

основе реакции ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера (PEXT) с последующим биолюминесцентным твердофазным микроанализом. Геномную ДНК предварительно амплифицировали, используя праймеры, фланкирующие полиморфный сайт (dbSNP: rs6025). Продукты ПЦР использовали как матрицы для двух PEXT реакций. Анализ продуктов проводили с использованием химических конъюгатов обелин-стрептавидин. Генотип каждого из образцов геномной ДНК определяли по соотношению биолюминесцентного сигнала от удлинения N-праймера (G-аллель) и сигнала от удлинения M-праймера (A-аллель) (дискриминационный фактор (DF)). Полученные результаты совпали с данными ПЦР анализа в реальном времени с использованием коммерческих наборов ООО «НПФ Литех» для тех же образцов ДНК. Коэффициент вариации DF составил 14,1% для гетерозиготного варианта G/A и 19,8% для нормального генотипа G/G. Для повышения производительности генотипирования разработан метод одновременного выявления аллелей в одной лунке с использованием двух биолюминесцентных репортеров: фотопротенина обелина и целентеразин-зависимой люциферазы *Renilla muelleri*. Биолюминесцентный сигнал обелина свидетельствует о наличии нормального аллеля, а сигнал люциферазы – о наличии мутантного аллеля. Использование двух биолюминесцентных репортеров позволяет проводить анализ обоих аллелей в одной лунке, и таким образом удвоить количество образцов, анализируемых на одном планшете, а применение СВР вместо свободного целентеразина для запуска биолюминесценции люциферазы существенно упрощает процедуру анализа.

*М. А. Суховольская, Т. Н. Субботина, И. А. Ольховский, К. П. Базарин. Мутации в генах метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и метионинсинтазы (MTR) и факторы риска гипергомоцистеинемии у спортсменов.* Красноярский филиал ФГБУЗ ГНЦ Минздрава развития РФ, КНЦ СО РАН, Сибирский федеральный университет, Красноярск

## ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*В. А. Зимица, М. Н. Зенина, А. В. Козлов, Н. К. Губаренко. Исследование ликвора при онкогематологических заболеваниях.* ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

Цель исследования – оценка состава ликвора при онкогематологических заболеваниях. Задачи – оценить концентрацию белка, цитоз и клеточный состав в ликворе у больных до начала лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), осложненного нейролейкозом, и множественной миеломы (ММ).

Использовали люмбальный ликвор, полученный от 41 больного (мужчины – 24, женщины – 17, возраст от 27 до 49 лет; диагноз ОЛЛ установлен у 15 пациентов, ММ – у 26).

Готовили препараты из осадка ликвора седиментационным методом с использованием модификации аппарата Сайка с последующей окраской азур-эозином. Концентрация белка в ликворе составила у пациентов с ОЛЛ –  $0,27 \pm 0,03$  г/л, с ММ –  $0,32 \pm 0,02$  г/л, цитоз при ОЛЛ составил  $3-950 \cdot 10^6$ /л, при ММ  $0,3-10,6 \cdot 10^6$ /л. При ОЛЛ выявлены бластные клетки в количестве от 8 до 68%. При ММ бластные клетки не были обнаружены, у 4-х пациентов были выявлены плазматические клетки в количестве от 2 до 8%. Лимфоциты были обнаружены у всех пациентов в количестве от 1 до 73%. У 8 пациентов с ОЛЛ макрофаги обнаружены в количестве от 1 до 14%, при ММ менее чем в половине случаев были найдены макрофаги в количестве, превышающем остальные клетки – сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты и моноциты в 2 раза.

Хорошо известны наследственные особенности обмена метионина, негативный эффект которых в отношении развития гипергомоцистеинемии (ГГЦ) может усиливаться при интенсивных физических нагрузках и употреблении некоторых «спортивных» диет. В связи с этим обсуждается целесообразность скрининга спортсменов на носительство мутаций ферментов обмена метионина с целью разработки индивидуальных профилактических программ.

Цель работы – выявление зависимости концентрации гомоцистеина (ГЦ) в крови спортсменов с мутациями C677T (Ala222Val) в гене MTHFR (rs1801133) и A2756G (Asp919Gly) в гене MTR (rs1805087). Группу обследованных составили 50 спортсменов, представляющих различные виды спорта, имеющие 1-й разряд и выше, а в контрольную группу вошли 57 условно здоровых лиц, не испытывающих высоких физических нагрузок, придерживающихся обычной схемы питания. Показано статистически достоверное увеличение концентрации ГЦ в крови спортсменов, имеющих гомозиготное состояние гена C677T MTHFR по сравнению со спортсменами, не имеющими мутацию ( $p < 0,001$ ), или имеющими гетерозиготный аллель ( $p = 0,002$ ). Достоверных изменений уровня ГЦ у здоровых лиц, имеющих гомозиготный полиморфизм гена MTHFR не обнаружено. У спортсменов, имеющих мутацию C677T в гене MTHFR в гомозиготном состоянии показано статистически достоверное ( $p = 0,005$ ) повышение уровня ГЦ по сравнению с контрольной группой гомозиготных лиц. В отношении мутации A2756G в гене MTR у спортсменов, имеющих такую мутацию в гетерозиготном состоянии, показано статистически достоверное ( $p = 0,015$ ) понижение уровня ГЦ по сравнению с контрольной группой лиц, гетерозиготных по исследуемому полиморфизму. Таким образом, спортсмены, имеющие мутацию C677T в гене MTHFR, входят в потенциальную группу высокого риска развития ГГЦ. А гетерозиготное носительство мутации A2756G в гене MTR у спортсменов можно рассматривать в качестве протективной в отношении развития ГГЦ.

Уровень белка в ликворе у пациентов с ОЛЛ и ММ существенно не различался. При ОЛЛ, осложненном нейролейкозом, в ликворе были обнаружены бластные клетки, при ММ – плазматические клетки. В связи с трудностями, возникающими при морфологическом изучении клеток ликвора пациентов с онкогематологическими заболеваниями, необходимо проведение дополнительных методов, включающих цитогенетические исследования и иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител.

*Е. Р. Кулюцина, В. П. Савельев, О. А. Глебова, Л. А. Сорочкина. Информативность гематологических показателей при клинико-лабораторном обследовании пациентов с сосудистой деменцией.* ГБОУ ДПО Пензенский институт усовершенствования врачей Минздрава развития РФ, ГБУЗ Областная психиатрическая больница им. К. Р. Евграфова, Пенза

Пусковым механизмом развития сосудистой деменции зачастую являются инфекционные болезни мозга (энцефалиты, менингиты и др.), ведущие к церебральным повреждениям, которые учитываются как этиологический фактор при определении формы помощи и методов патогенетической терапии. Этиотропное лечение возможно при верификации диагноза органического заболевания мозга (дисфункции), в том числе связанного с нейроинфекцией (бактериальной, вирусной).

Цель исследования – оценка эффективности лаборатор-

ных показателей общего анализа крови (ОАК) и индексов интоксикации в качестве интегральных методов оценки скрытых воспалительных и аутоиммунных процессов, степени развития эндогенной интоксикации у больных с сосудистой деменцией на этапе оказания стационарной помощи.

Под наблюдением находились пациенты с сосудистой деменцией (18 женщин и 3 мужчин) в возрасте от 81 до 94 лет, находившиеся на стационарном лечении в психотерапевтическом отделении психиатрической больницы. Общий анализ крови выполнялся на автоматическом гематологическом анализаторе. Были рассчитаны индексы интоксикации – ЛИИ по Кальф-Калифу, ядерный индекс (ЯИ), индекс лимфоциты–СОЭ (ИЛСОЭ), индекс сдвига (ИС), интегральный индекс (ИнТИ).

В показателях красной крови у 15 % пациентов отмечалось незначительное снижение уровня гемоглобина до 106–110 г/л. Так же у 15% имелись признаки гемоконцентрации: количество эритроцитов достигало  $6,13 \cdot 10^{12}/л$ , уровень гемоглобина 165 г/л. СОЭ были значительно повышены у 57% пациентов до 27–52 мм/ч. Это могло быть результатом диспротеинемии как при воспалительных, так и опухолевых процессах.

Количество тромбоцитов у всех пациентов было в пределах нормы. Несмотря на то что количество лейкоцитов у всех не превышало  $9 \cdot 10^9/л$ , интегральные показатели выявили явную патологию. ЛИИ был повышен у 64,3% пациентов (в среднем составил  $1,65 \pm 0,83$ ), ИЛСОЭ у 85,7% ( $6,61 \pm 3,93$ ). В пользу аутоиммунных и отсутствия воспалительных процессов, связанных с бактериальной инфекцией, говорило повышение ИС только у 14,2% и повышение ИИ у 92,9% ( $0,437 \pm 0,11$ ). ЯИ был повышен у большинства пациентов и отражал легкую (57,2%), среднюю (7,2%) степень тяжести состояния. С тяжелой степенью тяжести пациентов не было. Показатели ИнТИ, в расчете которого использовались уровни молекул средней массы (МСМ 254) и креатинина, были повышенными по сравнению с таковыми у доноров в 35,7%, варьировали от 7,71 до 11,32.

Таким образом, в качестве дополнительных и информативных тестов для оценки тяжести эндогенной интоксикации у больных с сосудистой деменцией на этапе стационарной помощи можно предложить доступные интегральные индексы интоксикации, не требующих дополнительных денежных затрат, и которые возможно автоматически рассчитать при наличии соответствующего программного обеспечения.

*С. А. Луговская, М. Е. Почтарь, Е. В. Наумова, О. С. Плеханова, Д. Г. Кисилевичина, Н. В. Цветаева, Е. А. Михайлова.*  
**Оценка ретикулоцитов при пароксизмальной ночной гемоглобинурии с использованием проточной цитофлуориметрии.** ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Москва

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) – редкое приобретенное заболевание, характеризующееся соматической мутацией гена PIGA, что приводит к нарушению синтеза гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) якоря, осуществляющего фиксацию целого ряда молекул (так называемых GPI-связанных белков) на мембранах клеток крови (CD59, CD55, CD14, CD16, CD24, CD48 и др.). Вследствие полного или частичного дефицита GPI-связанных белков эритроциты подвергаются внутрисосудистому гемолизу под действием системы комплемента, что и определяет клинические проявления заболевания. Размер эритроцитарного ПНГ-клона варьирует в зависимости от степени выраженности гемолиза, и он всегда меньше по сравнению с гранулоцитарным и моноцитарным клоном. В связи с этим представляет интерес изучить GPI-связанные белки на ретикулоцитах (RET) и сопоставить размеры ретикулоцитарного и эритроцитарного ПНГ-клона, сравнив их с размером ПНГ-клона среди моноцитов и гранулоцитов.

Исследование проведено с использованием проточной цитофлуориметрии на цитометре FC500 (Beckman Coulter) с применением геитирующих антител CD235a FITC для эритроцитов, CD15PE/CD45PC-7 для гранулоцитов, CD64PC-5/CD45PC-7 для моноцитов, и антител к GPI-связанным белкам CD59PE, FLAERFITC/CD24PC-5, FLAERFITC/CD14PE для эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов, соответственно. Оценка ретикулоцитарного ПНГ-клона производилась с помощью Retic-Count Reagent (Becton Dickinson) и CD59PE.

Исследование проведено у 42 больных: 21 – с апластической анемией (АА), 16 – с подозрением на ПНГ, 5 – миелодиспластическим синдромом – рефрактерной анемией (МДС-РА). У 23 пациентов выявлен ПНГ-клон ( $n = 13$  с АА,  $n = 8$  с ПНГ,  $n = 1$  с МДС-РА), который обнаруживался как среди эритроцитов, так и RET, гранулоцитов и моноцитов. Размер RET ПНГ-клона всегда был больше, чем эритроцитарного и приближался к размеру клона среди гранулоцитов и моноцитов. В 2-х наблюдениях АА ретикулоцитарной ПНГ-клон составлял 3,2% и 4,1%, в то время как среди эритроцитов он не выявлялся. Минорный ПНГ-клон (< 1%) обнаружен в 2 случаях, в одном из них он выявлен только среди RET, эритроцитарный ПНГ-клон отсутствовал.

Таким образом, исследование ретикулоцитов при ПНГ дает дополнительную информацию о существовании ПНГ-клона. По сравнению с эритроцитами, количество ретикулоцитов с дефицитом CD59 дает возможность более точной оценки ПНГ-клона, особенно в случаях обнаружения минорного клона (менее 1%).

*Г. В. Никитина, А. А. Славинский.*  
**Цитохимические маркеры активации нейтрофильных лейкоцитов при гипертиреозе.** Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Гипертиреоз проявляется аутоагрессивным воздействием на клетки и ткани организма, что приводит к активации нейтрофильных лейкоцитов (НЛ). Маркерными ферментами активации НЛ является щелочная фосфатаза (ЩФ) и НАДФН-оксидаза. Цель работы – оценить активность ЩФ и НАДФН-оксидазы НЛ крови у больных с гипертиреозом.

Исследованы лейкоконцентраты венозной крови 22 больных с диффузным токсическим зобом. Контрольную группу составили 20 относительно здоровых лиц. Щелочную фосфатазу выявляли способом азосочетания, активность НАДФН-оксидазы определяли с помощью НСТ-теста. Визуально оценивали процент положительно реагирующих клеток (ППК), вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК).

Проведенное исследование показало, что при гипертиреозе ППК ЩФ увеличивается в 1,7 ( $p < 0,001$ ) раза до  $81,9 \pm 0,35\%$ , при этом СЦК фермента составляет  $0,91 \pm 0,09$  отн. ед., что в 1,3 раза выше, чем у группы контроля. У пациентов с гипертиреозом циркулирует  $59,6 \pm 2,2\%$  формазан положительных НЛ, активность фермента равна  $1,94 \pm 0,06$  отн. ед. Сравнительно с контрольной группой у больных диффузным токсическим зобом ППК НАДФН-оксидазы возрастает в 5 раз, а СЦК фермента выше, чем у здоровых лиц в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ).

В результате исследования выявлено, что при гипертиреозе в активированных НЛ крови значительно возрастает активность НАДФН-оксидазы, что провоцирует избыточную генерацию токсичных радикалов кислорода, усугубляющих повреждение тканей. Полученные данные могут служить дополнительными лабораторными диагностическими критериями для прогнозирования осложнений гипертиреоза.

*М. Е. Почтарь, С. А. Луговская, Е. В. Наумова, Д. Г. Кисилевичина, О. С. Плеханова, А. С. Миненков.*  
**Использование гематологического анализатора ADVIA 2120 для расширенной характеристики эритроцитов у больных с различными формами анемий.** ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития РФ, ГБУЗ ГКБ им. С. П. Боткина, Москва

Анемии разнообразны по своему механизму развития и часто имеют смешанный патогенез. Успешная терапия анемий во многом зависит от точной и своевременной диагностики характера изменения эритропоэза, которые находят свое отражение в характеристиках эритроцитов.

Исследование периферической крови проводили на гематологическом анализаторе ADVIA 2120 (Siemens) у 72 больных с анемией, из которых 61 человек с подозрением на пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ) [ $n = 33$  – с апластической анемией (АА)],  $n = 14$  – миелодиспластическим синдромом–рефрактерной анемией (МДС–РА),  $n = 14$  – ПНГ), 14 больных с железодефицитной анемией (ЖДА)]. Оценивались как классические (RBC, Hb, MCV, MCHC, RET), так и дополнительные эритроцитарные параметры (CHCM, CH, %Hуро, %Hурег, %Micro, %Macro, MCVr, CHCMr). Исследование ПНГ-клона проводили на проточном цитофлюориметре FC 500 (BeckmanCoulter) при помощи 4-цветной проточной цитометрии.

Для статистического анализа данных использовались значения медианы распределения (Me). Из 33 больных с АА ПНГ-клон выявлен у 17 пациентов. Существенных отличий в характере анемии между больными с наличием или отсутствием ПНГ-клона не наблюдалось. Анемия носила гиперхромный, нормо- или макроцитарный ( $MCH_{Me} = 32,50$  пг и  $34,2$  пг;  $MCV_{Me} = 94,10$  фл и  $102,85$  фл соответственно) характер, %Hуро RBC были в пределах нормы. Процент ретикулоцитов (%RET) колебался в пределах нормы (%RET<sub>Me</sub> – 0,93% и 1,17% соответственно), в то же время абсолютное число ретикулоцитов (#RET) находилось на нижней границе нормы (#RET<sub>Me</sub> –  $29,7 \cdot 10^9/л$  и  $34,0 \cdot 10^9/л$  соответственно), наблюдалась тенденция к макроцитозу ( $MCVr_{Me} = 129,0$  фл и  $131,1$  фл соответственно).

Из 14 больных МДС у 3 был выявлен ПНГ-клон. Характеристики эритроцитарных параметров данной группы были аналогичны таковым при АА.

У 14 больных ПНГ анемия имела нормоцитарный характер ( $MCV_{Me} = 93,45$  фл; диапазон 79,8–116,4 фл) с тенденцией к гипохромии ( $MCH_{Me} = 28,1$  пг; диапазон 21–34 пг), при этом %Hуро RBC колебался в пределах 1,8–75,7% (%Hуро<sub>Me</sub> = 27,6), %Micro варьировал от 0,7% до 11,4% (%Micro<sub>Me</sub> = 2,6%). Отмечался относительный ретикулоцитоз (%RET<sub>Me</sub> = 3,6%, #RET<sub>Me</sub> =  $99,25 \cdot 10^9/л$ ) с тенденцией к макроцитозу ( $MCVr_{Me} = 122,25$  фл) и гипохромии ретикулоцитов ( $CHCMr_{Me} = 266,0$  г/л).

Среди 14 больных ЖДА с классической картиной микроцитарной ( $MCV_{Me} = 71,6$  фл; диапазон 63–91,2 фл) гипохромной ( $MCH_{Me} = 20,9$  пг; диапазон 16,8–24,4 пг) анемией ПНГ-клон отсутствовал. Процент гипохромных эритроцитов (%Hуро) в данной группе составлял от 16,8 до 77,2% (%Hуро<sub>Me</sub> = 26,75%), количество микроэритроцитов колебалось в пределах 2,0–48,8% (%Micro<sub>Me</sub> = 17,2%). Относительное и абсолютное число ретикулоцитов было в пределах

нормы (%RET<sub>Me</sub> = 1,1%, #RET<sub>Me</sub> =  $45,6 \cdot 10^9/л$ ) с выраженным микроцитозом и гипохромией ретикулоцитов ( $MCVr_{Me} = 96,1$  фл,  $CHCMr_{Me} = 253,00$  г/л).

Таким образом, исследование дополнительных эритроцитарных параметров на гематологическом анализаторе ADVIA 2120 (Siemens) позволяет дать более точную оценку изменениям эритроцитов при различных видах анемий.

*Н. Н. Руденко, К. П. Базарин, И. А. Ольховский, У. В. Зыкова.* **Возможности автоматизированной оценки фракций ретикулоцитов в практике медицинского контроля тренировочного режима спортсменов.** КНЦ СО РАН, Красноярский филиал ФГБУЗ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Сибирский федеральный университет, Красноярск

Одной из важных физиологических реакций организма, определяющих адаптацию спортсмена к высокой физической нагрузке, является мобилизация эритроидного ряда форменных элементов и поддержание адекватной кислородтранспортной системы крови. Обусловленный повышенной потребностью тканей спортсмена в кислороде выброс эритропоэтина вызывает выход в периферическое русло молодых ретикулоцитов, являющихся в физиологических условиях показателем чувствительности системы к стимулирующему действию эритропоэтина. Различное содержание рибонуклеиновых кислот в созревающих ретикулоцитах лежит в основе дифференцировки молодых и зрелых клеток в современных многопараметровых гематологических анализаторах. Цель работы – оценка соотношения субпопуляций ретикулоцитов в периферической крови спортсменов-разрядников в различные фазы соревновательно-тренировочного цикла, характеризующиеся разным уровнем физических нагрузок. В исследовании участвовали спортсмены-разрядники: 40 юношей и 17 девушек. Исследование проводили на гемоанализаторе Sysmex-XT-2000i. Исследование выявило закономерные отличия мужчин и женщин в уровне эритроцитов и гемоглобина, вместе с тем и у юношей и у девушек наблюдалось значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение фракции незрелых ретикулоцитов (IFR): у мужчин до 6,4% на пике нагрузки и до 8,1% в первые дни после соревнований по сравнению с 5,5% в период снижения нагрузок и у женщин до 4,9% и до 9,3% по сравнению с 4,3% соответственно. При этом фракция наиболее зрелых ретикулоцитов (LFR) в течение выбранных фаз тренировочного процесса пропорционально снижалась ( $p > 0,05$ ), а общее число ретикулоцитов значимо не менялось. Включение в программу лабораторного обследования спортсменов показателей зрелости ретикулоцитов периферической крови позволяет определять уровень напряженности и адекватности эритропоэза у спортсмена и входить в меню критериев для коррекции индивидуальных тренировочных планов и медицинских мероприятий.