный вклад в формирование наследственной предрасположенности к тромбозам и связана с развитием резистентности к активированному протеину C. Мутация описана в г. Лейден в 1994 году R.M. Bertina et al. и названа лейденской. В результате генетической поломки происходит замена аминокислоты аргинина на глутамин в 506 положении последовательности белка, что нарушает сайт расщепления фактора V активированным протеином C. Скорость инактивации фактора V Лейден протеином C в 10 раз медленнее, чем у нормального фактора V, что проявляется гиперкоагуляционным состоянием и при определенных условиях может способствовать развитию тромбоза. Частота встречаемости данной мутации в европейской популяции колеблется от 2% до 7%, однако крайне редка в странах Азии и Африки [13]. Относительный риск развития ТГВ у гетерозиготных носителей фактора V Лейден возрастает в 5 раз, а у гомозиготных — в 50 раз. При этом большое значение имеют клинические проявления такого генетического дефекта и семейный анамнез [14]. У лиц со строгой семейной историей тромбозов частота встречаемости ВТЭО до возраста 65 лет у носителей фактора V Лейден составляет 50%; в то время как в отсутствие семейной истории при наличии такого же генетического дефекта риск составляет лишь 25% [15].

- 3. Протромбин 20210A [16].** Мутация в гене протромбина, связанная с заменой нуклеотида G на A в 20210 позиции 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) гена протромбина, ведет к увеличению синтеза белка и повышению уровня протромбина плазмы. Частота мутации протромбина 20210A составляет 1-4% в популяции в целом, но частота встречаемости среди

больных с венозными тромбозами может достигать 20% [17]. Риск развития тромботических осложнений особенно высок при сочетании мутаций протромбина 20210A с фактором V Лейден, увеличиваясь у компаунд-гетерозигот в 20 раз по сравнению с лицами, не имеющими данных генетических нарушений. Кроме того, у пациентов с комбинацией лейденской мутации и мутации в гене протромбина тромбозы развиваются в более молодом возрасте и имеют атипичную локализацию.

Представленные выше наследственные тромбофилические дефекты отмечены в последних рекомендациях по антитромботической терапии [18]. Они же учтены при ведении женщин в период беременности и вспомогательных репродуктивных процедур. За десятилетия, прошедшие с момента открытий первых тромбофилических наследуемых дефектов, было исследовано значение полиморфизмов генов ферментов фолатного цикла, фибриногена, ингибитора активатора плазминогена, тромбоцитарных рецепторов и многих других на риски патологического тромбообразования. Все они были отнесены к слабым генетическим факторам, влияющим на предрасположенность к тромбозам, которые вносят вклад в этиологию ВТЭО у конкретного больного либо при ярком фенотипическом проявлении (например, повышение уровня гомоцистеина на 50% и более), либо при сочетании с активными внешними средовыми воздействиями [19]. Большая часть выявленных полиморфизмов влияет на артериальное тромбообразование, развитие инфаркта миокарда и ишемического инсульта, но не на ВТЭО.

Выбор программы лабораторного обследования и отдельных тестов для выявления тромбофилии — непростая клиническая задача. В любом случае диагностика начинается с тщательного сбора анамнеза и осмотра больного. Важно обратить внимание на анамнез данного заболевания, анамнез жизни, включая гинекологический у женщин, и на семейную историю ранних тромбозов и эмболий, инфарктов и ишемических инсультов. Молекулярно-генетический скрининг на тромбофилию в настоящее время не считается целесообразным [20]. Большинство экспертов поддерживают идею исследования на наследственную тромбофилию только выборочно в отдельных группах больных и только по 2 генетическим позициям с дополнительным включением 3-х функциональных исследований — антитромбин, протеин С и протеин S [21]. Показания к такому тестированию разработаны профессиональными сообществами — Американской Ассоциацией патологов (CAP) и Американской Ассоциацией Медицинских Генетиков (AMCG) [22]. Анализу должны подвергаться следующие группы [20]:

- имеющие повторные тромбозы и эмболии в анамнезе,
- при первом эпизоде тромбоза или эмболии лица в возрасте моложе 50 лет,
- пациенты с необычной анатомической локализацией тромбоза (вены верхних конечностей, селезеночная вена и др.),
- случаи, когда первый эпизод тромбоза или эмболии связан с беременностью, родами, приемом оральных контрацептивов, гормональной заместительной терапией
- женщины с самопроизвольным прерыванием беременности на втором или третьем триместре неясной этиологии.

На практике только 51%-65% больных, имеющих соответствующие показания, подвергаются данному исследованию [21], и наоборот, часть обследованных соответствующих показаний не имеют.

В настоящее время общепринятым является мнение, что знание о наличии тромбофилического дефекта не должно влиять на тактику и длительность антикоагулянтной терапии тромбоза [23]. Это мнение основывается на том факте, что

гетерозиготное носительство мутации фактора V (Leiden) или фактора II (G20210A) не увеличивает достоверно риск повторных эпизодов. Если в отношении дефицита естественных антикоагулянтов, особенно антитромбина, на вопрос об опасности повторных эпизодов ответ положительный — да, опасность высока, то мутации фактора V и фактора II продолжают изучаться. В мета-анализе, предпринятом в 2006 году (10 исследований для фактора V Лейден и 9 исследований для фактора II, всего 6 007 пациентов), было показано, что гетерозиготное носительство лейденской мутации встречается у лиц с первым эпизодом тромбоза в 21,4% и увеличивает риск повторного тромбоза в 1,41 раза [22]. Для гетерозиготной мутации фактора II эти значения составили 9,7% и 1,72, соответственно, демонстрируя более редкую встречаемость, но большую опасность повтора. Необходимость продленной терапии после первого эпизода остается неясной. Решение принимается индивидуально с учетом всех факторов, имеющихся у данного пациента, и пересматривается каждые 6 месяцев на фоне продолжающейся терапии.

Эти рассуждения не касаются гомозиготных носителей мутаций фактора V Лейден и фактора II или сочетания двух дефектов в гетерозиготном варианте. Наличие гомозиготной ситуации или компаунд-гетерозигот существенно ухудшает ситуацию и требует пролонгированной профилактики. При выявлении таких факторов терапия непрямыми антикоагулянтами проводится неопределенно долго (пожизненно) [18]. Однако, в настоящее время ведение больных меняется на основании генетического тестирования только в 20% случаев [22].

Выявление генетических дефектов у родственников пациента, не имевших в анамнезе тромбозов (бессимптомные родственники первой линии), не влечет за собой обязательной фармакологической профилактики. Рекомендуется избегать ситуаций риска, а при их возникновении (операция, травма, беременность и др.) вопрос о профилактике решается индивидуально и в пользу самых активных действий. Женщинам этой группы не рекомендуется прием эстроген-содержащих препаратов, а первая беременность должна быть обязательно выношена.

Семейное тестирование рассматривается как одна из важнейших проблем в генетическом исследовании на тромбофилию. Потенциальная польза выявления генетических дефектов у больного с тромбозом состоит в предупреждении заболевания у предрасположенных, но не имевших тромботических эпизодов членов семьи. Однако серьезных проспективных наблюдений в этом отношении нет, как нет и соответствующих рекомендаций по ведению таких асимптомных родственников.

## Заключение

Диагноз наследственной тромбофилии должен основываться на анамнестических и лабораторных данных, которые включают комплекс функциональных и генетических лабораторных исследований с выявлением строго предрасполагающих факторов — дефицита антитромбина, протеинов C и S, мутации фактора V Лейден и мутации гена протромбина G20210A. Такой подход обоснован доказательной базой и является наиболее рациональным в определении тактики ведения больного и консультировании членов его семьи.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПО CYP2D6 И CYP2C19: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Д.А. Сычев, Н.А. Миронова, кафедра клинической фармакологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова



**Сычев Д.А.,**

д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, зав. отделом персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии НЦ ЭСМП Министерства здравоохранения РФ



**Клиническая фармакогенетика** — раздел клинической фармакологии и клинической генетики, изучающий генетические особенности пациента, влияющие на индивидуальный фармакологический ответ (эффективность и безопасность применения лекарственных средств (ЛС) у пациентов) [1].

*Генетические особенности генома пациента, влияющие на фармакологический ответ*, представляют собой однонуклеотидные полиморфизмы в генах (замены, вставки, делеции), кодирующие белки, участвующие в фармакокинетике и/или фармакодинамике ЛС [2]. Однонуклеотидные полиморфизмы в том или ином гене, передаваемые из поколения в поколение, могут определять генетический вклад в индивидуальный фармакологический ответ [2-4], в частности:

- развитие неблагоприятной побочной реакции;
- резистентность или вообще отсутствие эффекта при применении ЛС.

Однонуклеотидные полиморфизмы могут быть в генах, кодирующих белки, участвующие в следующих процессах [1, 2, 3, 4, 5]:

- фармакокинетика (т.н. «**фармакокинетические полиморфизмы**»):
  - ферменты биотрансформации (I или II фазы реакций), принимающие участие в метаболизме ЛС;
  - транспортеры ЛС (P-гликопротеин, транспортеры органических анионов или органических катионов).
- фармакодинамика (т.н. «**фармакодинамические полиморфизмы**»):
  - молекулы-мишени для ЛС (рецепторы, ферменты, ионные каналы)
  - белки, сопряженные с молекулами-мишениями ЛС (G-белки) или участвующие в патогенезе заболевания, при котором применяется ЛС (NOS — ген, кодирующий NO-синтазу), или неблагоприятной побочной реакции (гены главного комплекса гистосовместимости HLA).

Фармакогенетический тест это выявление конкретных генотипов по однонуклеотидным полиморфизмам (*генотипирование пациентов*). В основе таких тестов лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР) в разных вариантах. При этом в качестве источника ДНК используется или кровь больного, или соскоб bukkального эпителия, или слюна.

Врач — клинический фармаколог, интерпретируя результаты фармакогенетического теста, должен формулировать рекомендации по выбору ЛС и его режима дозирования для конкретного пациента. Фармакогенетическое тестирование рассматривается как инструмент *персонализированной (персонифицированной) медицины*. В реальной клинической практике фармакогенетическое тестирование показано в следующих ситуациях [3, 5]:

- применение ЛС с большим спектром и значительной выраженностью неблагоприятных побочных реакций, как правило, с узким терапевтическим диапазоном, которое используется длительно (часто пожизненно);
- применение ЛС с большим межиндивидуальным разбросом в эффективности;
- у пациентов с высоким риском развития неблагоприятных побочных реакций и / или не эффективности лечения, в т.ч. с наследственным анамнезом по конкретным ЛС.

## Полиморфизм генов CYP2D6 и CYP2C19: клинико-фармакологические аспекты

*CYP2D6* определяет метаболизм около 20% известных ЛС (ЛС-субстраты *CYP2D6*), в том числе антидепрессанты, антиаритмические, некоторые противоопухолевые (тамоксифен), противорвотные ЛС, блокаторы Н1-гистаминовых рецепторов. *CYP2C19* определяет метаболизм 8,3% известных ЛС, в т.ч. антидепрессанты ЛС, антидепрессанты, ингибиторы протонного насоса, кдопидогрел. И ген *CYP2D6* и ген *CYP2C19* высоко полиморфны [5]. В зависимости от того, к каким последствиям для скорости биотрансформации ЛС приводит носительство (гетерозиготное/гомозиготное) или не носительство («дикий» генотип) однонуклеотидного полиморфизма генов *CYP2D6* и *CYP2C19*, пациенты делятся на следующие группы [5]:

- Распространенные метаболизаторы по *CYP2D6* или *CYP2C19* (*extensive metabolism, EM*) — пациенты с нормальной скоростью биотрансформации ЛС, т.к. не несут однонуклеотидных полиморфизмов по генам *CYP2D6* или *CYP2C19* т.е. они имеют «дикие» генотипы: *CYP2D6\*1/\*1* или *CYP2C19\*1/\*1*. Для этих пациентов применяются стандартные режимы дозирования средних доз ЛС [2, 5].
- Медленные метаболизаторы по *CYP2D6* или *CYP2C19* (*poor metabolism, PM*) — пациенты со сниженной скоростью биотрансформации ЛС. Обычно такие пациенты являются гомозиготами или гетерозиготами (*intermediate metabolism, IM*) по однонуклеотидным полиморфизмам гена *CYP2D6* (2549delA, 1846G>A, делеция гена, 1707delT, 2935A>C, 1758G>T) или *CYP2C19* (681G/A). У таких пациентов происходит синтез «дефектного» фермента со сниженной активностью [2, 5, 6, 7]. Это может приводить к следующим особенностям биотрансформации ЛС:
  - У медленных метаболизаторов по *CYP2D6* или *CYP2C19* ЛС, которые изначально являются активными соединениями, накапливаются в организме в высоких концентрациях.

рациях. У этой категории пациентов применение бета-адреноблокаторов, нейролептиков и антидепрессантов в стандартных дозах характеризуется плохой переносимостью [8, 9, 10]. Поэтому для медленных метаболизаторов нужно тщательно подбирать дозы ЛС, которые должны быть меньше, чем для экстенсивных метаболизаторов.

- Если ЛС-субстрат *CYP2D6* или *CYP2C19* является *пролекарством* (т.е. действует не само ЛС, а его активный метаболит, то образуется меньше активного метаболита, что может привести к неэффективности лечения [2, 7]. Например, у пациентов гетерозигот и гомозигот по однокулеотидному полиморфизму 681G/A гена *CYP2C19* (*CYP2C19\*2*) при назначении антиагреганта клопидогрела в средних дозах (нагрузочная — 300 мг/сутки и поддерживающая — 75 мг/сутки) отмечаются более низкие по сравнению с пациентами с «диким» генотипом (*CYP2C19\*1/\*1*) концентрации активного метаболита в крови, обладающего антиагрегантным действием [11, 12]. В результате у этих пациентов чаще развиваются тромбозы на фоне применения комбинации ацетилсалicyловой кислоты и клопидогрела [11, 12].
- Сверхактивные или быстрые метаболизаторы по *CYP2D6* или *CYP2C19* (*ultraextensive metabolism, UM*) встречаются при носительстве дупликаций или даже мультиплексий функционально нормальных аллелей *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*2* или носительстве полиморфного маркера -806C/T гена *CYP2C19* (*CYP2C19\*17*). У этой категории пациентов регистрируют низкую недостаточную для достижения терапевтического эффекта концентрации ЛС, которые изначально являются активными соединениями [2, 7]. Для сверхактивных метаболизаторов доза ЛС-субстрата *CYP2D6* или *CYP2C19* должна быть выше, чем для распространенных метаболизаторов. Например, у носителей дупликаций гена *CYP2D6* при применении бета-адреноблокатора метопролола отмечаются низкие концентрации в плазме крови, и низкая антигипертензивная и антагонистическая эффективность ЛС [7]. У этой категории пациентов терапия трициклическими антидепрессантами и антидепрессантами и антидепрессантами в стандартных дозах малоэффективна. У гетерозиготных или гомозиготных носителей генотипа ТТ по полиморфному маркеру -806C/T гена *CYP2C19\*19* (*CYP2C19\*17*) применение ингибиторов протонного насоса (особенно, омепразола) в стандартных дозах вызывает незначительный антисекреторный эффект. Если ЛС является пролекарством, то у сверхактивных метаболизаторов образуется больше активного метаболита. Таким пациентам доза пролекарства необходима меньше или от ЛС необходимо вообще отказаться [2, 7]. Например, применение у пациентов с дупликацией гена *CYP2D6* анальгетика трамадола (является пролекарством) приводит к высоким значениям концентрации активного метаболита в крови и более высокой частоте

и выраженности побочных реакций - тошноте, дыхательным нарушениям [13, 14, 15]. В тоже время у гетерозиготных или гомозиготных носителей генотипа ТТ по полиморфному маркеру -806C/T гена *CYP2C19\*19* (*CYP2C19\*17*) отмечается повышение риска развития кровотечений при применении клопидогрела в стандартных дозах [16].

### Клиническая интерпретация результатов фармакогенетического тестирования по *CYP2D6* и *CYP2C19*

1. Персонализация выбора антидепрессантов по результатам фармакогенетического тестирования по *CYP2D6* и *CYP2C19* осуществляется в соответствии с алгоритмом, представленном на Рисунке 1 [10, 17, 18].
2. Персонализация выбора нейролептиков по результатам фармакогенетического тестирования по *CYP2D6* и *CYP2C19* осуществляется в соответствии с алгоритмом, представленном на Рисунке 2 [10, 17].
3. Персонализация выбора бета-адреноблокаторов по результатам фармакогенетического тестирования по *CYP2D6* [6, 7]:
  - При выявлении генотипа *CYP2D6\*1/\*1* метопролол используют в дозах, регламентированных в инструкции по медицинскому применению.
  - При выявлении гомозиготного носительства полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T гена *CYP2D6*:
    - у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) максимальная доза метопролола не должна превышать 50 мг/сут, либо следует выбрать бисопролол или карведилол;
    - у пациентов с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией (АГ) следует выбрать другие бета-адреноблокаторы (атенолол, бисопролол) из-за очень высокого риска развития НЛР метопролола (в первую очередь — брадикардия).



**Рисунок 1.** Алгоритм персонализированного выбора антидепрессантов (АД) по результатам фармакогенетического тестирования по *CYP2D6* и *CYP2C19* (10, 17).

PM — гомозиготные носители полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T по *CYP2D6* или полиморфного маркера 681G/A гена *CYP2C19*. IM — гетерозиготные носители полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T по *CYP2D6* или полиморфного маркера 681G/A гена *CYP2C19*. EM — носители «диких» генотипов по *CYP2D6* и *CYP2C19*. UM — носители дупликации функциональных аллелей гена *CYP2D6* или полиморфного маркера -806C/T гена *CYP2C19*.

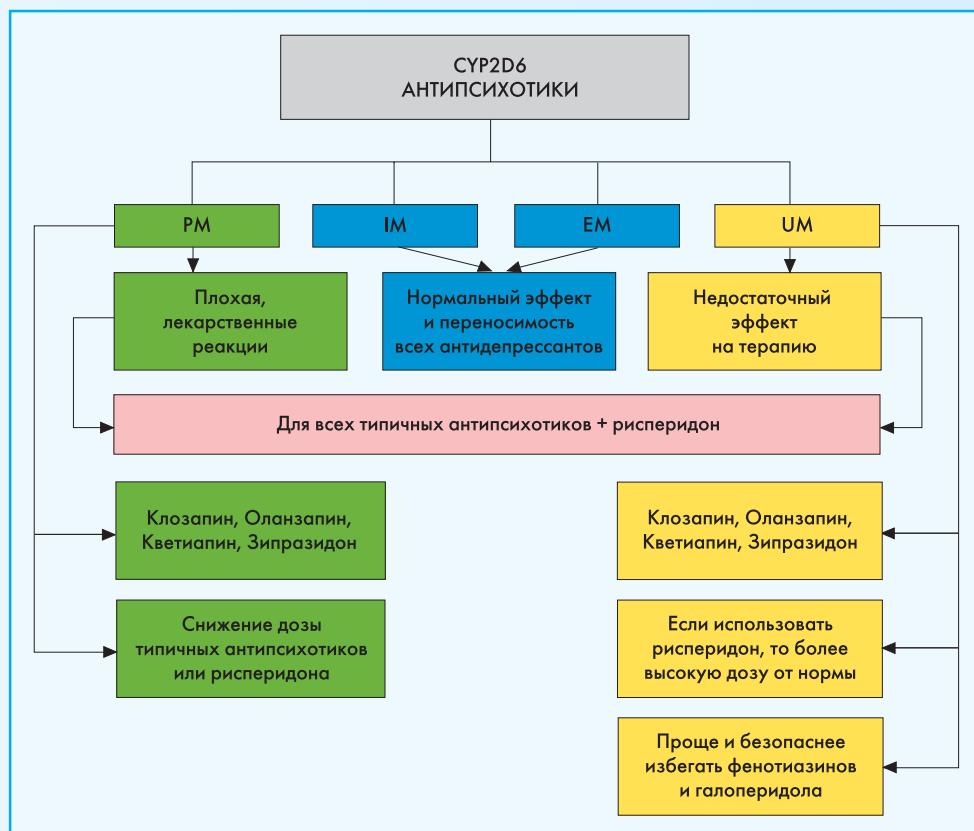
- При выявлении гетерозиготного носительства полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T гена CYP2D6:
  - у пациентов с ХСН максимальная доза метопролола не должна превышать 100 мг/сутки, либо следует выбрать бисопролол или карведилол.

- у пациентов с ИБС, АГ следует выбирать другие бетаадреноблокаторы (атенолол, бисопролол) из-за высокого риска развития НЛР метопролола (и в первую очередь — брадикардии).
- 4. Персонализация выбора обезболивающих средств на основе результатов фармакогенетического тестирования по CYP2D6:**

- При выявлении генотипа CYP2D6\*1/\*1 трамадол используется в дозах, регламентированных в инструкции по медицинскому применению.
- При выявлении гетерозиготного или гомозиготного носительства полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена, 1707delT, 2935A>C, 1758G>T гена CYP2D6 не рекомендуется применение трамадола, следует выбрать нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), ацетаминофен или морфин (при выраженнем болевом синдроме).
- При выявлении дупликации функциональных аллелей CYP2D6\*1, CYP2D6\*2 следует применять трамадол внутрь, начиная с разовой дозы 25 мг (суточная доза не должна превышать 300 мг/сутки) или внутримышечно, начиная с дозы 25 мг 2 раза в сутки (суточная доза не должна превышать 300 мг/сутки), или следует выбрать альтернативные обезболивающие ЛС: НПВС, ацетаминофен, морфин (при выраженнем болевом синдроме).

**5. Персонализация выбора ингибиторов протонного насоса на основе результатов фармакогенетического тестирования по CYP2C19 [6, 19, 20, 21, 22]:**

- При выявлении генотипа CYP2C19\*1/\*1 рекомендуется назначить омепразол в дозе 40 мг/сутки или эзомепразол в дозе 20 мг/сутки, или лансопразол в дозе 60 мг/сутки.
- При выявлении гетерозиготного носительства по полиморфному маркеру 681G/A гена CYP2C19 рекомендуется назначить омепразол в дозе 40 мг/сутки или лансопразол в дозе 30 мг/сутки.
- При выявлении гомозиготного носительства по полиморфному маркеру 681G/A гена CYP2C19 рекомендуется назначать омепразол в дозе 20 мг/сутки или лансопразол в дозе 30 мг/сутки.
- При выявлении гомозиготного или гетерозиготного носительства по полиморфному маркеру -806C/T гена CYP2C19 рекомендуется назначить омепразол в дозе 80 мг/сутки или эзомепразол в дозе 40 мг/сутки.



**Рисунок 2. Алгоритм персонализированного выбора нейролептиков (антипсихотиков) по результатам фармакогенетического тестирования по CYP2D6 (10, 17).**

PM — гомозиготные носители полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T гена CYP2D6. IM — гетерозиготные носители полиморфных маркеров 2549delA, 1846G>A, делеция гена 1707delT, 2935A>C, 1758G>T по CYP2D6 9. EM — носители «диких» генотипов по CYP2D6. UM — носители дупликации функциональных аллелей гена CYP2D6.

**6. Персонализация выбора антиагрегантов на основе результатов фармакогенетического тестирования по CYP2C19 [6, 11, 12, 16]:**

- При выявлении генотипа CYP2C19\*1/\*1 клопидогрел применяется в дозах, регламентированных в инструкции по медицинскому применению: нагрузочная доза- 300 мг, далее по 75 мг/сутки.
- При выявлении гетерозиготного или гомозиготного носительства по полиморфному маркеру 681G/A гена CYP2C19 рекомендуется назначить клопидогрел в нагрузочной дозе 600 мг (в первый день), далее по 150 мг/сутки. Альтернатива для данной категории пациентов — выбор другого антиагреганта, например тикагрелора.
- При выявлении гомозиготного или гетерозиготного носительства по полиморфному маркеру -806C/T гена CYP2C19 рекомендуется выбор другого антиагреганта, например тикагрелора.

Таким образом, генотипирование по CYP2D6 и CYP2C19 в клинической практике может способствовать персонализации выбора широкого круга лекарственных средств и их режимов дозирования, что повысит эффективность и безопасность лечения пациентов, однако ключевым моментом должна быть обоснованная клиническая интерпретация результатов фармакогенетического тестирования.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В.Е. Веденников, к.б.н., Лаборатория молекулярной диагностики ООО «Вега» ГК «Алкор Био»



Чувствительность полимеразной цепной реакции (ПЦР) в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из клинического материала. Недостаток информации об особенностях различных методов пробоподготовки и отсутствие утвержденных требований к наборам для экстракции нуклеиновых кислот (НК) может привести к затруднениям при выборе методики для решения конкретной задачи.

В настоящее время для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний широко используется метод ПЦР. Одним из ключевых моментов эффективной молекулярно-генетической диагностики является этап пробоподготовки. Соблюдение выработанных годами клинико-диагностической практики требований к каждой процедуре этого этапа крайне необходимо для получения достоверных результатов. Чувствительность метода ПЦР в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из клинического материала. На данный момент наиболее востребованными в клинической практике методами экстракции ДНК являются: сорбционный метод, метод на основе спиртового осаждения и экспресс-метод экстракции ДНК. Каждый из перечисленных подходов имеет свои достоинства и недостатки. К сожалению, выбор того или иного метода пробоподготовки основан, прежде всего, на таких его характеристиках, как стоимость, продолжительность и трудоемкость анализа, а не на соответствии выбранной методики поставленной задаче. Это связано с отсутствием доступной аналитической информации в этой области и четких утвержденных рекомендаций по пробоподготовке.

## Методы экстракции

**Экспресс экстракция на основе температурного лизиса** — методика, позволяющая в кратчайшие сроки получить пригодный для постановки ПЦР-анализа препарат НК.

**Принцип метода:** Клинический образец помещается в пробирку с лизирующим буфером, затем подвергается термической обработке, в процессе которой происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. С помощью последующего центрифугирования нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а надосадочная жидкость (супернатант), содержащая ДНК, используется для проведения ПЦР.

Экспресс-метод успешно применяется для выделения ДНК таких возбудителей, как *Mycobacterium tuberculosis* [1], *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и других инфекций передающихся половым путем (ИППП). В то же время при оценке эффективности выделения ДНК HPV (папилломавирус человека) из сосков со слизистой урогенитального тракта отмечалось значительное увеличение эффективности в случае выделения сорбционным методом [2]. Это связано с тем, что в процессе пробоподготовки экспресс методом не производится очищение препарата НК от посторонних примесей и концентрирования в малом объеме, что, в совокупности приводит к значительному снижению чувствительности анализа.

**Чувствительность.** С учетом перечисленных фактов, экспресс-методика уступает по чувствительности в 8-12 раз методикам на основе спиртового осаждения и сорбции на силике.

**Применение.** В большей степени данная методика подходит для молекулярно-генетических исследований, когда требуется

лишь качественный анализ, а не определение наличия целевой последовательности инфекционного агента.

**Образцы.** Для проведения анализа подходят образцы только с низким содержанием ингибиторов, такие как урогенитальные соскобы, мазки, слюна и др.

**Спиртовое осаждение** — в основе методики лежит агрегация НК в присутствие соли и спирта.

**Принцип метода:** После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, отмывается 70% этиловым спиртом с последующим центрифугированием. После удаления супернатанта осадок подсушивается и растворяется в водном буфере. Роль соли в протоколе экстракции состоит в том, что её положительно заряженные ионы нейтрализуют отрицательный заряд на сахара-фосфатном скелете НК, приводя к снижению растворимости последних в воде и к выпадению НК в осадок. Нужно отметить, что НК менее растворима в изопропаноле, чем в этаноле, соответственно для ее осаждения требуются меньшая концентрации изопропанола и его предпочтительнее использовать, если есть ограничения по объему используемого пластика (например, есть возможность добавить только один объем образца). В ряде протоколов экстракции предлагается проводить осаждение (преципитацию) НК при пониженной температуре ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Однако, есть исследователи не согласные с этой теорией; по результатам их экспериментов температура инкубации со спиртом не имеет значительного влияния на выход продукта. Главенствующая роль, по их мнению, должна быть отведена продолжительности центрифугирования [3].

**При выделении малых количеств НК** (менее 100 ng) для визуализации осадка и улучшения процесса преципитации рекомендуется использовать соосадители, такие как гликоген, линейный поликариломид или декстран [4]. В некоторых протоколах экстракции предлагается добавлять соосадители непосредственно к этанолу или изопропанолу [5]. Делать этого, однако, не следует, так как соосадитель, попадая непосредственно в спирт, начинает образовывать центры нуклеации в отсутствие НК и, соответственно, при последующем смешивании с образцом в меньшей степени способствует агрегации НК. Соосадитель, таким образом, следует добавлять непосредственно в лизирующий буфер или к образцу.

На предпоследнем этапе выделения ДНК проводится добавление 70% этанола для отмычки осадка от остатков солей. Важно, чтобы отмыка проводилась именно водным раствором спирта, так как соли хорошо растворяются в воде и в гораздо меньшей степени в спирте. Кроме того, использование 70% этанола препятствует переходу НК в водную fazу.

На завершающем этапе процедуры происходит растворение НК в водном буфере обычно при температуре  $56\text{--}65^{\circ}\text{C}$  и вортексировании.

**Применение.** Данная методика подходит как для молекулярно-генетических исследований, так и для диагностики инфекционных заболеваний. Однако, в силу продолжительности и сложности анализа метод спиртового осаждения получил наибольшее распространение в исследовательских молекулярно-генетических лабораториях и в судебно-медицинских лабораториях, где требуется выделение аналитических количеств ДНК.

**Образцы.** Для проведения процедуры можно использовать широкий спектр биологических образцов, однако спиртовое осаждение приводит к преципитации не только НК, но и белков, что в свою очередь затрудняет получение чистого препарата НК из образцов с высоким содержанием белков, таких как биоптаты или цельная кровь. Наиболее простым путем решения проблемы с нежелательными примесями является уменьшение объема анализируемого образца, однако такой подход не применим, если необходимо получить результат с максимальной чувствительностью.

**Сорбционная экстракция** — методика, в основе которой лежит избирательная сорбция на поверхности силики в присутствие хаотропной соли. Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант с ингибиторами ПЦР удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата НК.

**Принцип метода.** Как и во всех процедурах экстракции НК на первом этапе проводится лизис биологического образца. Чаще всего для лизиса используются хаотропные агенты, например гуанидин тиоцианат, которые дестабилизируют водородные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия. В таких условиях растворимость НК в воде снижается, а белки денатурируют. Хаотропная соль необходима не только для лизиса, но и для процесса сорбции НК. Также для усиления процесса сорбции в некоторых протоколах рекомендуют добавлять спирт [6]. Среди существующих точек зрения на процесс взаимодействия ДНК с силикой можно выделить несколько основных.

Первая точка зрения [7] состоит в том, что сорбция ДНК на силике происходит за счёт образования катионных мостиков между силанольными группами, расположенными на поверхности силики, и фосфатными группами ДНК.

Вторая точка зрения опирается на свойства хаотропных агентов [8]. Известно, что молекула НК в растворе покрыта гидратной оболочкой. Попадая в раствор, молекулы хаотропной соли активно разрушают водородные связи, присоединяя к себе воду. В итоге молекула ДНК, лишённая своей гидратной оболочки, становится гидрофобной. То же самое происходит с поверхностью силики. В итоге между ДНК и силикой возникают гидрофобные взаимодействия, и идёт процесс сорбции. Согласно еще одной точке зрения [9,10] основным механизмом взаимодействия ДНК и силики является образование водородных связей между водой и молекулами НК. Подобные выводы были сделаны после выявления зависимости между количеством адсорбированной ДНК и диаметром пор силики. В данной теории не ясным остается роль хаотропных солей, присутствующих в растворе. Вследствие этого наиболее вероятными вариантами механизма сорбции представляются первые два, которые являются взаимодополняющими.

Необходимо также отметить, что процесс сорбции лучше всего идет при высокой ионной силе раствора, показателях pH 3,5–6,5 (оптимум pH 5) и температуре выше 37°C [11].

На завершающем этапе процедуры выделения (элюции) в условиях низкой ионной силы раствора происходит высвобождение НК с поверхности силики. Большое значение здесь имеет pH раствора — ДНК лучше элюируется и сохраняет свою целостность при pH 8-9, для РНК предпочтительнее pH 6-7.

**Объем анализируемого образца.** Метод сорбции позволяет эффективно выделять НК как из стандартных объемов клинического материала (например, 100 мкл урогенитального соскоба), так и из больших объемов биопроб — от 1 мл и более.

**Применение.** Данный метод подходит как для молекулярно-генетических исследований, так и для обнаружения различных инфекций с максимальной чувствительностью.

**Образцы.** Метод сорбции на силике позволяет качественно отмывать образец от всевозможных примесей, ингибиторов. Благодаря этому, данная методика является универсальной — она подходит для любых типов биопроб.

### Разработки компании Алкор Био

В компании Алкор Био разрабатываются наборы для пробо-подготовки на основе всех трех подходов к экстракции НК:

1. Набор для экспресс-выделения нуклеиновой кислоты на основе температурного лизиса, в состав которого введен дополнительный компонент — соосадитель ингибиторов, повышающий качество очистки образца в процессе центрифугирования.
2. Набор на основе спиртового осаждения мы адаптировали для выделения геномной ДНК из сухих пятен крови, которые используются при скрининге новорожденных.
3. Набор для выделения нуклеиновых кислот методом магнитоуправляемой сорбции на силике — наиболее интересная и перспективная разработка. Принципиальным отличием от классического протокола здесь является то, что в качестве сорбента используются магнитные частички, покрытые силикой. Это дает очень важное преимущество: промывать осадок можно без использования центрифуги, с использованием только магнитного штатива. Данный метод позволяет работать без дорогостоящего оборудования, а для проведения процедуры экстракции НК таким способом требуется значительно меньше времени, чем при использовании других методик. Важным преимуществом магнитоуправляемого выделения является возможность автоматизации процесса.

Компания Алкор Био разработала собственные магнитные частицы, которые отличаются высоким качеством покрытия и соответствуют лучшим зарубежным аналогам. Эти частицы выращиваются и затем определенным образом покрываются оболочкой силики, на которую в дальнейшем сорбируются НК.

### Заключение

Одним из основных этапов проведения молекулярно-генетических исследований, основанных на методе ПЦР, является выделение ДНК. От выбранного метода выделения зависит чувствительность анализа и как следствие надежность и достоверность получаемых результатов.

Наиболее распространенным методом выделения ДНК в клинико-диагностических лабораториях для диагностики инфекций является экспресс экстракция. Это обусловлено низкой стоимостью анализа и простотой его исполнения. Однако, чувствительность данного подхода в ряде случаев недостаточна для применения с целью диагностики ИППП.

Метод спиртового осаждения, обладая высокой чувствительностью, не получил широкого распространения для диагностики ИППП в связи со сложностью и продолжительностью анализа. Тем не менее, этот метод является незаменимым для выделения аналитических количеств ДНК.

Универсальным подходом выделения ДНК является сорбционная экстракция, которая, наряду с высокой чувствительностью, характеризуется простотой исполнения. Более того, использование данного метода выделения НК позволит автоматизировать процесс, что особенно актуально для клинико-диагностических лабораторий с большим потоком исследований. Использование магнитных частиц собственного производства снижает стоимость анализа, что, как мы надеемся, будет способствовать широкому распространению этого наиболее эффективного и качественного метода выделения НК.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МУКОВИСЦИДОЗА В ФОРМАТЕ МИКРОЧИПА

**A.Е. Павлов,<sup>1,2</sup> С.В. Апалько,<sup>1</sup> Е.В. Воробьев,<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ООО «Вега» Группа компаний «Алкор Био», г. Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, г. Санкт-Петербург



**Павлов А.Е.,**

ООО «Вега»  
Группа компаний  
«Алкор Био»,  
г. Санкт-Петербург;  
Санкт-  
Петербургский  
Государственный  
Университет,  
г. Санкт-Петербург



Мукоэсис-цидоэз (МВ) — генетическое аутосомно-рецессивное моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена муковисцидозного трансмембранныго регулятора проводимости (CFTR).

Заболевание характеризуется нарушением секреции экзокринных желез жизненно важных органов с поражением прежде всего дыхательного и желудочно-кишечного тракта, тяжелым течением и неблагоприятным прогнозом [1].

Для раннего начала лечения МВ, которое обеспечит более высокий терапевтический эффект и улучшит прогноз заболевания с возможностью продлить жизнь больного до 30-45 лет, необходима ранняя диагностика (первые недели после рождения). С этой целью в большинстве развитых стран мира введены программы по массовому скринингу новорожденных. Согласно Европейскому консенсусу целью неонатального скрининга МВ является выявление как можно большей доли пациентов с МВ на доклинической стадии с минимальным количеством ложных результатов и при минимальных затратах [3]. Это может быть достигнуто путем использования различных протоколов скрининга.

С 2006 г. в ряде регионов России, а с 1 января 2007 г. в рамках национального приоритетного проекта «Здоровье» во всех субъектах МВ был включен в перечень наследственных заболеваний, подлежащих обязательному неонатальному скринингу, наряду с фенилкетонурией, галактоземией, гипотиреозом и адреногенитальным синдромом. Тем не менее, диагностика заболевания все еще остается не на должном уровне. По данным Российского центра муковисцидоза, в котором наблюдаются дети до 18 лет, возраст, в котором впервые был установлен диагноз МВ, в среднем по России составил 30,3 месяца, по Москве — 23,0 месяца, тогда как в странах Западной Европы и Северной Америки этот показатель равняется 11,0 месяцам. При развитии у большинства пациентов клинической картины заболевания уже на первом году жизни диагноз в этом возрасте устанавливался только у трети из них [4].

Одной из основных причин позднего выявления МВ является принятая в РФ схема скрининга. Протокол скрининга включает 4 этапа [5, 6]: иммунореактивный трипсиноген (ИРТ), ре-тест по ИРТ, потовый тест и ДНК-диагностику, — причем только первые три являются обязательными. На первом этапе, как и во всем мире, определяется уровень биохимического маркера — ИРТ в сухом пятне крови новорожденного. Анализ берется на 4-5-й день у доношенных и на 7-8-й день у недоношенных новорожденных. Пороговым является уровень ИРТ 70 нг/мл, показатели, превышающие его, считаются положительными. Повышение в первую неделю жизни в крови ИРТ

является весьма чувствительным (85-90%), но не специфичным признаком. Поэтому необходим второй этап обследования — повторный анализ на ИРТ (ре-тест) на 21-28-й день жизни, позволяющий исключить здоровых детей. При концентрации маркера более 40 нг/мл проводится потовая проба, которая является ключевым компонентом скрининга на МВ в России. При отрицательном результате потовой пробы (менее 40 ммоль/л) ребенок в течение первого года жизни наблюдается по месту жительства с диагнозом «неонатальная гипертрипсиногенемия» для исключения случаев гиподиагностики. В случае пограничных результатов потового теста (40-60 ммоль/л) потовую пробу следует повторить, а также провести ДНК-диагностику. При положительном результате потовой пробы, а также при обнаружении мутаций гена CFTR (в случае пограничного результата потовой пробы) ребенку ставится диагноз МВ. Для постановки окончательного диагноза потовый тест должен быть положительным не менее трех раз. В сомнительных случаях могут помочь дополнительные методы обследования (анализ кала на панкреатическую эластазу 1, микроскопическое копрологическое исследование, компьютерная томография или рентгенография органов грудной клетки, посев мазка из зева).

Следует отметить, что на всех этапах скрининга могут быть получены как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Ложноположительные результаты ИРТ отмечаются при синдроме Эдвардса, асфиксии в родах, глубокой недоношенности и т.д. Ложноотрицательные результаты ИРТ могут определяться при внутриутробной инфекции, почечной недостаточности, некоторых хромосомных заболеваниях, поражениях поджелудочной железы, а также несоблюдении требований к взятию образца крови. Потовая проба, признанная «золотым стандартом» в диагностике МВ, также не обеспечивает абсолютную точность в постановке диагноза. По данным Российского центра МВ среди больных до 18 лет положительный потовый тест отмечался у 89,2%, пограничные цифры — у 10,3%, а отрицательный потовый тест у 0,5% [6]. Основной причиной получения ложноотрицательных результатов ДНК-диагностики МВ в России является неудовлетворительное качество используемых наборов. Диагностические наборы, представленные на российском рынке, определяют не более 14 мутаций в гене CFTR и требуют осуществления трудоемкой процедуры. Информативность таких систем не превышает 80% случаев больных МВ.

Исходя из вышеизложенного, ни один из перечисленных методов сам по себе не является достаточным для постановки диагноза МВ или связанных с мутациями в гене CFTR нарушений. Существующая на территории РФ схема скрининга на МВ не позволяет получать надежные достоверные результаты на доклинической стадии развития заболевания.

В настоящее время в мире насчитывается около 15 вариантов программ по скринингу новорожденных, включающих от 2 до 4 последовательных этапов обследования. Из таблицы 1 следует, что во многих странах вторым подтверждающим

**Таблица 1.** Схемы обязательных этапов неонатального скрининга на МВ, применяемые в разных странах [2].

| Этапы |              |                  |              | Страны                            |
|-------|--------------|------------------|--------------|-----------------------------------|
| I     | II           | III              | IV           |                                   |
| ИРТ   | Потовый тест |                  |              | Италия                            |
| ИРТ   | ДНК          | Потовый тест     |              | Уэльс, Чехия                      |
| ИРТ   | ИРТ2         | Потовый тест     |              | Ирландия, Италия, Австрия, Россия |
| ИРТ   | ДНК ИРТ2     | Потовый тест     |              | Великобритания, Италия, Испания   |
| ИРТ   | ИРТ2         | ДНК Потовый тест |              | Италия                            |
| ИРТ   | Потовый тест | ДНК              |              | Италия                            |
| ИРТ   | ДНК          | ИРТ2             | Потовый тест | Франция, Польша, Великобритания   |

тестом является ДНК-диагностика. Такой подход приводит к повышению чувствительности до 91% и сокращению сроков постановки диагноза и, соответственно, более раннему проведению терапии [7].

На данный момент известно более 1700 мутаций, обуславливающих развитие симптомов МВ, которые имеют разную частоту встречаемости и тяжесть клинических проявлений [8]. Мутации гена *CFTR* могут быть объединены в четыре группы в соответствии с прогнозируемыми клиническими последствиями: мутации, приводящие к развитию МВ; к развитию нарушений, связанных с функциональными дефектами белка CFTR; мутации без установленных последствий и мутации, имеющие недоказанную или неопределенную клиническую значимость. Широкий спектр мутаций гена *CFTR*, их сравнительно невысокая частота и популяционная гетерогенность создают объективные трудности в разработке протоколов проведения ДНК-диагностики МВ и проведения генетического консультирования среди населения, относящегося к разным этническим группам и проживающего в разных регионах.

При анализе документов, посвященных использованию ДНК-диагностики в скрининге МВ [6, 11-14], были выделены следующие рекомендации к тесту:

1. В диагностическую панель должны быть включены мутации из списка, рекомендованного ACMG, частота встречаемости которых у больных МВ составляет не менее 0,1%;
2. Диагностическая панель должна быть дополнена расовыми/этническими специфическими мутациями, наиболее общими для изучаемой популяции;
3. В диагностическую панель, главным образом, должны быть внесены мутации, относящиеся к I группе, т.е. вызывающие МВ с сильным фенотипическим проявлением;
4. Диагностическая тест-система должна находиться в ценовой категории, доступной для проведения массового скрининга;
5. Специфичность диагностической тест-системы должна составлять, по крайней мере, 85-95%;
6. Чувствительность диагностической тест-системы должна позволять анализировать небольшие количества ДНК, выделенной из образцов сухих пятен крови;

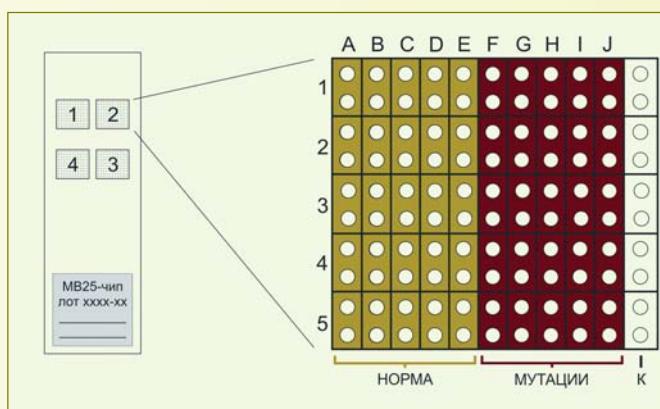
7. Анализ должен быть пригодным для рутинного скрининга с адекватным временем производительного цикла;
8. Интерпретация полученных результатов должна быть простой и недвусмысленной;
9. Воспроизводимость диагностической тест-системы должна быть 100%;
10. Доступность необходимого инструментария для проведения анализа.

В декабре 2005 Food and Drug Administration (FDA) был одобрен первый коммерческий молекулярно-генетический диагностический тест на определение МВ для клинического использования. В России на данный момент не существует молекулярно-генетического диагностического набора, прошедшего регистрацию в Росздравнадзоре, отвечающего всем выше перечисленным требованиям и готового к применению в клинической диагностике. В связи с этим особую ценность приобретает разработанный компанией Алкор Био тест «Муковисцидоз-БиоЧип» для клинической диагностики мутаций в гене *CFTR*, адаптированный для применения на территории РФ и стран СНГ.

### Формат диагностического набора «Муковисцидоз-БиоЧип»

На первом этапе разработки диагностического теста нами была определена панель мутаций. Критериями выбора мутаций служили — частота встречаемости в славянской популяции, тяжесть фенотипических проявлений, а также рекомендации, консолидированные из европейских и американских источников [11-14], и известных российских работ [6]. Для проведения молекулярно-генетического тестирования по отобранной панели мутаций было предложено использовать принцип анализа на биочипе (microarray) путем обратной гибридизации флуоресцентно меченых зондов.

**Нанесение и иммобилизация мишеней.** В качестве твердой фазы для иммобилизации мишеней было использовано функционализированное предметное стекло с реакционной поверхностью. Конструирование и синтез олигонуклеотидных мишеней было выполнено с учетом включения дикого и мутантного варианта полиморфизма. Нанесение проб с мишенями на фазу было выполнено бесконтактным способом на роботе для печати микрочипов Piezorray (PerkinElmer) согласно топологической схеме (*Рисунок 1*).



**Рисунок 1.** Схематическое изображение биочипа.

Слева: внешний вид биочипа. 1-4 – четыре копии биочипа.

Справа: увеличенное изображение биочипа. Все мишени нанесены в виде парных точек. Поля A1-E5 составляют мишени дикого типа. Поля F1-J5 составляют мутантные мишени. Последний столбец K – контроль для позиционирования маски.

**Пробоподготовка.** В качестве источника геномной ДНК для проведения анализа могут быть использованы — венозная кровь, букальный эпителий или сухие пятна крови. Для получения надежных результатов метод выделения должен обеспечивать не менее 10 нг ДНК в концентрации не менее 1 нг/мкл. Подходящим вариантом является метод выделения ДНК на основе спиртового соосаждения, например, набор «Экстра-ДНК-Био» (Алкор Био).

**Наработка флуоресцентных зондов.** Синтез меченых зондов для гибридизации на микрочипе производится в ходе двух раундов полимеразной цепной реакции (ПЦР). На первом этапе 12 пар праймеров, объединенных в 5 пуллов и имеющих специфичность к мутантным участкам гена *CFTR*, используются для наработки промежуточных длинных ампликонов (ПЦР1). В ходе второго раунда ПЦР (ПЦР2) используется значительный избыток Су5-меченых праймеров для наработки преимущественного одноцепочечного продукта с мишней ПЦР1. Продукт реакции ПЦР2 представляет собой смесь меченых зондов, специфичных к исследуемым участкам ДНК.

**Гибридизация.** Инкубация микрочипа с меченными зондами, разведенными в буфере, может быть выполнена на специализированной гибридизационной станции для микрочипов (Tecan), либо в оригинальной пластиковой камере на водяной бане при температуре 50°C в течение 1,5 часов.

**Считывание результатов.** Биочип из набора «Муковисцидоз-БиоЧип» совместим со всеми сканерами для чипов (ScanArray G<sub>x</sub> (PerkinElmer), MArS (Ditabis) и PowerScanner (Tecan)) стандартного размера 75x25x1 мм. Настройки сканера (мощность лазера, коэффициент усиления, разрешение) устанавливаются индивидуально. Для снижения вероятности ошибки после анализа представлено на биочипе в четырех повторах. Топология чипа приведена на рисунке 2. Все мишени нанесены в вертикальных дублях.

### Результаты апробации набора «Муковисцидоз-БиоЧип»

**Панель мутаций.** На основании проведенного анализа, нами были отобрано 25 мутаций в гене *CFTR*, вызывающих МВ с сильным фенотипическим проявлением и имеющих сравнительно высокую частоту встречаемости в европейской и славянской популяциях (Таблица 2).

По сравнению с другими тест-системами для генотипирования мутаций *CFTR* в нашу панель не включены следующие мутации:

- 3120+1G>A — мутация имеет африканское происхождение и не встречается у европеоидной расы. Выявлена в Южной Африке, Саудовской Аравии и Греции.
- R117H — вызывает слабый и «плавающий» фенотип. Эффект мутации зависит от длины политимидинового участка в 8-ом инtronе.
- A445E, R560T, 3659delC, 711+1G>T, 1898+1G>A, 2184delA, I148T — имеют низкую частоту встречаемости. Могут быть рекомендованы для включения в расширенную панель чипа для проведения скрининга.

Панель включает в себя мутацию Dele2-3, являющуюся второй по частоте и характерной преимущественно для славянской популяции.

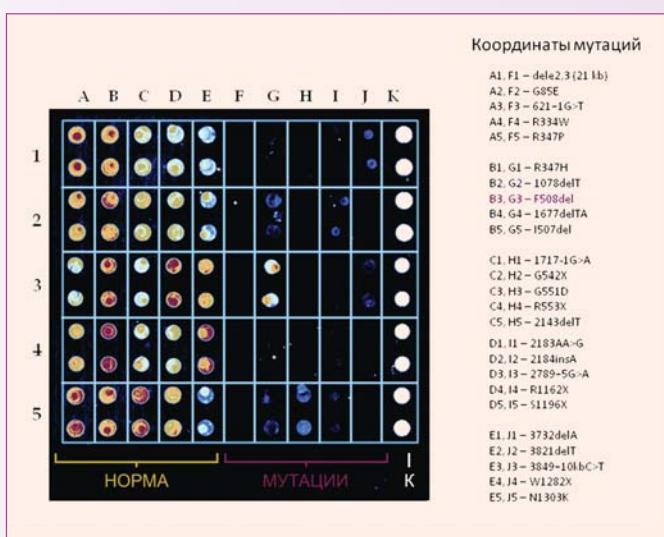
Предлагаемая панель позволяет выявлять до 96% всех больных, что значительно превосходит эффективность существующих на данный момент генетических тест-систем, которые обычно включают определение 11-14 мутаций.

**Таблица 2. Мутации в гене *CFTR*, включенные в панель «Муковисцидоз-БиоЧип».**

| Мутация      | Частота (%) | Экзон/инtron (E/I) | Источники                 |
|--------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Dele2-3      | 8,8         | I2-3               | 6, 11, 15                 |
| G85E         | 0,4         | E3                 | 11, 12, 13, 14            |
| 621+1G>T     | 0,4         | E4                 | 6, 11, 12, 13, 14         |
| R334W        | 0,2         |                    | 6, 11, 13, 14, 15         |
| R347P        | 0,3         |                    | 6, 11, 13, 15, 16         |
| R347H        | 0,3         | E7                 | 11, 12, 14, 17            |
| 1078delT     | 0,7         |                    | 11, 12, 13                |
| I507del      | 0,7         |                    | 11, 12, 13, 14            |
| F508del      | 64,7        | E10                | 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 |
| 1677delTA    | 0,8         |                    | 6, 11, 17                 |
| G542X        | 2,0         |                    | 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 |
| G551D        | 1,9         |                    | 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 |
| R553X        | 0,8         | E11                | 6, 11, 12, 14, 15, 16     |
| 1717-1G>A    | 1,0         |                    | 11, 12, 13, 14, 16        |
| 2143delT     | 2,0         |                    | 6, 11, 15                 |
| 2184insA     | 1,8         | E13                | 6, 11, 12, 16             |
| 2183AA-G     | 0,8         |                    | 11, 16                    |
| 2789+5G>A    | 0,7         | I14b               | 11, 13, 14, 16            |
| R1162X       | 0,6         |                    | 11, 12, 13, 14            |
| S1196X       | 0,8         |                    | 1, 2, 3                   |
| 3732delA     | 1,2         | E19                | 11, 15, 17                |
| 3821delT     | 0,8         |                    | 11, 15                    |
| 3849+10kbC>T | 0,5         | I19                | 6, 11, 13, 14, 16         |
| W1282X       | 1,6         | E20                | 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 |
| N1303K       | 1,3         | E21                | 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16 |

**Пробоподготовка.** Два последовательных раунда ПЦР, в ходе которых нарабатываются меченные зонды, обеспечивают высокую чувствительность метода (от 10 нг геномной ДНК). Для органичного включения молекулярно-генетического анализа в принятую схему тестирования на МВ нами был разработан протокол выделения ДНК из сухих пятен крови. Набор «Экстра-ДНК-Био» (Алкор Био) позволяет выделять геномную ДНК в достаточном количестве и необходимой чистоты из трех дисков сухого пятна крови диаметром 3,2 мм.

**Проведение анализа.** Разработанные праймеры и общая схема постановки анализа позволяют в последнем раунде ПЦР наработать полную популяцию аллель-специфических меченых зондов. В ходе последующей гибридизации смесь зондов инкубируется с биочипом. Проведение двух раундов амп-



**Рисунок 2.** Результаты анализа ДНК пациента с генотипом, соответствующим носительству мутации F508del.

лификации и последующая гибридизация на чипе требует около 4,5 часов. Анализ сканированного изображения может быть выполнен как визуально по предложенной схеме, так и с использованием специального программного обеспечения. Результатом тестирования является заключение о наличии либо отсутствии мутантных аллелей гена и генотипе пациента (Рисунок 2).

**Верификация.** Определение аналитических свойств тест-системы было выполнено на референсных образцах ДНК. Для 16-ти из 25-ти мутаций были использованы образцы из собственного генетического банка. Оставшиеся 9 редких вариантов были проанализированы с использованием искусственно синтезированных генных конструкций, содержащих мутантные аллели и эквимолярные количества геномной ДНК «дикого типа».

Анализ результатов тестирования показал полное совпадение генотипов, полученных набором реагентов «Муковисцидоз-БиоЧип» с ожидаемыми генотипами референсных образцов.

**Апробация.** Проведение апробации тест-системы было выполнено совместно с Медико-генетическим диагностическим центром Санкт-Петербурга (МГЦ). Всего было проанализировано 76 «слепых» образцов, из них: 72 образца — выделенная ДНК, 1 сухое пятно крови, 3 образца замороженной крови. Все изученные образцы имели данные о генотипе, полученные другими молекулярно-генетическими методами.

В результате апробации генотипы были подтверждены для 72 образцов, диагноз по 4 образцам не совпал. Проанализировав причины расхождения, нами были сделаны следующие выводы: 1 образец — очень редкая мутация, которая не входит в панель биочипа; 2 и 3 образцы — возможно перепутаны при фасовке, требуется дополнительная проверка; 4 образец — в МГЦ не был определен, но обнаружен набором «Муковисцидоз-БиоЧип».

## Заключение

Несмотря на то, что с 2007 г. во всех субъектах РФ в рамках национального приоритетного проекта «Здоровье» внедрен массовый скрининг новорожденных на МВ, до настоящего вре-

мени сохраняется проблема ранней диагностики заболевания. Это во многом обусловлено применяемой в России схемой скрининга, в которой этап ДНК-диагностики, одного из самых специфичных тестов, находится на последнем месте и не является обязательным.

На Соласительной конференции [18] были приняты основные рекомендации по использованию и интерпретации анализа мутаций при МВ в клинических условиях. На российском рынке на данный момент не представлено ни одного ДНК-теста на МВ, соответствующего выработанным требованиям и пригодного для клинического использования. ДНК-тесты, рекомендованные FDA, не подходят для использования в российской популяции из-за отсутствия в панели некоторых регион-специфических мутаций.

Тест-система «Муковисцидоз-БиоЧип» предназначена для единовременного определения 25 наиболее часто встречающихся на территории РФ мутаций, связанных с развитием тяжелого фенотипа этого заболевания, с помощью метода ДНК-микрочипов с использованием методов мультиплексной ПЦР и флуоресцентной детекции.

Основные характеристики диагностического набора «Муковисцидоз-БиоЧип»:

- разработанная панель включает список мутаций, рекомендованных ACMG, и мутации специфические для российской популяции. Представленный набор позволит выявлять больных МВ в 95% случаев;
- формат биочипа позволяет сократить время анализа (общее время анализа 10 образцов на 25 мутаций одним лаборантом — около 6-7 часов);
- формат биочипа при аккуратном исполнении всех этапов работ снижает вероятность контаминации за счет отсутствия стадии электрофореза;
- чувствительность набора позволяет анализировать от 10 нг ДНК. Геномная ДНК может быть получена из сухих пятен крови, цельной крови либо букального эпителия.

На данный момент диагностический набор «Муковисцидоз-БиоЧип» прошел технические и клинические испытания и находится на финальной стадии получения регистрационного удостоверения. Появление зарегистрированного диагностического набора на МВ на российском рынке позволит скорректировать схему неонатального скрининга с выведением ДНК-диагностики на второй этап тестирования или ее проведении параллельно с ИРТ тестом.

«Муковисцидоз-БиоЧип» может быть использован для неонатального скрининга, в том числе в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье», в клинической молекулярно-генетической и пренатальной диагностике, для скрининга муковисцидоза при планировании семьи, а также для диагностики мужского бесплодия.

Подчеркиваем, что диагноз муковисцидоз может быть поставлен врачом только по совокупности указывающих на это признаков: клинические проявления, оценка функциональной активности белка CFTR и генотип.

Замена ре-теста ИРТ на генетический анализ позволит снизить вероятность ложного диагностирования, увеличить скорость постановки диагноза и уменьшить общие затраты на алгоритм неонатального скрининга.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ПРОГРАММАМИ ПРЕНАТАЛЬНОГО БИОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА

**Т.К. Кащеева,<sup>1</sup> И.В. Джуган,<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИАГ им. Д.О. Отта» СЗО РАМН, <sup>2</sup> ООО «Алкор Био»



**Кащеева Т.К.,**

ФГБУ «НИИАГ  
им. Д.О. Отта»  
СЗО РАМН

точного прогноза для жизни и здоровья плода. Врожденная патология плода нередко возникает у женщин с неотягощенным акушерско-гинекологическим или генетическим анамнезом. Ведущую роль в отборе женщин групп высокого риска по хромосомной патологии плода играют скринирующие программы.

В 1997-1999 гг. для 2-го триместра, в 2003-2005 — для 1-го — в НИИАГ им. Д.О. Отта для жительниц Петербурга были определены популяционные нормативные значения содержания маркерных сывороточных белков (МСБ) в крови матери и проведена оценка значимости факторов, влияющих на уровень МСБ при патологии плода [1, 2]. Было показано, что для выявления синдрома Дауна наиболее эффективно работает алгоритм комбинированного ультразвукового и биохимического скрининга в ранние сроки беременности (с 9-й по 13-ю неделю) [3, 4]. Сроки проведения зависят от срока беременности при первом обращении пациентки, однако часто удается произвести забор образца крови в 9-10 недель, что является по нашим результатам оптимальным вариантом. В таком сроке отклонение уровня PAPP-A от нормы при хромосомных аномалиях у плода достигают максимального значения (Таблица 1). Далее в 11-12 недель проводится УЗИ с расчетом риска рождения ребенка с синдромом Дауна.

Нормальными значениями в диагностические сроки считаются уровни белков от 0,5 до 2 МоМ. Однако использование указанного диапазона для выделения группы высокого риска хромосомных аномалий приведет к резкому увеличению числа

**Таблица 1.** Отклонения биохимических маркеров в разные сроки беременности в крови матери при синдроме Дауна у плода [4].

| Срок беременности (нед.) | PAPP-A (МоМ) | Своб. β-HCG (МоМ) | Число случаев |
|--------------------------|--------------|-------------------|---------------|
| 9                        | 0,21         | 1,65              | 14            |
| 10                       | 0,29         | 1,39              | 41            |
| 11                       | 0,33         | 1,70              | 50            |
| 12                       | 0,37         | 1,86              | 43            |
| 13                       | 0,59         | 1,69              | 22            |
| Медиана                  | 0,36         | 1,66              | N=170         |



лавной задачей пренатальной диагностики является своевременное выявление врожденной и наследственной патологии и выработка на основе этой информации максимально

ложноположительных результатов, поэтому отбор беременных в группу высокого риска должен основываться на расчете индивидуального риска рождения ребенка с синдромом Дауна. Риск оценивается с помощью компьютерных программ. В направлении на скрининг должны быть указаны:

- паспортные данные женщины с указанием полной даты рождения, а не просто возраст или год рождения;
- дата взятия крови, дата УЗИ и срок беременности. Возможен контроль сроков по дате первого дня последнего менструального цикла (ПДПМ);
- количество плодов;
- наличие у беременной сахарного диабета 1 типа;
- масса тела;
- этническая принадлежность пациентки. Все национальности, проживающие в России, относятся к европейской этнической группе (caucasian). Данный фактор необходимо учитывать при обследовании беременных, относящихся к семьям восточно-азиатского, арабского или африканского происхождения;
- курение при беременности;
- факт использования вспомогательных репродуктивных технологий (например, ЭКО). В случае применения донорской яйцеклетки указывается (и используется в расчете риска) возраст донора яйцеклетки.

Бланк направления на скрининг 1-го триместра заполняется аналогично направлению, приведенному выше для скрининга 2-го триместра, но необходимо указывать толщину воротникового пространства (ТВП), которая измеряется с 11 недель до 13 недель 6 дней. Если в протоколе УЗИ указана ТВП, измеренная до 11 или после 14 недель, для расчета риска эту величину использовать нельзя.

Расчет индивидуального риска может проводиться только с помощью автоматизированных средств. В России доступно несколько вариантов импортных программ расчета риска в 1-м триместре беременности: финская программа «Life Cycle», немецкая программа «PRISCA» и немецкая программа «Astraia». В программе «Astraia» в расчете риска учитываются дополнительные УЗ параметры, которые могут использовать только специалисты, имеющие и ежегодно подтверждающие специальный международный сертификат с кодом доступа в программу, что дает возможность уменьшить группу риска до 3%.

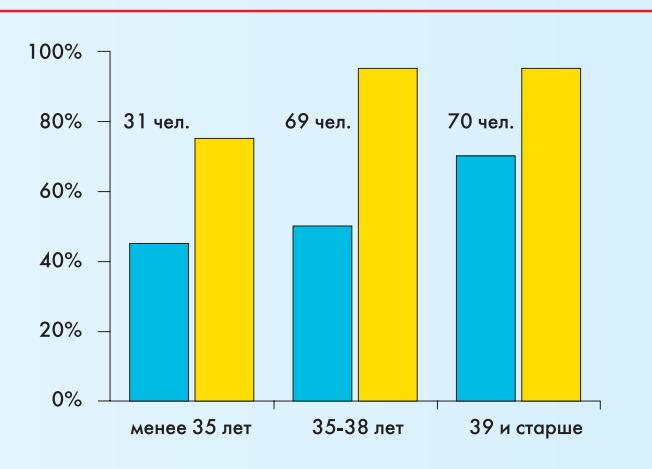
С 2000 года в Санкт-Петербурге используется отечественная «Программа мониторинга синдрома Дауна» (ПМСД) для оценки риска по результатам биохимического скрининга 2-го триместра, разработанная ООО «Интеллектуальные программные системы» совместно со специалистами НИИАГ им. Д.О. Отта при поддержке ООО «Алкор Био». В 2009 году ООО «Алкор Био» на основе обследования нескольких тысяч образцов крови беременных разработала новую версию программы расчета риска рождения ребенка с синдромом Дауна — «ИСИДА». Она позволяет рассчитывать риск по результатам определения АФП и ХГЧ во 2-м триместре и по результатам определения PAPP-A и свободной β-субъединицы ХГЧ в 9-13 недель с учетом ТВП,

измеренной при УЗ-обследовании в 11-13 недель беременности. В случае обследования пациентки и в том, и в другом триместре предусмотрен комплексный расчет риска, учитывающий данные всех биохимических исследований и ультразвукового определения ТВП при сроке 11-13 недель. В настоящее время более 50 учреждений, включая частные клиники, государственные учреждения, осуществляющие централизованный скрининг в разных регионах РФ, используют «ИСИДУ» для пренатального скрининга. Результаты биохимического скрининга могут вноситься в «ИСИДУ» или вручную, или автоматически передаваться из биохимического анализатора «Alisei Q.S.», для которого адаптированы тест-системы «Алкор Био». В медико-генетическом центре Санкт-Петербурга обследуется ежедневно около 300 беременных.

Программа «ИСИДА» устанавливается в учреждение с обеспечением технической и консультативно-методической поддержки. В «ИСИДЕ» предусмотрена возможность создавать документы произвольного формата на основании любой информации из базы данных, это упрощает составление отчетов и оптимизирует мониторинг пренатального скрининга. Консультативно-методическая поддержка включает в себя важный раздел — контроль стабильности медиан. Выявление систематического сдвига медиан УЗ и биохимических маркеров является сигналом для проведения анализа с целью выявления и устранения ошибок или проведения корректировок медиан с учетом региональных особенностей. Так в Твери, в «Центре специализированных видов помощи» им. В.П. Аваева биохимический скрининг проводится на тест-системах «Алкор Био» с использованием программного комплекса «Исида» с 2009 года. Рассчитанные еще в 2009 году медианы АФП и ХГЧ были подтверждены в 2011 году, что указывает на стабильность реагентов и отсутствие методических ошибок при проведении пренатального скрининга. В 2011 году центр начал проводить пренатальный скрининг уже в I триместре беременности.

В Санкт-Петербурге в 2009-2011 гг. чувствительность комбинированного скрининга в 9-13 недель беременности составила 96% (129 из 134 случаев СД у плода) при 7,4% ложноположительных результатов. Распоряжением Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга №39 от 01/02/12 **массовый биохимический скрининг беременных полностью ориентирован на сроки 9-13 недель**. Определение АФП и ХГЧ сохраняется только для беременных, обратившихся в женскую консультацию при сроке более 14 недель, или по назначению генетика для пациенток с пограничными значениями комбинированного риска (от 0,1 до 0,39%) по результатам скрининга первого триместра. В результате около 70-75% беременных могут закончить обследование до 14 недель [5].

Анализ 170 случаев пре- и постнатального выявления синдрома Дауна медико-генетической службой города показал, что эффективность ультразвукового скрининга трихомии 21 у плода в 11-13 недель улучшается, однако, еще невелика. Если в 2009 году увеличение ТВП более 2,5 мм было выявлено у 20% плодов с синдромом Дауна, то в 2011 году у 51% (у 81 из 157 плодов с СД). При этом среди молодых беременных увеличение ТВП плода при синдроме Дауна наблюдалось гораздо реже, чем в старших возрастных группах (*Рисунок 1*). В отечественных и зарубежных статьях нет сведений о зависимости величины ТВП плода от возраста матери. Поэтому мы предполагаем, что молодые беременные не получают должного внимания специалистов УЗД, либо их обследование доверено недостаточно квалифицированным кадрам. Согласно



**Рисунок 1.** Эффективность выявления синдрома Дауна у плода по ТВП более 2,5 мм и по результатам расчета комбинированного риска среди беременных разного возраста (N=170). Голубой — доля плодов с ТВП более 2,5 мм, желтый — доля беременных с риском более 1/250 (0,4%).

Распоряжению № 496 от 28/09/2007 беременные старше 35 лет сразу направлялись на скрининговое УЗИ 2-го уровня в 11-13 недель в медико-генетический центр (СПбДЦ(МГ)). Стандартизация и точность измерения ультразвуковых параметров оказывают наибольшее влияние на результаты комбинированного скрининга. Медианы ТВП, используемые в настоящее время в Санкт-Петербурге при расчете риска, основаны на данных, опубликованных в 2009 году [6]. Однако, медианы ТВП, полученные в 2005 году при отладке методики скрининга 1-го триместра [5] отличаются от среднегородских и подтверждены Е.С. Некрасовой в 2011 году при обследовании почти 1 000 беременных в режиме «клиники одного дня», где УЗ — диагностика осуществлялась тремя специалистами с международным сертификатом при постоянном контроле качества измерений (*Таблица 2*). Подобная картина, когда копчико-теменной размер и ТВП занижаются неопытными врачами УЗД [7, 8], наблюдается в большинстве стран, проводящих массовый УЗ скрининг. В программном комплексе «Исида» установлены среднегородские медианы Санкт-Петербурга. В обследуемых регионах необходимо получать собственные нормативные значения ТВП. В процессе мониторинга качества УЗИ по мере повышения квалификации и приобретения опыта специалистами УЗД возможна корректировка медиан.

**Таблица 2.** Медианы ТВП в среднем по Санкт-Петербургу [6] и по результатам работы в режиме «клиники одного дня» (КОД) [2].

| Срок беременности (нед.)            | ТВП, мм СПб | ТВП, мм КОД |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| 10                                  | 1,15        | 1,1         |
| 11                                  | 1,3         | 1,4         |
| 12                                  | 1,5         | 1,6         |
| 13                                  | 1,6         | 1,9         |
| Количество обследованных беременных | 5 000       | 830         |

**Таблица 3.** Чувствительность комбинированного скрининга в 9–13 недель беременности в зависимости от порогового значения риска (N=157).

| Риск рождения ребенка с синдромом Дауна | Выявлено |     |
|---|----------|-----|
|   | число    | %   |
| более 1/50                              | 97       | 62% |
| более 1/100                             | 123      | 78% |
| более 1/150                             | 133      | 85% |
| более 1/250                             | 140      | 89% |
| более 1/650                             | 151      | 96% |

В зависимости от абсолютного значения риска, полученного автоматизированным программным комплексом, беременная может быть отнесена к группе высокого или низкого риска по сравнению с установленным в программе порогом отсечки (cut off). Порог отсечки в программах можно менять, он определяется региональными условиями и возможностями медико-генетической службы. В большинстве стран стандартно задается порог 1/250 или 1/300. В Санкт-Петербурге принято считать порогом отсечки во 2-м триместре риск 1/360, а в 1-м триместре — 1/250. С 2003 по 2011 г. медико-генетической службой получены данные о комбинированном скрининге 1-го триместра 157 беременных с трисомией 21-й хромосомы у плода, которые показывают, что повышение порога риска существенно снижает эффективность скрининга (Таблица 3). Высокий порог — 1/100 — позволяет отнести к группе высокого риска только 123 случая из 157 (78%), что сравнимо с чувствительностью биохимического скрининга во 2-м триместре (74%). Расчет риска в программах проводится с учетом возраста беременной, ее анамнеза, срока беременности и отклонений биохимических и ультразвукового маркеров. Приведем пример классических отклонений биохимических маркеров при риске СД — снижен уровень PAPP-A и повышен уровень свободной β-ХГ. Следует обратить внимание на то, что при нормальном значении ТВП=1,5 мм (1 MoM) риск этой пациентки составил почти 2% (1/51). К сожалению, нередко среди врачей женских консультаций встречается недооценка серьезности повышенного риска при нормальной ультразвуковой картине, что приводит к отказу беременной от обследования и рождению больных детей.

Затруднения с интерпретацией результатов возникают обычно у акушеров-гинекологов и в тех случаях, когда небольшие отклонения маркеров приводят к повышенному риску рождения ребенка с синдромом Дауна. В старых методических рекомендациях говорилось, что к группе риска надо относить пациенток с биохимическими показателями, выходящими за пределы 0,5-2,0 MoM. Эти пределы принимались в то время, когда были недоступны программы расчета риска. После появления системы автоматизированного расчета необходимо ориентироваться на итоговую цифру риска.

Приведем пример влияния возраста беременной на результат скрининга. При одних и тех же «опасных» отклонениях биохимических показателей у беременной 36 лет в программе «Life Cycle» риск составил 1/51, а у 21-летней пациентки риск (1/292) остался ниже порога отсечки (1/250), однако, очень близко к нему. Аналогично в программе «Исида» при нормальной ультразвуковой картине и наличии отклонений маркерных

сывороточных белков, характерных для синдрома Дауна у плода, для беременной в возрасте 36 лет программа показывает высокий риск (1/42), а для беременной в возрасте 21 года значение риска оказывается несколько ниже порогового (1/254 при пороге риска 1/250). В таких случаях генетик для уточнения может предложить исследование АФП и ХГЧ в 16 недель и расчет комплексного риска. Такой подход позволяет выявить те редкие случаи трисомии 21 у плода, когда из-за низкого возрастного риска и отсутствия УЗ маркеров риск пациентки в 1 триместре находится в диапазоне 1/251-1/1000.

При нормальных значениях ТВП в 1 триместре следует обращать внимание на низкие уровни обоих биохимических маркеров (0,3 MoM и менее). Например, у беременной 28 лет уровень PAPP-A составил 0,21 MoM, а уровень свободной β-ХГ — 0,3 MoM. ТВП равнялась 1 мм (норма). Риск синдрома Дауна не являлся повышенным — 1/483, но генетик рекомендовал пройти инвазивное пренатальное обследование в связи с высоким риском синдрома Эдвардса (или задержки развития плода). Кариотипирование клеток ворсин хориона показало, что у плода трисомия по 18 хромосоме.

В последних версиях некоторых программ рассчитывается риск синдрома Эдвардса (трисомия 18), Патау (трисомия 13) или триплоидии (69, XXX/XXXU). В «ИСИДЕ» отдельно выделены риски по синдрому Дауна и синдрому Эдвардса, а для других анеуплоидий предусмотрена общая формулировка — повышен риск задержки развития плода, который в большинстве случаев наблюдается при тяжелых хромосомных аномалиях.

Изолированное снижение же уровня PAPP-A, не связанное с риском синдрома Дауна, может быть ассоциировано с повышенным риском неблагоприятного исхода беременности (преждевременных родов, низкой массы новорожденного или преэклампсии (ПЭ)). В настоящее время в НИИАГ им. Д.О. Отта проводятся исследования содержания PAPP-A и плацентарного фактора роста (ПлФР) при нормальной и осложненной беременности. По данным зарубежных исследователей расчет риска преэклампсии по двум биохимическим маркерам с учетом анамнеза и артериального давления пациентки позволяет отнести к группе риска 60% беременных с поздним началом ПЭ и 30% — с ранней манифестиацией [9].

### Заключение

Автоматизированный расчет риска по результатам комбинированного УЗИ и биохимического скрининга I триместра позволяет выявить максимально возможное число плодов с синдромом Дауна при минимальном числе ложноположительных результатов. Всех беременных с высоким или пограничным риском синдрома Дауна в 1-м триместре беременности необходимо в кратчайшие сроки направить к врачу-генетику, а после исключения хромосомных аномалий у плода вести дальнейшее наблюдение, обращая особое внимание на беременных с низким (менее 0,3 MoM) уровнем PAPP-A при сроке 9–13 недель.

Значительные отклонения биохимических маркеров I триместра, не характерные для синдрома Дауна, могут свидетельствовать о других хромосомных патологиях или указывать на риск развития преэклампсии. Такие беременные в любом случае требуют повышенного внимания генетиков и акушеров-гинекологов.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# СЫВОРОТОЧНЫЙ СА 15-3 И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



**Комлева Е.О.,**

Городской  
клинический  
онкологический  
диспансер,  
г. Санкт-Петербург



овременные представления о патогенезе развития рака молочной железы (РМЖ) основаны на представлении о том, что под влиянием аномальной экспрессии генома, малигнизированные клетки начинают достоверно «вспоминать» ряд метаболических особенностей, свойственных организму человека лишь на этапе эмбриогенеза. Опухоль приступает к синтезу белковых молекул (онкомаркеров), который ранее был заблокирован или, по крайней мере, характеризовался минимальной активностью. Особенно, если вести сравнение с количествами, регистрируемыми в определенных органах и тканях на этапе их внутриутробного развития [4]. Детальное рассмотрение научно-практической значимости одного из маркеров при РМЖ является основной целью данного сообщения.

Опухолеассоциированный антиген СА 15-3 представляет собой гликопротеиновый эпипот муцина-1 (молекулярная масса 300кДа). Впервые его удалось выделить Куфэ в 1983 году. Маркер является одним из наиболее известных среди класса онкофетальных. Плод накапливает СА 15-3 в гепатоцитах, а так же в клетках эпителия бронхов. В организме взрослого человека имеет место экспрессия данного антигена млечным эпителием (эпителием выстилки протоков молочной железы), откуда СА 15-3 поступает в кровь.

Физиологическая концентрация сывороточного СА 15-3 у здоровых женщин  $\leq 37$  Ед/мл. В качестве патологического рассматривают уровень  $>37$  Ед/мл (исключение составляет III триместр нормально развивающейся беременности, когда он может достигать 40 Ед/мл). Заболевания, при которых комплекс диагностируемых клинико-биохимических нарушений, как правило, включает повышение концентрации сывороточного СА 15-3, представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Основные заболевания, при которых регистрируется повышенный уровень антигена СА 15-3 в сыворотке.

| Злокачественные новообразования   | Неопухоловая патология   |
|---|--|
| Бронхов<br>Желудка<br>Молочной железы<br>Органов женской репродуктивной системы (матки, эндометрия, яичников)<br>Печени<br>Поджелудочной железы | ВИЧ-инфекция<br>Гепатит<br>Добропачественные опухоли желудочно-кишечного тракта<br>Мастопатия<br>Пневмония, хроническая обструктивная болезнь легких<br>Ревматические заболевания<br>Саркоидоз<br>Туберкулез<br>Хроническая почечная недостаточность<br>Цирроз печени<br>Эндометриодные кисты яичников |

Применительно к диагностике РМЖ, за антигеном СА 15-3 традиционно сохраняется роль маркера выбора, значение которого предопределяет стадию болезни в условиях распространенного опухолевого процесса, когда повышенный уровень данного антигена регистрируется у 85% больных. При I-II стадии РМЖ подобные изменения отмечены лишь у 15% пациентов. Достаточно низкая (15-20%) чувствительность теста исключает перспективность его использования в целях ранней доклинической диагностики РМЖ и, соответственно, в программах скрининга.

Вместе с тем, повышенные, особенно сверхвысокие предоперационные уровни СА 15-3, расцениваются как прогностически неблагоприятный признак. Высокая концентрация антигена, как правило, ассоциируется с наличием отдаленных метастазов первичной опухоли. Специальные наблюдения свидетельствуют, что повышение уровня СА 15-3 обнаруживается за 2,7, а по некоторым данным за 4 месяца до клинической манифестации рецидива РМЖ.

Коэффициент корреляции между уровнем СА 15-3 и массой опухоли составляет 75%. Эта закономерность аргументирует целесообразность осуществления мониторинга проводимого лечения РМЖ путем динамического контроля концентрации данного антигена в сыворотке крови.

Результаты контроля сывороточного СА 15-3, как правило, содержат значимую при РМЖ информацию в следующих клинико-диагностических ситуациях:

- получение клинического прогноза (характера течения, наиболее вероятного исхода) развития заболевания;
- выявление метастазов первичной опухоли, а также наличия рецидивов заболевания;
- оценка достаточности объема выполненной хирургической операции;
- динамический мониторинг эффективности проводимой лекарственной (включая гормоно-, химиотерапию, таргетные препараты) и/или лучевой терапии, выработка решения о необходимости пересмотра тактики лечения.

В технологическом процессе определения сывороточного СА 15-3 выделяют три, выполняемых последовательно, этапа: преаналитический, аналитический, постаналитический.

**Преаналитический этап.** Требования к пробе:

- сыворотки крови, которые визуально имеют признаки иктеричности, а так же гемолиза и/или липидемии не подлежат дальнейшему исследованию;
- центрифугирование (получение сыворотки крови) должно проводиться не позднее 1 часа после доставки образца в КДП;
- предельные сроки хранения сыворотки в зависимости от температурного фактора составляют 24 ч при (+4°C) или 6 месяцев при (-20°C);
- повторение циклов замораживания/оттаивания аликовтированных сывороток не допускается;
- контаминация должна быть исключена с тем, чтобы минимизировать искажения истинного значения концентрации СА 15-3 в образце.

**Аналитический этап.** Количественное определение сывороточного СА 15-3 проводят иммуноферментным или хемилюминесцентным методом, где принцип детекции основан на избирательном связывании данного антигена специфическими антителами. Надо отметить, что иммуноферментный метод может быть реализован по разному. Особого внимания заслуживает вариант, когда используется комплекс стрептавидин-биотин. Такая схема обладает рядом преимуществ, важных для определения онкомаркера СА 15-3. Данная схема реализована в российском наборе «ОнкоИФА-СА 15-3» производства «Алкор Био» (г. Санкт-Петербург).

На планшет нанесены молекулы стрептавидина. На первой стадии анализа в лунки добавляются калибровочные пробы, контрольная сыворотка, исследуемые образцы и коньюгат моноклональных антител с биотином. Благодаря биодоступности и высокому сродству стрептавидина к биотину, происходит специфичное связывание данных молекул и образуется комплекс стрептавидин-биотин-моноклональное антитело к СА 15-3. На второй стадии после промывки планшета добавляется коньюгированные с пероксидазой антитела, специфичные к определенному эпигенотипу СА 15-3. Меченный ферментом антитело связывается с молекулами СА 15-3, которые были иммобилизованы во время первой инкубации. По окончании инкубации проводится промывка планшета, инкубация с ТМБ, остановка реакции и учет результатов.

Реализация данной схемы иммуноферментного анализа для определения онкомаркера СА 15-3, благодаря большой способности биотиновых молекул связываться со стрептавидином, позволяет значительно расширить диапазон определяемых концентраций (в наборе «Алкор Био» он составляет 0-400 Ед/мл) и максимально удалить границы хук-эффекта высоких концентраций. Такие аналитические характеристики тест-системы дают возможность работать с большим количеством сывороток с высокой концентрацией СА 15-3 без предварительного разведения, тем самым минимизируя вероятность ошибки разведения и сокращая время на пробоподготовку. Это, в свою очередь, позволяет использовать данную тест-систему более эффективно для оценки предоперационного уровня СА 15-3, выявления метастазов первичной опухоли и рецидивов до их клинических проявлений, осуществлять мониторинг проводимой терапии.

Набор реагентов «ОнкоИФА-СА 15-3» можно реализовать как на автоматическом, так и на полуавтоматическом анализаторе. Надежность получаемых результатов является ключевой предпосылкой эффективности применения СА 15-3 в диагностических целях. Условия обеспечения подобной надежности применительно к различным аналитикам регламентирует ГОСТ Р 53022.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)». Установленные данным стандартом требования к точности (правильности и прецизионности) анализа СА 15-3 изложены в таблице 2.

Специалист клинико-диагностической лаборатории также должен быть информирован относительно аналитических характеристик тест-системы, которая используется для определения уровня СА 15-3 (референсное значение, специфичность, чувствительность, диапазон измерения, точность, коэффициент вариации, хук-эффект высоких концентраций). Это позволит не допустить технологических ошибок в процессе определения концентрации антигена, а также будет способствовать правильной интерпритации получаемых результатов.

**Таблица 2. Дифференцированные биологически обоснованные критерии точности определения антигена СА 15-3 в сыворотке (извлечение из таблицы 61 ГОСТ Р 53022.2-2008).**

| Целевые значения, % |       | 2-й уровень – базовый            |                   |                  |                   |
|---------------------|-------|----------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                     |       | Предельно допустимые значения, % |                   |                  |                   |
| CV                  | B     | CV <sub>10</sub>                 | ± B <sub>10</sub> | CV <sub>20</sub> | ± B <sub>20</sub> |
| 2,85                | 10,82 | 4,67                             | 12,59             | 3,90             | 12,07             |

**Постаналитический этап.** Лабораторный отчет, в дополнении к полученному результату анализа, должен содержать следующую информацию:

- метод, использованный для тестирования сывороточного СА 15-3;
- референсные уровни антигена при данном варианте аналитической процедуры;
- чувствительность тест-системы, с применением которой проводилось исследование.

Больные РМЖ требуют динамического наблюдения. В этой связи увеличивается значение рациональной организации полученных аналитических данных. Эффективный, как доказывает практика, вариант решения вопроса сводится к применению лабораторного паспорта исследований сывороточного СА 15-3. При этом современная КДЛ и в этом разделе деятельности должна обладать компьютерными технологиями — лабораторной информационной системой.

## Выводы

1. Динамический мониторинг сывороточного СА 15-3 в оптимальном варианте следует проводить в одной клинико-диагностической лаборатории. Основу такого мониторинга должен составлять аналитический метод, не отличающийся от использованного на старте лечебно-диагностического процесса. Следование сформулированным выше рекомендациям позволит объективно отслеживать динамику концентрации СА 15-3. Аналитические системы, которые применяются в КДЛ, достаточно разнообразны. На рынке много производителей разных производителей. Отсюда разброс результатов, получаемых при исследовании уровня СА 15-3 в одинаковых пробах, когда они анализируются различными КДЛ.
2. Многолетний опыт наших исследований позволяет рекомендовать при подозрении на РМЖ для повышения чувствительности и специфичности диагностики использовать сочетания онкомаркеров. Прежде всего, триаду онкомаркеров, объединяющую СА 15-3, МСА (маркеры — представители класса муциноподобных антигенов) и РЭА (раково-эмбриональный антиген), а также гормональные исследования на эстрadiол, прогестерон и пролактин. Такой подход позволит исключить получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов исследований.
3. Динамика уровня сывороточного СА 15-3 более информативна, чем результат единичного определения данного анализа. Интерпретация наблюдаемого изменения СА 15-3 нуждается в постоянном консультационном участии клиницистов.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# РОЛЬ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ HBsAg В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ В



**Балюбаш В.В.,**

ООО «Алкор Био»,  
г. Санкт-Петербург

 мире насчитывается около 2 миллиардов человек, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ), из которых более 350 млн. имеют хроническую инфекцию.

Ежегодно от гепатита В умирает от 500-700 тыс. человек [1]. Основным методом скрининговой диагностики гепатита В является определение HBsAg. Будучи главным компонентом наружной оболочки вируса, он определяется в инфицированных гепатоцитах, в крови и других биологических жидкостях. HBsAg — сложный протеин с несколькими иммунодоминантными участками, среди которых имеется группоспецифическая детерминанта «а» и подгрупповые детерминанты («у» или «d», «г» или «w»). Различные сочетания антигенных детерминант формируют субтипы вируса. Поверхностный антиген появляется уже в инкубационном периоде, обычно через 2-3 недели после инфицирования. В дальнейшем концентрация HBsAg нарастает вместе с подъемом активности АлАТ [2].

HBsAg синтезируется в цитоплазме гепатоцитов. Только часть этого белка используется для построения новых вирусных частиц, основное же количество HBsAg поступает в кровь инфицированных лиц в форме сферических частиц диаметром 22 нм и палочковидных форм длиной до 200 нм. Количество таких частиц в крови превышает число инфекционных вирионов ВГВ в десятки и сотни тысяч раз. Концентрация HBsAg в крови при острой и хронической ВГВ-инфекции колеблется в широких пределах — от 0,1нг/мл до 1,0 мг/мл.

Еще в 80-х годах прошлого века была отмечена корреляционная связь между титром HBsAg, наличием в сыворотке крови ассоциирующегося с вирусной репродукцией HBeAg и выраженностью патологических изменений в ткани печени [3]. Дальнейшее изучение HBsAg показало, что при количественной оценке он может служить маркером, позволяющим прогнозировать течение заболевания.

Сегодня количественное определение HBsAg может использоваться не только для мониторинга течения хронического гепатита В, но и как дополнительный маркер для оценки вирусного ответа на этиотропную терапию. В 2009 г. в журнале Hepatology была опубликована работа Moucari и соавт. [5], в которой была показана роль количественного определения HBsAg в сыворотке крови в предсказании вирусологического ответа пациентов на противовирусную терапию. В качестве методов исследования использовались ВГВ-генотипирование, количественное определение ДНК ВГВ и количественное определение HBsAg сыворотки. В исследовании участвовали пациенты с HBeAg-негативным вариантом ХГВ. Лечение проводилось с помощью пегилированного интерферона-альфа на протяжении 48 недель. На основе определения количества ДНК ВГВ различие между группами пациентов, ответивших и не ответивших на лечение, начинает определяться с 12-й недели,

и только к 24-й неделе можно корректно выделить группу пациентов, у которых проводимая терапия неэффективна. Что касается пациентов с рецидивом, то их невозможно было выделить по количеству ДНК ВГВ вплоть до окончания лечения. На основе количественного определения HBsAg уже к 12-й недели лечения удалось выделить группу пациентов, не ответивших на терапию, а также пациентов с рецидивом, что делает возможным скорректировать лечение в ранние сроки.

В исследовании Piratvisuth T. и соавт. [6] на фоне 48-недельной терапии пегилированными интерферонами HBeAg-позитивных больных ХГВ частота сероконверсии по HBeAg имела обратную зависимость от уровня HBsAg. При концентрации HBsAg менее 1500 МЕ/мл на 12 неделе терапии HBeAg сероконверсия отмечалась у 57% больных, на 24 неделе — у 54%. При уровне HBsAg 1500-20000 МЕ/мл HBeAg сероконверсия на 12 неделе лечения выявлена у 32%, на 24 неделе — у 26%. Содержание HBsAg более 20000 МЕ/мл на 12 и 24 неделях прогнозировало сероконверсию по HBeAg только у 16% и 15% пациентов, соответственно.

В настоящее время количественное измерение HBsAg в сыворотке крови становится все более распространенным и доступным в нашей стране. Наряду с дорогостоящими хемолюминесцентными системами, требующими специальной аппаратуры для их использования, появилась тест-система «ГепатитИФА-HBsAg» компании «Алкор Био» для иммуноферментного определения количества поверхностного антигена. Данная тест-система может использоваться как для качественного определения HBsAg (для проведения скрининговых исследований), так и для мониторинга лечения и глубокого изучения естественного течения гепатита В.

Клинические испытания диагностическая система проходила на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург. В анализе участвовали 80 содержащих HBsAg сывороток, полученных при обследовании пациентов с различной

**Таблица 1.** Результаты измерения количественного содержания HbsAg в образцах испытуемой панели сывороток с низким содержанием антигена.

| № образца | Концентрация HbsAg в МЕ/мл            |                              |
|-----------|---------------------------------------|------------------------------|
|           | ARCHITECT HbsAg (Abbott Laboratories) | ГепатитИФА-HBsAg (Алкор Био) |
| 83        | 34,9                                  | 42,0                         |
| 91        | 0,98                                  | 1,2                          |
| 98        | 14,3                                  | 17,0                         |
| 101       | 58,0                                  | 65,0                         |
| 102       | 33,0                                  | 29,0                         |
| 107       | 16,0                                  | 16,0                         |
| 109       | 16,6                                  | 18,0                         |
| 119       | 10,1                                  | 8,0                          |

формой ГВ, и 80 отрицательных образцов. В рамках клинических испытаний проводилось сравнение работы набора с тест-системой для количественного определения HBsAg методом хемилюминесцентного анализа «АРЧИТЕСТ HBsAg» производства «Abbott Laboratories» (США). Анализ полученных данных показал полное совпадение результатов качественного анализа, т.е. 100% чувствительность и специфичность набора «Алкор Био».

При сравнении данных о количественном уровне HBsAg в исследуемых образцах отмечена сопоставимость показателей, полученных в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg» производства «Алкор Био» и референтном наборе. Коэффициент корреляции составил  $r=0,99$ . В качестве примера в Таблице 1 приведены результаты количественной оценки HbsAg в низкотитражных образцах испытуемой панели [7].

Все вышеперечисленные сыворотки содержат незначительное (относительно диапазона 0,1 нг/мл - 1,0 мг/мл) количество HBsAg. Результаты клинических испытаний позволяют сделать вывод о высокой чувствительности и специфичности «ГепатитИФА-HBsAg» и рекомендовать набор к широкому применению в лабораторной практике не только для качественного, но что важно, для количественного определения HBsAg.

## Заключение

Количественное определение HBsAg у пациентов с вирусным гепатитом В является важной характеристикой для прогноза естественного течения инфекции и оценки эффективности противовирусной терапии. Заслуживает огромного внимания возможная роль маркера в определении окончательного срока терапии у больных ХГВ, получающих нуклеозидные аналоги. В качестве тест-системы для количественного определения HBsAg рекомендуется набор «ГепатитИФА-HBsAg», показавший в клинических испытаниях 100% чувствительность и специфичность для выявления ВГВ в сыворотке крови, а также высокий коэффициент корреляции с данными хемилюминесцентного метода. Набор «ГепатитИФА-HBsAg» производства «Алкор Био» можно использовать как для проведения массовых скрининговых исследований по качественному выявлению HBsAg, так и для проведения мониторинга естественного течения ХГВ и эффективности проводимой терапии, который основан на количественном определении HBsAg.

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высылаются по просьбе читателей.*

# НАБОР «АЛЛЕРГОИФА-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ IgE» КОМПАНИИ «АЛКОР БИО». ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В НИИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ им. П.Н. КАШКИНА

*О.В. Аак, канд. хим. наук, ведущ. науч. сотр., А.В. Соболев, д-р мед. наук, профессор  
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина Северо-Западного государственного медицинского  
университета им. И.И. Мечникова*



**Аак О.В.,**  
канд. хим. наук, ведущ. науч. сотр.  
**НИИ медицинской микологии**  
им. П.Н. Кашкина Северо-Западного  
государственного медицинского  
университета им. И.И. Мечникова

 аспротранненность аллергических заболеваний имеет ярко выраженную тенденцию к росту, что отчетливо прослеживается повсеместно и для большинства нозологических форм аллергии, включая атопические варианты течения. Наиболее убедительные данные были получены во время проведения III национального обследования здоровья и питания в США (1988-1994 г.г.) при комплексном исследовании, включающем постановку кожных проб к 10 распространенным аллергенам у более чем 30 тыс. случайно выбранных человек. Оказалось, что больше половины обследованных американцев страдают атопической формой аллергии. Сравнение с результатами предыдущего обследования (1976-1980 г.г.) показало увеличение частоты сенсибилизации к распространенным аллергенам от 2,1 до 5,5 раз [1].

Особое значение уделяется выявлению больных с атопическим вариантом аллергии. Именно у этой группы пациентов возможно проведение аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), которая позволяет снизить чувствительность к аллергенам и уменьшить риск развития поливалентной аллергии. Для решения этой задачи требуется проведение аллергообследования с определением уровня специфических IgE (sIgE) к причинно-значимым аллергенам.

В настоящее время большинство анализов на sIgE выполняются методом иммуноферментного анализа (ИФА). Первый анализ sIgE был выполнен радиоаллергосорбентным методом в 1972 г. (Phadebas IgE Test), при этом использовались бумажные диски с иммобилизованными аллергенами. Первый вариант «обращенного» ИФА (REAST) sIgE был описан испанскими авторами в 1983 г. [2]. Было предложено улавливать из анализируемой пробы все IgE, а sIgE затем проявлять коньюгатами пероксидазы с аллергенами. В 1986 г. метод был универсализирован применением общего для всех аллергенов проявляющего реагента — коньюгата стрептавидин-пероксидаза, аллергены же модифицировались биотинилированием [3]. Это удлиняло ИФА на одну стадию, но оказалось возможным сократить продолжительность анализа путем преформирования в растворе иммунных комплексов аллерген-sIgE и IgE-биоантисыворотка. Термин «обращенный» был использован авторами, чтобы подчеркнуть отличие от аллергосорбентного ИФА с иммобилизованными на твердой фазе аллергенами. Поскольку на первой

стадии происходит извлечение из пробы sIgE иммобилизованными на твердой фазе улавливающими антителами, то метод можно было бы назвать ИФА с использованием улавливающих антител. В настоящее время эта методика получила название реверсивный или «capture»-вариант ИФА.

В аллергосорбентном варианте ИФА нанесенные на твердую фазу экстракты аллергенов содержат палитру посторонних белков, гликопротеидов и полисахаридов. Это, во-первых, уменьшает специфическую сорбционную емкость аллергосорбентов, что снижает чувствительность анализа. Во-вторых, без должной предварительной обработки экстракта высока вероятность получения сорбента, обладающего и неспецифической емкостью, что приводит к частичной, а иногда и полной потере специфичности анализа. На специфичность аллергосорбентного метода могут оказывать негативное влияние высокие концентрации общего IgE и гемолиз. В отличие от аллергосорбентного варианта в «capture»-варианте ИФА иммуносорбент создан на основе антител к IgE (МАТ), что исключает перекрестные неспецифические реакции с иммуноглобулинами классов A, G, M и D и положительно влияет на специфичность. Так же важной особенностью «capture»-варианта является возможность использования серии калибраторов IgE для построения калибровочной кривой. Представление результатов не в балльной шкале, а в виде цифрового значения концентрации позволяет сравнивать результаты, полученные в различных лабораториях и с использованием реагентов различных производителей, следить за эффективностью лечения и предсказывать возможность клинических проявлений аллергии.

«Capture»-вариант ИФА быстро завоевал популярность, в настоящее время ряд зарубежных фирм производят биотинилированные аллергены и другие реагенты для иммуноферментного анализа. В их числе ZenTech, Dr. Fooke, Allermetrix, Siemens Healthcare Diagnostics. В 2010 г. в их ряды вступил и «Алкор Био», выпустив набор реагентов «АллергоИФА-специфические IgE». Анализ удобен для выполнения в разных клинических лабораториях независимо от их производительности. Достигается это использованием единого для всех аллергенов иммуносорбента — планшета, в лунках которого иммобилизованы анти-IgE антитела. Создание иммуносорбента на основе антител, а не препарата аллергена обеспечивает анализу гибкость, возможность формирования произвольного перечня аллергенов по показаниям врача, а также снижает неспецифические реакции. Аллерген же несет на себе биотиновую метку и проявляется на твердой фазе в составе иммунных комплексов со sIgE коньюгатом специфичного к биотину белка с пероксидазой хрена. Окончание анализа фотометрическое. Результаты регистрируются на любом вертикальном планшетном фотометре [4].

В НИИ медицинской микологии имени П.Н. Кашкина проводится аллергологическое обследование больных с использованием тест-систем компаний «Алкор Био». В начале работы были проведены ограниченные испытания. Сравнивались наборы «АллергоИФА-специфические IgE» и биотинилированные аллергены к ним компании «Алкор Био» с MAST-CLA наборами компании «Hitachi Chemical Diagnostics». Для испытаний были взяты 6 отечественных биотинилированных аллергенов: береза бородавчатая (t3), полынь обыкновенная (w6), эпителий кошки (e1), домашняя пыль (h1), клещи Dermatophagoides pteronissinus (d1) и Dermatophagoides farina (d2). Каждый аллерген испытывали на 20 здоровых людях и 20 пациентах, страдающих тяжелыми формами атопических заболеваний. Средний возраст пациентов составил 28 лет, из них 54% — мужчины, 46% — женщины. Концентрация общего IgE в большинстве сывороток больных была высо-

кой или очень высокой. По результатам испытаний сделан вывод о высокой специфичности и хорошей чувствительности тест-системы «АллергоИФА-специфические IgE» и целесообразности её применения для выявления причинно значимых аллергенов [4].

Аллергодиагностика является неотъемлемой частью при установлении возможных причин кашля и подборе методов лечения. При лёгочной форме муковисцидоза кашель является одним из основных симптомов заболевания. В начальной стадии болезни кашель возникает в основном по утрам и сопровождается отхождением небольшого количества мокроты. Из-за повышенной вязкости мокроты отхождение её затруднено, что приводит к бактериальному воспалению, отёку и инфильтрации стенки бронхов. Больные муковисцидозом входят в группу риска по развитию аллергического бронхолёгического аспергиллёза (АБЛА), особенно дети в возрасте до 10 лет с наличием полипозного риносинусита. Установление у них выраженной сенсибилизации к грибам является очень важным и при удовлетворении не менее 6 критериев АБЛА (включая высокий — более 417 Ед/мл уровень общего IgE) требует назначения антимикотических препаратов.

**Клинический пример 1.** Больной Б., 27 лет, находится под наблюдением в микологической клинике с диагнозом «Муковисцидоз, смешанная форма, средней степени тяжести, ремиссия. Вторичный хронический обструктивный бронхит, ремиссия. Двусторонние бронхэктомии». По данным 2011 года, уровень общего IgE составлял 237 Ед/мл, а уровень специфических IgE-антител к *A. fumigatus* составлял 2,27 МЕ/мл (средний уровень). Аллергологическое обследование проводилось с использованием тест-систем «АллергоИФА-специфические IgE». Количество эозинофилов в периферической крови составляло 8%. Диагноз АБЛА подтверждён не был и антимикотическая терапия не проводилась.

В 2012 году больному было проведено повторное аллергологическое и микологическое обследование. Уровень общего IgE составил 171 Ед/мл. Динамики остальных показателей не наблюдалось. Диагноз АБЛА подтверждён также не был и антимикотическая терапия не проводилась.

**Клинический пример 2.** Больная П., 7 лет, жаловалась на длительный кашель. Уровень общего IgE составлял 475 Ед/мл. При аллергологическом обследовании с использованием MAST-панели на 36 аллергенов была выявлена поливалентная сенсибилизация, в том числе к грибам рода *Aspergillus* (++) , аллергия к пыльце берёзы (++) , полыни (++) , шерсти собаки (++) , домашней пыли (+). Для проверки, не обусловлена ли поливалентная сенсибилизация высоким уровнем неспецифического сигнала, было назначено дополнительное аллергобследование с использованием тест-системы «АллергоИФА-специфические IgE». Было установлено, что у ребёнка имеется низкий (0,6 МЕ/мл) уровень специфических к *A. fumigatus* IgE, что по совокупности лабораторных и клинических данных не позволяет установить диагноз АБЛА на момент обследования и, следовательно, нет необходимости лечения антимикотическими препаратами.

Следует отметить, что аномально высокий уровень фонового сигнала не характерен для сывороток больных муковисцидозом, а является индивидуальной особенностью сыворотки пациента на момент взятия крови. Приведенные клинические случаи иллюстрируют высокую специфичность тест-систем, в основе которых лежит «capture»-вариант иммуноферментного анализа. Мы рекомендовали биотинилированные аллергены и наборы «АллергоИФА-специфические IgE» к использованию в практике клинико-диагностических лабораторий

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*

# ОПЫТ КОМПАНИИ «АЛКОР БИО» В СОЗДАНИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКИ



**Кочиш Л.Т.,**  
руководитель  
лаборатории  
аллергологии

ООО «Вега»  
Группы компаний  
«Алкор Био»,  
Санкт-Петербург



ынешний 2012 год богат юбилейными датами для российской биотехнологической компании «Алкор Био», готовящейся отметить свое 20-летие, а также для целого

ряда ее подразделений, сформировавших самый крупный на Северо-Западе нашей страны биотехнологический кластер. Лаборатория аллергологии была создана в мае 2002 года, 5 лет назад она вошла в научно-исследовательское подразделение холдинга «Алкор Био» — компанию ООО «Вега», которая проводит разработки инновационных продуктов и технологий в области клинической лабораторной диагностики, а также занимается их внедрением в производство. В качестве основных задач для лаборатории аллергологии были определены разработка и получение аллергенов с целью использования для диагностики аллергических заболеваний как *in vitro*, так и *in vivo*. Важнейшим направлением деятельности коллектива лаборатории является создание и выпуск в необходимых количествах биотинилированных аллергенов с целью их использования в оригинальной тест-системе для определения иммуноглобулинов Е, специфичных к различным аллергенам (sIgE). Особенностью и основным итогом этой работы посвящена настоящая статья. Как в России, так и за рубежом до 40% населения страдают аллергическими заболеваниями, обусловленными преимущественно иммунными механизмами с участием sIgE [1, 2, 3, 5]. Эти антитела, связывая аллергены, приобретают способность стимулировать выделение базофилами вазоактивных веществ, которые во многом определяют развитие аллергической симптоматики.

В 90-е годы прошлого века в Европе был разработан метод количественного определения sIgE, в котором использовалась твердая фаза с адсорбированными антителами, специфичными к IgE, и аллергены со специальной биотиновой меткой. В ходе иммуноферментного анализа биотинилированные аллергены проявляются на твердой фазе в составе иммунных комплексов с sIgE и коньюгатом, специфичным к биотину с пероксидазой хрена [2, 4, 5]. Применение иммуносорбентов, содержащих антитела к IgE, в отличие от нефиксированных на твердой фазе аллергенов, придает анализу гибкость, удобство в использовании, а также снижает неспецифические реакции.

В России развитие этого метода, названного реверсивным аллергосорбентным тестом, получило в группе компаний «Алкор Био». В частности, он был реализован в оригинальном отечественном наборе «АллергоИФА-специфические IgE», в котором применяются разработанные нашей лабораторией биотинилированные аллергены [1]. Созданная тест-система для количественного определения sIgE в сыворотке крови предполагает базовый неизмененный набор реагентов, а расширение диагностических возможностей набора происходит за счет избирательного использования широкого ассортимента биотинилированных

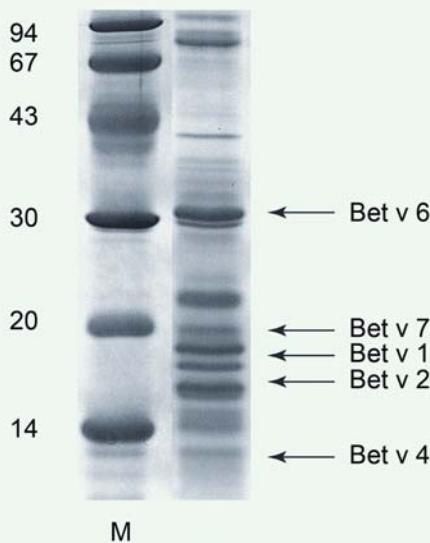
аллергенов. Поэтому применительно к рассматриваемой тест-системе «АллергоИФА-специфические IgE» перед лабораторией аллергологии ООО «Вега» были поставлены задачи разработки технологии получения и наработки достаточного количества биотинилированных аллергенов широкого спектра.

Отбор ассортимента аллергенов, включающего около 120 наименований, был осуществлен на основании анализа информации о частоте встречаемости аллергических заболеваний и спектре вызывающих их этиологических агентов. В их число вошли аэроаллергены (пыльцевые, бытовые, грибковые), пищевые, эпителиальные, инсектные и профессиональные аллергены. Было налажено производство биотинилированных аллергенов, наиболее востребованных в клинической практике. Среди пыльцевых аллергенов были выбраны аллергены деревьев: березы, ольхи серой, тополя, лещины, а также луговых и сорных трав: тимофеевки, ежи сборной, овсяницы луговой, полыни, амброзии, постенницы, которые имеют весьма широкий ареал произрастания. Пищевые аллергены включали коровье молоко, яичный белок, пшеничную муку, гречу, свинину, говядину, куриное мясо, всевозможные овощи, фрукты, морепродукты. Из бытовых аллергенов были отобраны шерсть кошки, собаки, домашняя пыль, клещи домашней пыли. Перечни биотинилированных аллергенов постепенно расширялись, что способствовало повышению диагностических возможностей тест-системы «АллергоИФА-специфические IgE».

Особые усилия и наиболее продолжительное время потребовалось для решения задачи по разработке технологии получения и очистки биотинилированных аллергенов, а также способов контроля их качества. Аллерген является по своей природе не просто белком, а сложной многокомпонентной смесью, обладающей своими уникальными характеристиками. Поэтому разработка и получение аллергенов основаны, прежде всего, на изучении их физико-химических, биохимических и иммунологических свойств. Технология получения биотинилированных аллергенов состоит из выделения высокоактивной аллергенной фракции, очистки от примесей и доведения белкового экстракта до готовой биотинилированной формы.

Качество аллергена, например степень его очистки или пра-

вильность подбора концентрации в растворе, во многом определяют специфичность и чувствительность диагностической процедуры у пациентов с аллергопатологией. Поэтому, несмотря на единство методик получения биотинилированных аллергенов, сотрудникам лаборатории аллергологии приходится работать отдельно с каждым аллергеном, проходя весь путь от исходного сырья до конечного продукта. Компонентный состав выделяемых аллергенных экстрактов оценивали с использованием методики SDS-электрофореза в поликарбамидном геле, которая позволяет контролировать наличие главных аллергенных компонентов в экстракте. На примере аллергенов из пыльцы березы бородавчатой и клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* можно проследить наличие мажорных (основных аллергенных) и минорных (дополнительных) белков в смеси (*Рисунок 1, 2*). Известно, что наибольшей IgE-связывающей активностью у аллергена березы обладают Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4 и Bet v 6, а у клеща домашней

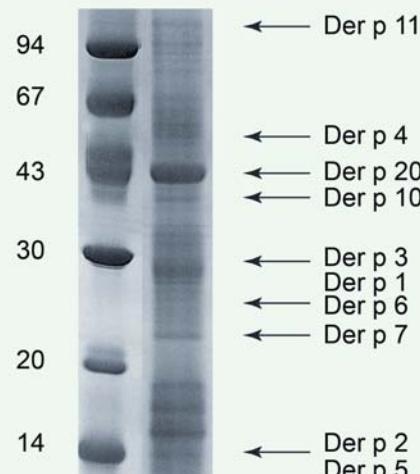


**Рисунок 1.** SDS-электрофорез (15% ПААГ) аллергена пыльцы бересклета.

пыли — соответственно Der p 1, Der p 2, Der p 3 и Der p 4, имеющие определенную молекулярную массу.

С помощью метода изоэлектрофокусирования определяли изоэлектрические точки белков (рI), основная часть которых должна находиться в кислой области ( $\text{pH} < 7,0$ ). Известно, что именно эти компоненты в наибольшей степени обладают IgE-связывающей активностью. У аллергенов из пыльцы бересклета и клеща домашней пыли рI большинства аллергенных компонентов находится как раз в пределах pH от 4,5 до 7,0.

Контроль иммунологической активности аллергенов пыльцы бересклета и клеща домашней пыли проверяли методом иммуноблоттинга. При этом аллергены разделяли с помощью SDS-электрофореза в поликарбамидном геле, а затем переносили их на нитроцеллюлозную мембрану. Далее, используя положительную пулевую сыворотку крови от пациентов с аллергическими заболеваниями и подтвержденной сенсибилизацией к данным аллергенам, выявляли посредством иммуноферментного анализа IgE-связывающую активность белков аллергенного экстракта. В качестве контроля применяли отрицательную пулевую сыворотку от практически здоровых людей без аллергопатологии. Как видно на представленных иллюстрациях (Рисунок 3, 4), наличие темных полос при использовании положительных образцов пулевой сыворотки и отсутствие таковых в случае применения отрицательных образцов свидетельствует о присутствии в смеси главных белков, обладающих наибольшей IgE-связывающей активностью. Особый контроль проводили для оценки стабильности полученных аллергенов. Для этого оценивали степень их аллергенной активности (%) в режиме реального времени. На примере аллергена пыльцы бересклета видно, что через 2 года хранения его активность сохранялась на 85,2% (Рисунок 5). Этого вполне достаточно для использования в лабораторной практике, так как снижение активности биотинилированных аллергенов для проведения иммуноферментного анализа допускается до 70%. Таким образом, разработанный технологический процесс обеспечил получение биотинилированных аллергенов, обладающих необходимыми биохимическими, электрофоретическими и иммунохимическими характеристиками. Однако основными критериями, по которым оценивается работа аллергенов в тест-системе, являются их специфичность и чувствительность.



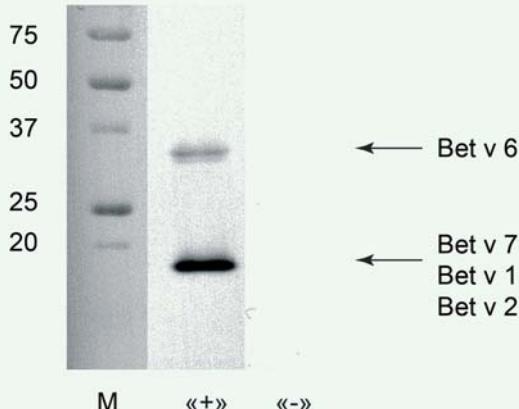
**Рисунок 2.** SDS-электрофорез (15% ПААГ) аллергена клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Чем выше специфичность и чувствительность биотинилированного аллергена, тем с большей точностью можно определить какой аллерген у пациента вызывает аллергическую реакцию. Поэтому весьма желательно, чтобы эти важнейшие показатели были не ниже 90%. Именно к этому стремился коллектив лаборатории аллергологии, для этого постоянно проводилось изучение аналитических и диагностических характеристик тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» со всеми разрабатываемыми аллергенами. В качестве референтной была выбрана тест-система «ImmunoCAP» шведской фирмы «Phadia», которая по праву признана «золотым стандартом» иммуноферментного анализа для определения sIgE.

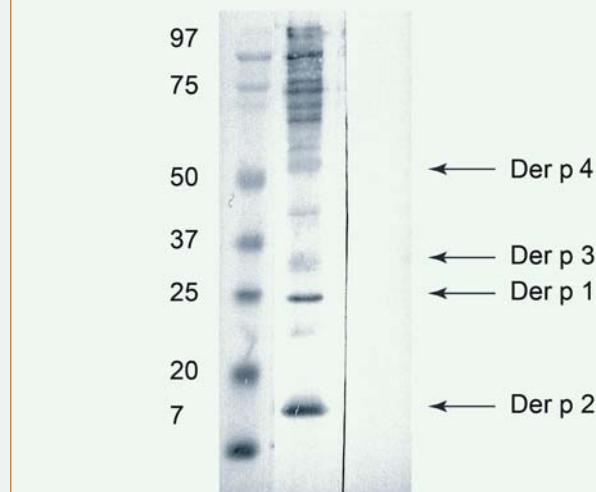
Кроме того, выполнялись дополнительные исследования сравнения результатов иммуноферментной тест-системы с данными кожных скарификационных проб. Последние считаются более точными, но являются инвазивными, что накладывает на них проведение ряда ограничений.

Для оценки специфичности и чувствительности аллергенов пыльцы бересклета и клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*, которые рассматриваются в качестве примеров, был использован биоматериал, предоставленный клиникой детских болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и ГУЗ «Детская городская больница №1». Для сравнительного анализа были отобраны две панели сывороток крови пациентов. В основную группу вошли сыворотки больных, страдающих атопическими заболеваниями с клиническими проявлениями и подтвержденными результатами тестов *in vivo*. В контрольную группу вошли сыворотки практически здоровых лиц с отрицательными результатами кожных тестов.

ИФА-анализ с тест-системой «ImmunoCAP» дал 90 положительных и 86 отрицательных результатов на эти аллергены. При использовании наших биотинилированных аллергенов с набором реагентов «АллергоИФА — специфические IgE» были установлены высокие показатели специфичности и чувствительности по отношению к сравниваемой тест-системе «ImmunoCAP». Так, для клеща домашней пыли специфичность была равна 95%, тогда как для аллергена бересклета этот показатель составил 100%. Чувствительность изученных аллергенов составила 95% и 98%, соответственно, что также



**Рисунок 3.** Иммуноблот аллергена пыльцы березы с «+» и «-» пулами sIgE сывороток. М — маркер.



**Рисунок 4.** Иммуноблот аллергена клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* с «+» и «-» пулами sIgE сывороток.

свидетельствует о высокой диагностической эффективности используемого теста.

Для проведения сравнительного анализа результатов использования тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» с показателями кожных скрипификационных проб были отобраны 48 образцов сывороток крови пациентов, у которых были отмечены 42 положительных и 6 отрицательных кожных реакций на аллергены бересклета (24 образца) и клеща домашней пыли (24 образца). У тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» для аллергена бересклета частота совпадений результатов определения sIgE с кожными скрипификационными пробами составила 72%, а для аллергена *Dermatophagoides pteronyssinus* — 71%. У референсной тест-системы «ImmunoCAP» аналогичный показатель был равен соответственно 79% и 75%. Незначительная разница в значениях этого показателя свидетельствует о высокой диагностической ценности тест-системы «АллергоИФА — специфические IgE» и, соответственно, подтверждает хорошее качество полученных биотинилированных аллергенов.

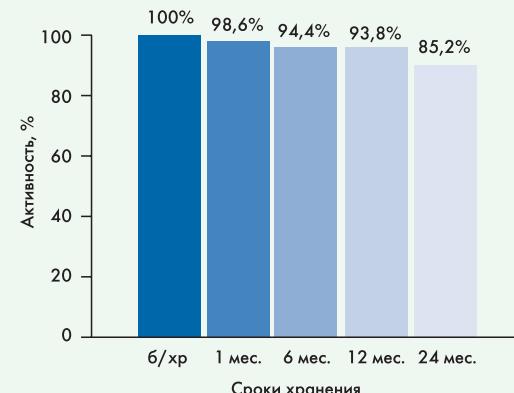
Таким образом, разработанная нами технология получения биотинилированных аллергенов доказала свою эффективность и обеспечила достаточно высокую диагностическую ценность отечественной тест-системе «АллергоИФА — специфические IgE». На протяжении двух лет получено около 130 биотинилированных аллергенов, характеризующихся высокой чувствительностью, специфичностью и хорошей стабильностью, предназначенных для использования в тест-системе «АллергоИФА — специфические IgE». Указанная тест-система и аллергены к ней имеют регистрационное удостоверение Росздравнадзора РФ и разрешены к использованию на территории России. Коллектив лаборатории аллергологии планирует в будущем увеличить список биотинилированных аллергенов до 300 наименований. При этом расширение номенклатуры будет проводиться за счет аллергенов, достаточно редко востребованных клинической практикой. В этом, очевидно, нет коммерческой выгоды для компании «Алкор Био», однако разработка и доведение до готовой формы большого числа аллергенов безусловно расширит возможности аллергodiагностики и будет способствовать более успешной борьбе с аллергическими заболеваниями в нашей стране.

Еще одним перспективным направлением, по которому ведется исследовательская работа, является разработка и включение в тест-систему «АллергоИФА-специфические IgE» рекомбинантных аллергенов. Это специальные аллергенные молекулы, полученные

методом генной инженерии, но первоначально выделенные из аллергенного экстракта. Современные технологии позволяют не только определить структуру важнейших аллергенных белков, но и получить их в больших количествах с помощью генной инженерии. Использование рекомбинантных аллергенов в иммуноферментных тестах откроет новые возможности для *in vitro* диагностики IgE опосредованных аллергических реакций. В частности, применение тестов на отдельные компоненты аллергенов поможет клиницистам получить более детальную информацию об аллергических заболеваниях у пациентов. Кроме того, рекомбинантные аллергены весьма перспективны для выявления перекрестных реакций к различным аллергенам. Их использование обеспечит проведение высокоточной лабораторной диагностики, с помощью которой возможно получение необходимых данных для назначения эффективной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

**Коллектив лаборатории аллергологии с уверенностью и оптимизмом смотрит в будущее, надеясь успешно продолжить работу по дальнейшему совершенствованию оригинальной тест-системы компании «Алкор Био» «АллергоИФА-специфические IgE» и расширению спектра наименований биотинилированных аллергенов.**

*Ссылки на литературные источники сохраняются в издательстве и высыпаются по просьбе читателей.*



**Рисунок 5.** Динамика стабильности аллергена пыльцы бересклета в режиме реального времени.

# ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



**ВСЕ ГОТОВО, ЧТОБЫ ОБНАРУЖИТЬ ИХ**

- ✓ Готовые жидкие реагенты
- ✓ 100 % чувствительность и специфичность
- ✓ Быстрые и надежные результаты скрининга

## Гепатит В количественное и качественное определение

- Скрининг, мониторинг и контроль терапии гепатита В
- Достоверное подтверждение диагноза
- 100% чувствительность; 99,5% специфичность
- Диапазон определяемых концентраций 0 – 5 МЕ/мл, возможность разведения образцов

## ВИЧ-инфекция тест-системы 4-го поколения

- Одновременное определение антител к ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1
- Одностадийный «сэндвич»-метод
- 100% чувствительность; 100% специфичность
- Короткое время основной инкубации: 60 минут

## Автоматический анализатор «Alisei Q.S.» для скрининга инфекционных заболеваний

- Качественное определение специфических антител к вирусу гепатита С
- 100% чувствительность; 100% специфичность
- Короткое время основной инкубации: 30 + 30 минут

## ToRCH-комплекс IgM, IgG, IgG-авидность

- Количественный метод определения IgG
- Определение авидности – подтверждение или исключение первичной инфекции
- Технология «capture» для определения IgM – отсутствие ложноположительных результатов, повышение чувствительности методики



# 20 лет на службе лабораторной диагностики – от классики до инноваций

## ИФА тест-системы

- Гормоны
- Инфекции
- Онкомаркеры
- Аллергодиагностика



## Микрочипы

- Молекулярно-генетическая диагностика муковисцидоза и аллергии



## Мощная производственная база

- 7500 кв. м
- Автоматизация всех стадий производственного процесса
- Высокотехнологичное оборудование
- ISO 13485:2003

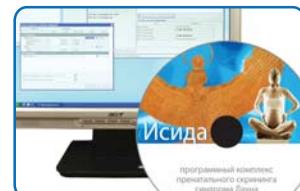


## Научный потенциал

- Собственные научно-исследовательские лаборатории
- Высококвалифицированный персонал
- Запатентованные технологии
- Реализация инновационных проектов



## Оборудование и программное обеспечение для современной лаборатории



## Техническая и консультативно-методическая поддержка

