

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.316-008.84:577.175.624]-078.33-073.537.9

Н. П. Гончаров, Г. В. Каця, А. Д. Добрачева, Н. М. Малышева

АНДРОГЕННЫЙ ДЕФИЦИТ И ПРОБЛЕМЫ ЕГО ДИАГНОСТИКИ СОВРЕМЕННЫМИ НЕИЗОТОПНЫМИ МЕТОДАМИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

ФГУ Эндокринологический научный центр (дир. — член-корр. РАМН, проф. Г. А. Мельниченко)
Росмедтехнологий, Москва

Современные методы гормонального иммуноанализа общего и свободного тестостерона (Т) в крови в большинстве случаев не обеспечивают достаточной диагностической точности. Результатом анализа этой проблемы явилось официальное заявление Международной ассоциации эндокринологов в 2007 г. о недопустимости использования прямых методов иммуноанализа, включая все анализаторы, для определения Т у женщин и детей. Идеально для определения стероидных гормонов должен быть использован в качестве референтного метода — метод тандем-масс-спектрометрии (TD-MS), который гарантирует точность, специфичность и снижение эффекта матрикса при количественном измерении Т или любого другого стероида. В работе представлен обзор преаналитических и аналитических факторов, влияющих на диагностическую точность оценки андрогенного статуса у мужчин, женщин и детей.

Введение нами в диагностическую практику специфичной и высокочувствительной (8,7 пмоль/л) технологии люминесцентного иммуноанализа свободного Т в слюне значительно улучшило диагностическую точность определения Т как у мужчин, так и у женщин и детей. В работе также представлены собственные результаты определения свободного Т в микрообъемах слюны у здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом с учетом физиологических суточных колебаний. Показано, что показатели свободного Т в слюне в сочетании с клинической симптоматикой могут быть использованы как объективный и адекватный критерий диагностики различных форм андрогенного дефицита у мужчин.

Ключевые слова: тестостерон, андрогены, дефицит, диагностика.

Current hormonal immunoassays of blood total and free testosterone fail to provide an adequate diagnostic accuracy in most cases. The official statement made by the International Association of Endocrinologists in 2007 on the inadmissibility of using direct immunoassays, including all analyzers, to measure testosterone in women and children is a result of an analysis of this problem. Tandem mass-spectrometry (TD-MS) that guarantees accuracy, specificity, and a reduction in the effect of a matrix on measurement of testosterone or any other steroid should be ideally used as a reference technique. The paper reviews preanalytical and analytical factors influencing the diagnostic accuracy of evaluation of the androgen status in males, females, and children.

A specific and highly sensitive (8.7 pmol/l) technology of luminescence immunoassay of salivary free testosterone, which had been introduced into diagnostic practice, considerably improved the diagnostic accuracy of determination of testosterone in both males and females and children. The paper also presents the authors' results of determination of free testosterone in salivary microvolumes in healthy and androgen-deficiency males, by taking into account physiological diurnal variations. The values of salivary free testosterone in combination with clinical symptoms are shown to be used as an objective and adequate hormonal marker of diagnosis of different forms of male androgen deficiency.

Key words: testosterone, androgens, deficiency, diagnosis.

Во второй половине прошлого века произошла технологическая революция в методах определения гормонов и других биологически активных соединений. Ее обеспечило открытие технологии радиоиммуноанализа (РИА). Разработка методов получения высокоспецифичных поликлональных, а позже моноклональных антисывороток к различным низкомолекулярным лигандам позволила использовать методы РИА не только в эндокринологии, но и в фармакологии, физиологии и других областях медицины.

В РИА-методах для стероидных гормонов на преаналитическом этапе использовалась их экстракция из биологического материала соответствующими органическими растворителями. А в необходимых случаях проводилось хроматографическое выделение стероидов. Использование в РИА-методах изотопной метки создавало определенные трудности в их эксплуатации, включая экологические. Поэтому академические лаборатории и коммерческие компании создали неизотопные методы иммуноанализа, включая иммуноферментные (ИФА) методы, затем методы второго и третьего поколения с высокой разрешающей способностью, где применялись люминесцентная и флюоресцентная метки.

Переход на автоматизированные системы иммуноанализа обеспечивал высокую производительность, что в комбинации с оперативностью получения результатов сделало их экспресс-методами в диагностике эндокринных нарушений. Однако по мере их эксплуатации и накопления полученных данных возникли проблемы, прежде всего для группы близкородственных по химической структуре стероидных гормонов. В последние 5 лет опубликована целая серия оригинальных работ, в которых доказана неадекватность определения в крови общей циркуляции таких гормонов, как тестостерон (Т), эстрадиол, и других стероидов прямыми неэкстракционными методами, включая практически все используемые анализаторы с их химической составляющей. Как правило, они принципиально завышают концентрацию гормона, что входит в противоречие с клиническими проявлениями заболеваний.

Более того, практика быстрого получения результатов из лаборатории, не гарантирующая (все выполняет автомат) правильности определения гормонов, приводит к ослаблению анализа клинических проявлений заболевания, а во многих случаях и к неправильному лечению. Итогом многочисленных обсуждений этой проблемы междуна-

родным сообществом было официальное заявление Международной ассоциации эндокринологов в 2007 г. [27] о недопустимости использования прямых методов иммуноанализа, включая все анализаторы, для определения Т у женщин и детей. В настоящее время крупные лаборатории США и Европы применяют для определения Т и других стероидов высокочувствительную и высокоточную технологию тандем-масс-спектрометрии (TD-MS). Для этой цели рекомендуются масс-спектрометры фирмы "API"-3000/5000 или фирмы "Waters/Micromass Quattro".

Диагностика гипогонадизма у мужчин по уровню Т, особенно возрастного дефицита Т с использованием анализаторов, должна быть прежде всего тщательно соотнесена с его клиническими проявлениями. В представленной работе наряду с обсуждением обозначенной проблемы отражен также собственный опыт авторов и даны методические разработки для улучшения диагностики андрогенного дисбаланса по уровню свободного тестостерона (св. Т).

Т — основной гормон мужского организма. Главные его биологические функции — развитие, формирование и обеспечение мужского фенотипа и сперматогенеза. У женщин Т обеспечивает рост, метаболизм костной ткани, ее ремоделирование и поддержание анаболических процессов, особенно в мышечной ткани.

Высокочувствительный и специфический метод определения Т необходим для диагностики многих клинических состояний. Как известно, концентрация Т в крови у женщин низкая и не превышает 7% от его содержания в крови взрослых мужчин. Аналогичная ситуация характерна и для детей, что значительно затрудняет количественное определение Т. Вместе с тем оценка андрогенного статуса у женщин необходима при широком спектре клинических симптомов и патологических состояний, например таких, как гирсутизм, акне, алопеция, андрогенсекретирующие опухоли яичников и надпочечников. Его определение также очень важно для выбора минимальной дозы, необходимой для подавления продукции андрогенов у женщин с гиперандрогенией [6, 21, 24, 39]. У детей точное количественное определение Т необходимо для установления половой принадлежности новорожденного с необычными, измененными гениталиями, а также для динамического наблюдения за детьми с задержкой пубертата и преждевременным половым развитием. Динамический мониторинг уровня Т требуется пациентам с выявленной врожденной дисфункцией коры надпочечников (ВДКН) вследствие дефицита 21-гидроксилазы и некоторых других ферментных систем стероидогенеза. Мониторинг за уровнем Т необходим также при проведении антиандрогенной терапии определенных форм дисгормонального рака и, в частности, при лечении рака предстательной железы пролонгированными препаратами люлиберина (фармакологическая кастрация; широко используется в настоящее время). Точное количественное определение Т необходимо для диагностики распространенного возрастного андрогенного дефицита (прежнее название PADAM). Сниженный уровень общего тестостерона

на (об. Т) у мужчин в возрасте 40—60 лет регистрируется в 7% случаев, а в возрасте 60—80 лет — в 21% случаев.

Преаналитические факторы, влияющие на уровень тестостерона

Сезонные колебания уровня Т. По данным J. Svarberg и соавт. [32], сезонные колебания концентрации об. Т достигают 19%, а свободного — 31%. Наиболее низкие концентрации регистрируются летом, пиковые — осенью. Они также зависят от региона проживания. Приведенную разницу в уровнях, естественно, необходимо учитывать при выполнении продолжительных исследований.

Суточные колебания. Как известно, 50—60% об. Т с высокой аффинностью связано с секс-стероид-связывающим глобулином (СССГ), а 40—50% — с альбумином (легко диссоциирующая связь). Только 1—2% Т циркулирует в свободной форме (св. Т) и вместе со связанным с альбумином Т они обозначаются как биодоступный Т (био. Т). Суточные колебания био. Т достигают 57%, св. Т — 68%, тогда как колебания об. Т составляют 45%. Данный процесс обусловлен увеличением синтеза Т в ночное время с одновременным снижением связывающих белков вследствие особенностей гемодинамики организма в горизонтальном положении. С возрастом выраженный суточный ритм сглаживается, что также необходимо учитывать при выборке протокола клинических исследований [32].

Диета. Содержание Т во многом определяется временем приема пищи и ее составом. В большинстве проводимых или опубликованных работах этот фактор не учитывается. Взятие крови натощак или после легкого завтрака может существенно влиять на результаты определения Т. Еще в 1973 г. была опубликована работа, в которой зарегистрировано падение уровня Т в крови у здоровых мужчин после перорального приема глюкозы [40]. Позднее, при проведении глюкозотолерантного теста, наблюдалось падение концентрации об. Т на 15% через 30 мин, которое сохранялось на протяжении последующих 3 ч [18]. Причем зарегистрированное падение было не связано со снижением сигнала со стороны ЛГ, а обусловлено выбросом в кровь глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), который уменьшает импульсную продукцию Т. Наиболее важный эффект диеты — изменение содержания СССР, концентрация которого снижается при большом потреблении белка, жирной пищи и, наоборот, повышается при приеме вегетарианской пищи и диете, богатой клетчаткой [18]. Большое содержание свободных жирных кислот нарушает процесс связывания половых стероидов с СССР, что сказывается на уровне св. Т [38].

Алкоголь. В небольшой дозе алкоголь повышает уровень Т в крови на 20% у мужчин [28] и у женщин [16]. Хроническое злоупотребление алкоголем приводит к необратимым деструктивным изменениям клеток Лейдига и клеток Сертоли семенников, к развитию ожирения, повышению уровня эстрогенов, в результате формирует необратимый дефицит андрогенов в комбинации с эректильной дисфункцией.

Физическая активность. Чрезмерные физические нагрузки, например у молодых спортсменов, приводят к падению уровня как об. Т, так и св. Т [7].

Психосоматическое состояние организма. Стресс, как физический, так и психоэмоциональный, приводит к подавлению продукции Т через центральные механизмы — гипоталамус—аденогипофиз—гонадотропины. Кроме того, повышенный выброс кортизола ингибирует стероидогенез в клетках Лейдига [1, 3, 10, 11].

Сексуальная активность. Уровень как об. Т, так и св. Т повышается в процессе интимных отношений у обоих партнеров, мастурбация также сопровождается увеличением концентрации циркулирующего Т.

Курение. У курильщиков уровень об. Т и св. Т возрастает на 5—15% [36].

Преаналитический этап, связанный с получением проб крови и ее обработкой.

Сравнительно недавно экспериментально была четко обоснована схема получения сыворотки для последующего определения Т: отделение сыворотки от форменных элементов должно проходить в течение 6 ч при комнатной температуре или пробы крови могут храниться при 4°C до 48 ч, а затем их необходимо центрифугировать. Пробы сыворотки можно хранить при -20°C в течение 3 мес, а при -70°C больше 6 мес. Более продолжительное хранение проб сыворотки не гарантирует правильного определения концентрации Т, так как за это время может измениться сама технология определения гормона. Недопустимы также повторное замораживание и размораживание проб сыворотки, которые приводят к деструкции СССГ и неправильно определению уровня св. Т и био. Т. В случае определения Т с помощью экстракционного РИА-метода использование сыворотки или плазмы не имеет принципиального значения. Однако при применении неизотопных прямых методов исследования, включая автоматические анализаторы, необходимо использовать только сыворотку, так как в плазме определяется заниженная концентрация Т [8, 42]. Использование ЭДТА или цитрата для получения плазмы недопустимо для всех методов. Забор крови в стеклянные или пластиковые пробирки для получения сыворотки не влияет на результаты определения Т. Однако при использовании гелевого разделяющего компонента, что имеет место в вакуумтейнерах для взятия крови, происходит завышение результатов для об. Т до 28%, занижение уровня ФСГ на 43%, завышение общего Т₃ на 58%, Т₄ — на 34%. При одних и тех же вакуумтейнерах разные анализаторы могут генерировать различные результаты при определении того или иного гормона. Более подробно влияние различных экзогенных и эндогенных факторов на уровень об. Т изложены в цитируемой работе [5].

Проблемы иммуноанализа тестостерона автоматизированными системами

Начиная с конца 60-х годов прошлого века основным методом определения об. Т в сыворотке

являлся РИА-метод с предварительной экстракцией его этиловым эфиром. Он принципиально изменил возможности диагностики различных форм андрогенного дефицита. Однако использование радиоактивной метки в методах РИА создавало целый ряд проблем для гормональных лабораторий.

Наиболее популярной альтернативой РИА-методам стало развитие ИФА, где в качестве меченого компонента используется пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и др. Несколько позднее были созданы флюоресцентные методы (меченый компонент — европий), метод усиленной люминесценции (меченый компонент — люминол или акридин).

В настоящее время широко используются автоматизированные высокопроизводительные системы определения самых разных гормонов, включая Т. Многие коммерческие диагностические компании используют технологии люминесцентного анализа с регистрацией усиленного люминесцентного сигнала. Все вышеуказанные неизотопные методы являются "прямыми", т. е. определение об. Т проводится непосредственно в сыворотке, без предварительной экстракции его органическими растворителями, что увеличивает возможность одновременного определения и других стероидов, близких по химической структуре к молекуле Т.

Проведенный в последнее время целенаправленный анализ результатов определения Т в сыворотке крови с помощью автоматизированных систем по сравнению с референсным методом масс-спектрометрии показал наличие систематической ошибки анализаторов как в сторону завышения (в большинстве случаев), так и в сторону занижения уровня Т. В частности, обстоятельную работу опубликовали французские авторы [33], в ней проведена сравнительная характеристика 10 анализаторов с референсным методом масс-спектрометрии. Вывод авторов: использование вышеуказанной технологии прямых методов неприемлемо для определения низких концентраций Т у женщин и детей. Аналогичные результаты также опубликованы авторитетной группой авторов из США [41] и группой австралийских ученых [30]. Все авторы приходят к выводу о неприемлемости технологии прямых методов, включая ELISA, для определения низких концентраций Т, у мужчин и особенно у женщин и детей [17].

Аналогичные результаты были получены нами при сравнении 4 автоматизированных систем со стандартизированным РИА-методом [12]. Неприемлемое завышение результатов у мужчин было получено при определении концентрации об. Т ниже 10 нмоль/л (рис. 1). В результате принципиально снижается процент (до 20) выявления дефицита андрогенов, который, возможно, требует заместительной коррекции препаратами Т (рис. 2).

В 2004 г. в журнале "JCEM" была опубликована редакционная статья с аналогичными заключениями [22]. И, наконец, в начале 2007 г. напечатано официальное заявление Международной ассоциации эндокринологов о недопустимости использования прямых неэкстракционных методов для определения об. Т у женщин и детей, поскольку это

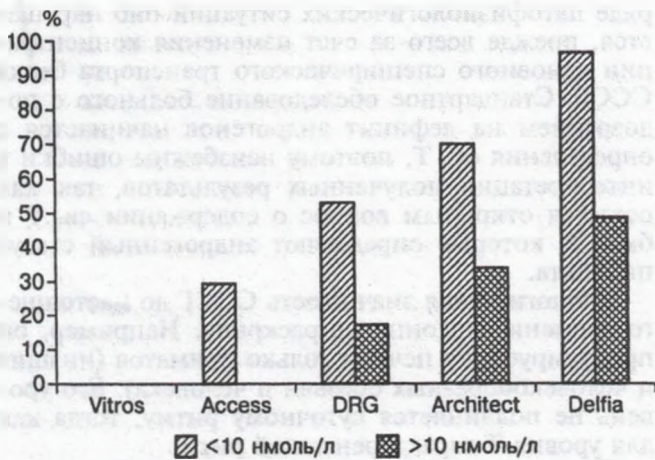


Рис. 1. Различия (в %) между концентрацией Т (медиана), полученной РИА- и неизотопными методами у мужчин с содержанием Т (по РИА) < 10 нмоль/л.

ведет к ошибкам в диагностике с последующим назначением неправильного лечения [27].

Методы масс-спектрометрии и их возможности

Любой из существующих методов иммуноанализа требует при его конструкции технологических разработок для каждого индивидуального гормона, включая основные компоненты, моноклональные антитела, с высокой специфичностью и чувствительностью. Особую сложность при создании тест-систем представляет класс стероидных гормонов и их активных метаболитов по химической структуре, многие из которых циркулируют в крови в очень низких концентрациях. Каждая диагностическая компания конструирует свой вариант метода, что затрудняет стандартизацию. Это одна из причин расхождения в результатах определения гормонов.

Появление и развитие современной технологии масс-спектрометрии в tandem с высокоразрешающим жидкостным хроматографом, обеспечивающей высокую производительность, практически 100% специфичность, необходимую чувствительность и воспроизводимость, открывают новую эру в биохимии стероидов. В отличие от прежнего, технологически трудоемкого, комплекса газовый хроматограф/масс-спектрометр (GCMS), современная tandem-масс-спектрометрия (TD-MS) не требует трудоемкой процедуры подготовки исследуемого биологического материала. При наличии подготовленного специалиста TD-MS может быть использована и уже используется в развитых странах для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях. Сравнительно недавно группа авторов из США [14] опубликовала блестящую работу, в которой продемонстрированы возможности технологии TD-MS с использованием масс-спектрометра API-3000 одновременно определять за 11 мин в 0,2 мл сыворотки 12 основных стероидных гормонов: ДГЭА-С, альдостерон, кортизол, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, андростендион, эстрадиол, Т, 17-гидроксипрогестерон, ДГЭА, прогестерон и 25-гидроксивитамин D. Четкое разделение близ-

ких по химической структуре стероидов с помощью газо-жидкостной хроматографии под высоким давлением (HPLC) было достигнуто всего за 11 мин. Продемонстрирована высокая надежность метода. Технология TD-MS высокопроизводительна и экономична по сравнению с современными автоматическими анализаторами, которые требуют больших затрат на постоянное приобретение дополнительных расходных материалов (Китов). В методе TD-MS расходные материалы сведены к минимуму. По всем вышеназванным параметрам MS-технология ближайшего будущего в гормональном анализе. Один подготовленный оператор может выполнять до 200 тестов в день. В настоящее время TD-MS получает широкое распространение, прежде всего в США для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях и прежде всего для определения основного спектра C21-, C19- и C18-стероидов, а также их многочисленных метаболитов. Уже в настоящее время в разных странах при выполнении скрининговых программ на выявление ВДКН у новорожденных с использованием в качестве маркера 17-альфа-гидроксипрогестерона метод TD-MS (API-3000) незаменим. Он выступает в качестве "арбитра" при наличии ложноположительных результатов, неизбежных при определении в кровяном пятне 17-альфа-гидроксипрогестерона методом флуоресцентного иммуноанализа (Дельфия). При скрининге на каждый истинный случай ВДКН приходится до 200 ложноположительных результатов, которые требуют внесения ясности с использованием MS — API-3000.

В статье докт. М. Kushnir и соавт. [20] представлен опыт использования метода TD-MS для определения низких концентраций Т у женщин и детей. По основным параметрам (чувствительность и специфичность) метод является высокондежным и адекватным для оценки андрогенного баланса, практически исключает эффект матрикса, присущий всем прямым методам иммуноанализа автоматизированных систем. В приведенных табл. 1 и 2 авторы определяют физиологические колебания об. Т в зависимости от возраста мужчин и женщин

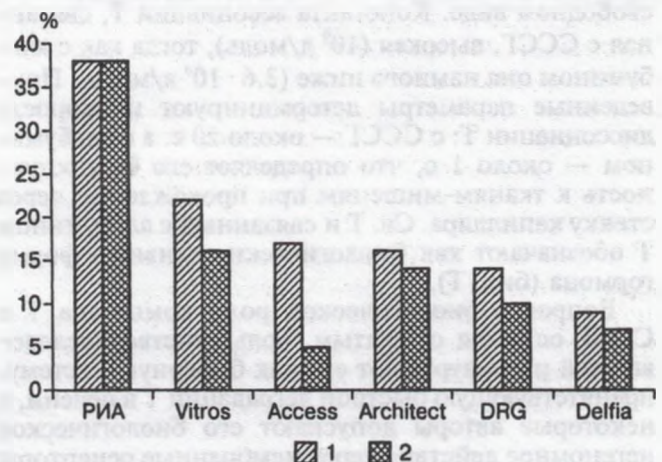


Рис. 2. Частота выявления андрогенного дефицита у 100 обследованных мужчин при сравнении с показателями Т, определенными РИА (1-я группа), и при использовании нормативов, указанных в инструкциях (2-я группа).

Таблица 1

Содержание СССГ, об. Т, св. Т и био. Т у детей

Стадия по Ганнеру	n	СССГ, нмоль/л	Об. Т, нмоль/л	Св. Т, пмоль/л	Био. Т, нмоль/л
Девочки:					
TS 1	147	25—144	< 0,588	< 7,63	0,010—0,190
TS 2	66	13—106	0,138—1,35	1,39—15,61	0,042—0,519
TS 3	85	10—82	0,346—2,07	4,51—26,02	0,131—0,969
TS 4	77	12—147	0,277—2,18	3,82—53,78	0,097—1,35
TS 5	123	15—150	0,346—2,07	2,77—31,92	0,076—0,796
Мальчики:					
TS 1	143	21—144	< 0,657	< 12,84	0,0104—0,450
TS 2	66	18—141	0,069—5,16	1,04—72,87	0,010—2,04
TS 3	65	11—87	0,242—26,37	3,47—339,95	0,066—10,24
TS 4	98	9—50	5,71—29,54	121—586,24	1,38—16,78
TS 5	42	9—59	6,71—27,09	142—829,06	4,29—20,62

с использованием оптимальной выборки. Данные по содержанию св. Т. рассчитаны с использованием математической модели [37].

Приведенные показатели об. Т для мужчин молодого и среднего возраста, полученные методом TD-MS, противоречат общепринятым критериям нижней границы нормы, которая составляет 11 нмоль/л. Возможно, это связано с малой выборкой для данных возрастных групп. Вместе с тем величина пограничной точки отсчета норма → дефицит Т остается открытым и дискуссионным.

В большой обзорной статье изложены достоинства, преимущества, надежность, реальные трудности и проблемы при использовании высокотехнологического биоаналитического метода, каким является масс-спектрометрия в тандеме с высокоразрешающей жидкостной хроматографией [43].

Свободный тестостерон

Как указывалось выше, Т циркулирует в крови в комплексе со специфическим транспортным глобулином (СССГ) и неспецифическим белком альбумином, который имеет низкую аффинность, но большую емкость за счет высокой концентрации в крови. И только 1—2% Т циркулирует в крови в свободном виде. Константа ассоциации Т, связанная с СССР, высокая (10^9 л/моль), тогда как с альбумином она намного ниже ($3,6 \cdot 10^4$ л/моль). Приведенные параметры детерминируют и скорость диссоциации Т: с СССР — около 20 с, а с альбумином — около 1 с, что определяет его биодоступность к тканям-мишеням при прохождении через стенку капилляра. Св. Т и связанный с альбумином Т обозначают как биологически активную форму гормона (био. Т).

Вопрос о биологической роли комплекса Т с СССР остается открытым, большинство исследователей рассматривают его как буферную систему, препятствующую быстрой деградации Т в печени, а некоторые авторы допускают его биологическое негеномное действие через мембранные рецепторы клетки [29].

Соотношение между свободным и связанным с белками Т в физиологических условиях поддерживается на постоянном уровне. Однако при целом

ряде патофизиологических ситуаций оно нарушается, прежде всего за счет изменения концентрации основного специфического транспорта белка СССР. Стандартное обследование больного с подозрением на дефицит андрогенов начинается с определения об. Т, поэтому неизбежны ошибки в интерпретации полученных результатов, так как остается открытым вопрос о содержании св. Т и био. Т, которые определяют андрогенный статус пациента.

Биологическая значимость СССР до настоящего времени до конца не раскрыта. Например, он продуцируется в печени только приматов (низших и человекообразных обезьян и человека). Его уровень не подчиняется суточному ритму, тогда как для уровня Т характерен такой ритм.

Поскольку концентрация циркулирующего СССР влияет на содержание об. Т и св. Т и их соотношение, то необходимо помнить о наиболее значимых факторах, изменяющих содержание СССР. Эндогенные и экзогенные эстрогены повышают его концентрацию, а андрогены, наоборот, снижают. Гормоны щитовидной железы увеличивают его продукцию, а при их недостатке концентрация циркулирующего СССР уменьшается. Его содержание в крови детей выше, чем у взрослых. У мужчин старше 50 лет концентрация СССР нарастает, в связи с этим снижается доля свободного биологически активного Т, усугубляя формирование возрастного гипогонадизма.

Согласно теории о свободных формах циркулирующих в крови гормонов, уровень св. Т отражает андрогенный статус более адекватно, чем содержание в крови об. Т [9]. Именно поэтому идентификация адекватных аналитических методов определения св. Т обеспечила бы наиболее оптимальную диагностику андрогенного статуса пациента. Комплекс св. Т/об. Т — термодинамическая система, в которой свободная фракция гормона зависит от концентрации как об. Т, так и связывающих бел-

Таблица 2

Содержание СССГ, об. Т, св. Т и био. Т в сыворотке у детей и взрослых разных возрастных групп

Возраст, годы	n	СССГ, нмоль/л	Об. Т, нмоль/л	Св. Т, пмоль/л	Био. Т, нмоль/л
Женщины					
7—9	103	31—143	< 0,519	< 6,25	0,0104
10—11	69	15—145	0,069—1,45	0,347—12,14	0,014—0,332
12—13	69	10—108	0,208—2,21	3,12—23,60	0,059—0,650
14—15	70	11—106	0,311—1,70	4,16—26,02	0,104—0,990
16—17	70	16—160	0,277—2,18	4,16—34,35	0,114—0,990
18—30	55	18—203	0,381—2,04	2,78—25,68	0,076—0,713
31—40	43	20—126	0,381—1,90	4,51—31,92	0,142—0,882
41—51	18	26—110	0,311—1,9	3,82—20,13	0,097—0,571
50—62 (менопауза)	16	18—97	0,208—0,865	2,08—13,19	0,052—0,325
Мужчины					
7—9	105	24—170	< 0,311	< 3,12	0,010—0,097
10—11	68	20—133	0,069—1,97	0,35—21,86	0,003—0,619
12—13	69	15—114	0,242—25,85	1,73—340	0,048—9,96
14—15	70	8—71	1,14—20,24	10,41—479	0,329—11,66
16—17	70	8—50	6,40—30,66	132—600	1,21—17,61
18—30	20	8—54	6,88—27,13	236—770	5,85—19,10
31—52	19	12—49	7,58—22,35	194—489	4,81—12,25

ков, а также от уровня ассоциации и диссоциации комплекса, что в свою очередь определяется температурой и pH [23]. Традиционно отделение св. Т от Т, связанного с белками, проводят методом равновесного диализа или методом ультрафильтрации (УФ), который появился позднее. При этом необходим ультрачувствительный и высокоспецифичный метод определения низкой концентрации св. Т в фильтрате.

Технология УФ, которая была предложена рядом авторов, действительно позволяет точно выделить свободную форму Т и других стероидов [15, 19]. Однако доступная в то время технология РИА не позволяла определять низкие концентрации св. Т с достаточной степенью точности.

В частности G. Hammond и соавт. [15] приводят результаты определения свободных стероидов (в % от общей фракции) с использованием комбинации УФ с диализом: у мужчин — эстрадиол 2,4, Т 1,97, прогестерон 2,76; у женщин в фолликулярной фазе эстрадиол 1,57, Т 0,9, прогестерон 2,85, в латентной фазе эстрадиол 1,52, Т 0,85, прогестерон 2,54.

Позже коммерческие диагностические компании разработали прямой безэкстракционный метод определения св. Т в сыворотке, который используется в ряде эндокринологических лабораторий, несмотря на обоснованные и аргументированные заявления о недопустимости его применения для оценки андрогенного статуса [25].

Долгое время метод равновесного диализа для определения св. Т и других стероидов рассматривался как "золотой стандарт". Однако с 2003 г. Европейский комитет по стандартизации диагностических систем и их компонентов принял решение о замене термина "золотой стандарт" определением "референсная измерительная процедура" (RMP). Для стероидных гормонов должна быть использована в качестве референсного метода TD-MS [31]. Принцип данного метода гарантирует точность, специфичность и снижение эффекта матрикса при количественном измерении Т или любого другого стероида. А для разделения комплекса об. Т/св. Т предложено использовать технологию УФ или равновесного диализа. Группа авторов, выполнив большое сравнительное исследование, рекомендовала использовать в качестве метода, разделяющего св. Т/об. Т, прямую, более простую технологию УФ вместо диализа с последующим количественным измерением концентрации св. Т референсным методом масс-спектрометрии [34]. При такой комбинации методов содержание св. Т в сыворотке мужчин составляло 1,8% от об. Т, а при использовании диализа 2,2%.

Определение свободного тестостерона в слюне

Неудовлетворительные и зачастую неприемлемые результаты определения об. Т автоматизированными системами послужили для нас основанием поиска альтернативных технологий и прежде всего прямого и доступного метода определения св. Т, как наиболее адекватного маркера андрогенного статуса как у мужчин, так и у женщин.

Однако прямое определение св. Т в крови сопряжено с технологическими трудностями, поэтому мы обратились к альтернативной биологической жидкости — слюне, куда поступают только свободные формы стероидов, включая Т.

Слюна как биологическая жидкость привлекла внимание исследователей почти 50 лет назад, так как слюнные железы обладают особым свойством: в слюнный проток проникают соединения только с низкой молекулярной массой (< 400 Д), к которым относится и Т, не связанный с альбумином и специфическим глобулином. Концентрация жирорастворимых свободных стероидов, таких как Т, не зависит от скорости выделения слюны и соответствует уровню несвязанной формы стероида в сыворотке крови [35]. Если измерить адекватными методами концентрацию св. Т, который доступен тканям-мишеням и оказывает свое биологическое действие в этой форме, то его уровень в слюне мог бы стать идеальным маркером для определения андрогенного статуса как у мужчин, так и у женщин и детей, у которых уровень Т во много раз ниже.

Сбор слюны прост, не инвазивен и имеет большие преимущества перед традиционными методами определения стероидов в венозной крови, взятие которой требует квалифицированного персонала и само по себе является добавочным стрессорным фактором, способным исказить показатели гормонального статуса.

Необходимо отметить, что в процессе развития методов гормонального анализа неоднократно предпринимались попытки использования слюны в качестве биологической среды для диагностики гормональных нарушений. Однако РИА-методы, а в последующем и традиционные иммуноферментные методы не обеспечивали достаточной чувствительности, необходимой для определения низких концентраций свободных стероидов в слюне. Поэтому для анализа были необходимы большие объемы слюны (до 3 мл), после сбора слюны следовала процедура экстракции диэтиловым эфиром, который является огне- и взрывоопасным растворителем. В результате такую технологию было сложно адаптировать для рутинного использования в гормональных лабораториях для клинической диагностики.

Таблица 3

Характеристика исследуемых групп (медиана и 10/90-й процентиля)

Группы мужчин	n	Возраст, годы	Об. Т, нмоль/л	СССГ, нмоль/л	Вычисленный св. Т, пмоль/л
Здоровые	35	38 (25—52)	18,8 (12,4—26,1)	36,1 (21—54)	374 (225—544)
С андрогенным дефицитом	30	35 (21—54)	6,7 (1,2—10,8)	33,0 (14,7—104,1)	135 (9,3—215)
p		0,2242	0,0002	0,3958	0,0002

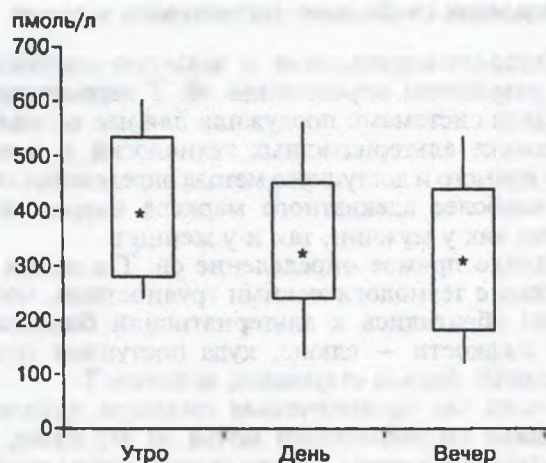


Рис. 3. Суточная динамика св. Т в слюне у здоровых мужчин.

* — медиана, достоверность различий между утром и вечером $p = 0,0012$, между днем и вечером — $p = 0,0006$.

Диагностические наборы для прямого измерения свободных стероидов, в особенности в крови, пока не пригодны для диагностического исследования и могут использоваться лишь в научных целях [26, 33]. Как известно, группой A. Vermeulen [37] предложена формула для расчета концентрации св. Т на основе определения об. Т и СССГ в крови. В этом случае корректное определение концентрации св. Т в крови основано на четком знании истинной концентрации об. Т. Реально это непростая проблема, так как современные автоматизированные технологии для измерения об. Т дают совершенно разные результаты [12, 30, 33, 41]. Кроме того, требуется также оптимальный метод для определения СССГ, что значительно повышает стоимость вычисления концентрации св. Т.

Лишь появление современной технологии иммуноанализа, основанной на усиленной хемотропности [4], сочетающей ультрачувствительность и высокую специфичность, сделало возможным определение свободных, не связанных с белками, стероидных гормонов в очень малых объемах слюны прямым методом (без экстракции). Высокая аналитическая (6,2 пмоль/л) и функциональная (17,3 пмоль/л) чувствительность позволяет количественно определять очень низкие (2–3 пг в пробе) концентрации Т в слюне, что особенно важно для диагностики андрогенного статуса у женщин и детей.

В наших исследованиях [2, 13] показано, что концентрация св. Т в слюне хорошо коррелирует и

отражает концентрацию несвязанного Т в крови и является дополнительным существенным диагностическим критерием для определения андрогенного статуса мужчин. Были обследованы 35 здоровых мужчин в возрасте 21 года–57 лет и 30 мужчин с различными формами андрогенной недостаточности в возрасте 22 года–68 лет. Один пациент транссексуал-женщина (женщина → мужчина) — сбор слюны осуществлялся утром до и после внутримышечного введения сустанона.

Процедура сбора слюны

Чтобы исследовать колебания концентрации Т, 3 порции слюны собирали в течение 1 ч трижды в день. Порции слюны собирали по следующей схеме: образец 1 — в 8 ч 30 мин; образец 2 — в 9 ч; образец 3 — в 9 ч 30 мин; образец 4 — в 15 ч 30 мин; образец 5 — в 16 ч; образец 6 — в 16 ч 30 мин; образец 7 — в 22 ч; образец 8 — в 22 ч 30 мин; образец 9 — в 23 ч.

Наш опыт показал, что правильный сбор слюны — ключевой момент в достижении точных и воспроизводимых результатов измерения св. Т. Для этого мы разработали детальную процедуру сбора слюны.

Образцы слюны необходимо собирать в специальные контейнеры (SaliCaps®, IBL) с трубкой, изготовленные из материала, который не сорбирует стероиды. Слюна должна быть собрана не менее чем через 30 мин после еды, питья, чистки зубов или жевания жвачки. Требовалось примерно 2 мин, чтобы собрать необходимое количество слюны (0,6–0,8 мл). Образцы с небольшим окрашиванием из-за контаминации кровью необходимо исключить. Все образцы были помечены специальным маркером (имя пациента, дата, время). Собранная слюна могла храниться до 5 дней при 20°C, 10 дней при 2–8°C и 6 мес и более при –20°C. Св. Т измеряли в 50 мкл слюны в дубликатах.

Ниже приведены некоторые приемы для быстрого и простого сбора слюны:

- При сборе слюны не рекомендуется делать перерыв и удалять трубочку изо рта и/или из пробирки.

- Сбор слюны становится легче, если вы слегка сжимаете зубами верхний конец трубочки.

- Рекомендуется собирать слюну перед зеркалом, чтобы контролировать процесс наполнения пробирки.

Параллельно проводили определение содержания об. Т и СССГ в сыворотке крови.

Таблица 4

Суточная динамика св. Т в слюне (в пмоль/л) у здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом (медиана и 10–90-й процентиля)

Группы мужчин	Время сбора слюны, ч								
	8.30	9.00	9.30	15.00	15.30	16.00	22.00	22.30	23.00
Здоровые	371 (260–562)	364 (277–531)	374 (263–541)	322 (225–502)	329 (208–440)	288 (225–440)	212 (146–423)	295 (222–430)	343 (164–475)
С андрогенным дефицитом	205 (76–250)	209 (36–267)	218 (52–302)	201 (21–319)	240 (35–416)	169 (51–347)	131 (45–364)	157 (66–305)	145 (42–316)
<i>p</i>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0147	0,0926	0,0037	0,0083	0,0019	0,0056

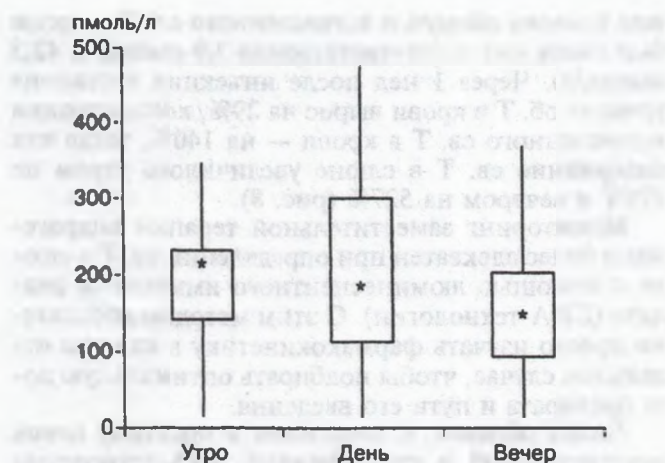


Рис. 4. Суточная динамика св. Т в слюне больных мужчин с андрогенным дефицитом.

* — медиана, достоверность различий между утром и вечером $p = 0,583$, между днем и вечером $p = 0,0006$.

Определение св. Т проводили люминесцентным LIA-методом (фирма "IBL-Гамбург", Германия), основанном на принципе конкурентного связывания. Регистрацию люминесцентного сигнала осуществляли на мультианализаторе Victor (фирма "Wallac", Финляндия). Определение об. Т в образцах крови проводили методом усиленной хемилюминесценции с помощью автоматизированного анализатора Vitros Eci ("Ortho-Clinical Diagnostics", "J&J", Великобритания) как наиболее адекватного метода [12].

Определение содержания глобулина, связывающего половые стероиды (СССГ), проводили методом отсроченной по времени флуоресценции с помощью автоматизированной системы Autodelfia (фирма "Wallac", Финляндия). Вычисление концентрации св. Т в крови осуществляли с помощью математической формулы, использующей показатели в крови об. Т и СССР и описанной в работе A. Vermeulen [37] (калькулятор расчетного св. Т в Интернете <http://www.issam.ch/freetesto.htm>).

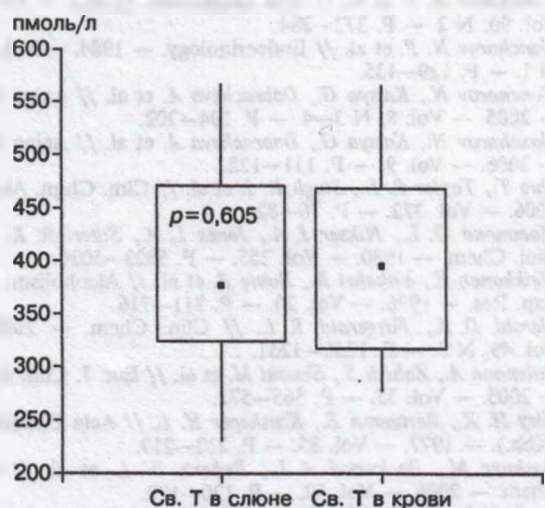


Рис. 5. Сравнение показателей расчетного св. Т в крови и св. Т в слюне в утренние часы у здоровых мужчин.

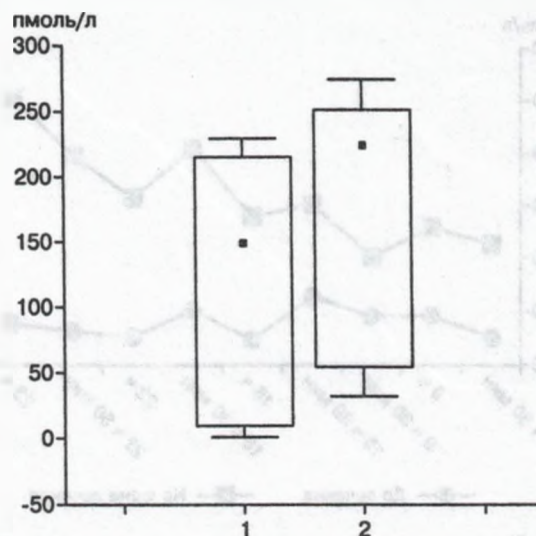


Рис. 6. Сравнение показателей расчетного св. Т в крови (1) и св. Т в слюне (2) в утренние часы у пациентов с андрогенным дефицитом.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica 6 Windows, StatSoft, Inc. Результаты представлены в виде медианы и 10/90-го процентилей. Для выявления достоверности различий между сравниваемыми параметрами был использован тест Манна—Уитни. Для оценки связи между различными показателями применяли ранговый тест Спирмена и линейный регрессионный анализ. При $p < 0,05$ различия считали статистически достоверными.

Концентрация об. Т, уровень СССР, вычисленный св. Т в крови и средний возраст здоровых мужчин представлены в табл. 3.

Обнаружено, что сопоставимые по возрасту мужчины и мужчины с андрогенным дефицитом имели сравнимый уровень СССР (медиана соответственно 36,1 и 33,0 нмоль/л). Однако уровень об. Т был значительно выше в группе здоровых

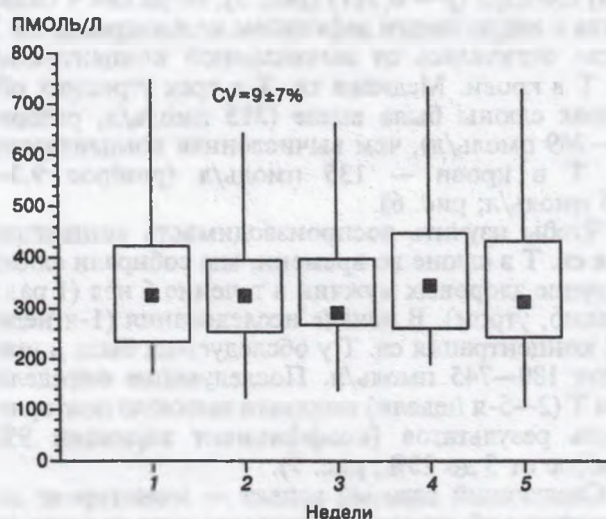


Рис. 7. Воспроизводимость концентрации св. Т в слюне в группе здоровых мужчин в течение 5 нед (сбор образцов слюны 1 раз каждую неделю).

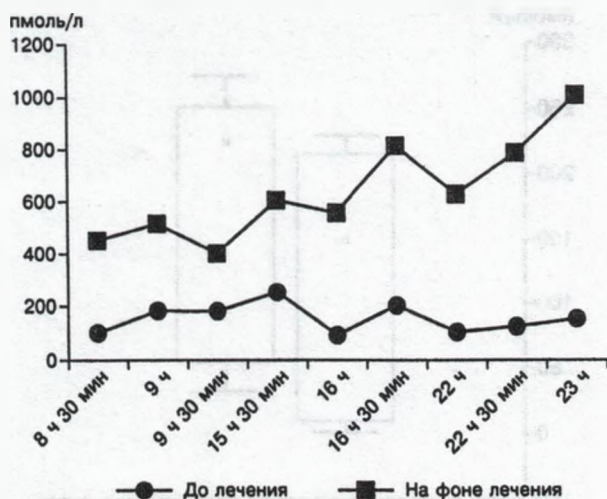


Рис. 8. Динамика св. Т в слюне у транссексуала (женщина → мужчина).

мужчин (18,8 и 6,7 нмоль/л соответственно). Концентрация вычисленного св. Т в крови у здоровых мужчин также была в 3 раза выше, чем у пациентов с андрогенным дефицитом (374 и 135 пмоль/л соответственно).

Средняя концентрация Т в слюне у здоровых мужчин (по 3 утренних образца от каждого, в 8 ч 30 мин–9 ч 30 мин) составляла 380 (270–544) пмоль/л, средняя концентрация днем и вечером — соответственно 80 ± 15 и $71 \pm 21\%$ от утренней концентрации (рис. 3, табл. 4).

В отличие от здоровых мужчин суточная динамика св. Т в слюне у больных с андрогенным дефицитом выражена менее заметно. Концентрации св. Т утром и днем практически не различались, статистически достоверное различие было обнаружено только вечером — $68 \pm 29\%$ от утреннего уровня (рис. 4, см. табл. 4).

Концентрация св. Т в слюне и расчетная концентрация св. Т в крови у здоровых мужчин практически не различались: 380 (270–544) и 374 (225–544) пмоль/л ($p = 0,111$) (рис. 5), тогда как у пациентов с андрогенным дефицитом концентрация св. Т часто отличалась от вычисленной концентрации св. Т в крови. Медиана св. Т в трех утренних образцах слюны была выше (215 пмоль/л, разброс 55–249 пмоль/л), чем вычисленная концентрация св. Т в крови — 135 пмоль/л (разброс 9,3–215 пмоль/л; рис. 6).

Чтобы изучить воспроизводимость концентрации св. Т в слюне во времени, мы собирали слюну в группе здоровых мужчин в течение 5 нед (1 раз в неделю, утром). В начале исследования (1-я неделя) концентрация св. Т у обследуемых была в пределах 180–745 пмоль/л. Последующие определения Т (2–5-я недели) показали высокую повторяемость результатов (коэффициент вариации 9%, разброс от 5 до 23%; рис. 7).

Следующий важный аспект — мониторинг заместительной терапии андрогенами по уровню св. Т в слюне. Мы проводили мониторинг определения св. Т в слюне у транссексуала (женщина → мужчина) после лечения сустанонам. До лече-

ния уровень общего и вычисленного св. Т в крови был очень низок (соответственно 3,9 нмоль/ и 42,3 пмоль/л). Через 1 нед после инъекции сустанона уровень об. Т в крови вырос на 29%, концентрация вычисленного св. Т в крови — на 140%, тогда как содержание св. Т в слюне увеличилось утром на 275% и вечером на 527% (рис. 8).

Мониторинг заместительной терапии андрогенами более адекватен при определении св. Т в слюне с помощью люминесцентного иммунного анализа (ЛИА-технологии). С этим методом достаточно просто изучать фармакокинетику в каждом отдельном случае, чтобы подбирать оптимальную дозу препарата и пути его введения.

Таким образом, с введением в практику очень чувствительной и специфичной ЛИА-технологии концентрация Т в слюне может быть широко использована как объективный и адекватный гормональный критерий в диагностике различных форм гипогонадизма у мужчин, а его определение ЛИА-методом может служить методом выбора для целого ряда научных исследований, мониторинга и лечения гонадальных дисфункций, включая изучение фармакокинетики производных Т при заместительной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

- Гончаров Н. П. и др. // Вестн. АМН СССР. — 1987. — № 10. — С. 88–94.
- Гончаров Н. П., Кацяя Г. В., Добрачева А. Д. и др. // Пробл. эндокринол. — 2007. — № 3. — С. 30–35.
- Кацяя Г. В. // Бюл. Экспер. биол. — 1984. — Т. 97, № 3. — С. 285–287.
- Aldrecht S., Zimmermann T., Brandl H. et al. // J. Lab. Med. — 1997. — Vol. 21. — P. 191–204.
- Carruthers M., Trinick T. R., Wheeler M. J. // Aging Male. — 2007. — Vol. 10, N 3. — P. 165–172.
- Choi H. H., Gray P. B., Storer T. W. et al. // J. Clin. Endocrinol. — 2005. — Vol. 90. — P. 1531–1541.
- Daly W., Seegers C. A., Rubin D. A. et al. // Eur. J. Appl. Physiol. — 2005. — Vol. 93. — P. 375–380.
- DPC Technica Services Department. — Immulite/immulite, 1000 Total Testosterone — Manufactures Instruction. PILK-TW-7, 2-4-2005, Los Angeles, 2005.
- Ekins R. // Clin. Chem. — 1992. — Vol. 38, N 7. — P. 1289–1293.
- Goncharov N. P. et al. // Acta Endocrinol. (Kbh.). — 1979. — Vol. 90, N 2. — P. 372–384.
- Goncharov N. P. et al. // Endocrinology. — 1984. — Vol. 115, N 1. — P. 129–135.
- Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. // Aging Male. — 2005. — Vol. 8, N 3–4. — P. 194–202.
- Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. // Aging Male. — 2006. — Vol. 9. — P. 111–122.
- Guo T., Taylor R. L., Singh R. J. et al. // Clin. Chim. Acta. — 2006. — Vol. 372. — P. 76–82.
- Hammond G. L., Nikser J. A., Jones L. A., Sitteri R. K. // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 5023–5026.
- Heikkinen E., Viikahri R., Roine R. et al. // Alcoholism. Clin. Exp. Res. — 1996. — Vol. 20. — P. 711–716.
- Herold D. A., Fitzgerald R. L. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49, N 8. — P. 1250–1251.
- Jeidmann A., Zahedi S., Simoni M. et al. // Eur. J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 35. — P. 565–572.
- Kley H. K., Bartmann E., Kruskeper H. L. // Acta Endocrinol. (Kbh.). — 1977. — Vol. 85. — P. 212–219.
- Kushner M., Rockwood A. L., Roberts W. L. et al. // Clin. Chem. — 2006. — Vol. 52. — P. 120–128.
- Lughetti L., Prediezi B., Ferrari M. et al. // J. Pediatr. Endocrinol. Metabol. — 2000. — Vol. 13. — P. 709–715.
- Matsumoto A. M., Bremner W. J. // J. Clin. Endocrinol. — 2004. — Vol. 89. — P. 520–524.

23. *Obminski Z.* // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* — 1998. — Vol. 106. — P. 85–88.
24. *Rittmaster R. S., Arab D. M., Lehman L.* // *Fertil. and Steril.* — 1996. — Vol. 65. — P. 962–965.
25. *Rosner W.* // *J. Clin. Endocrinol.* — 1997. — Vol. 82. — P. 2014–2015.
26. *Rosner W.* // *J. Clin. Endocrinol.* — 2001. — Vol. 86, N 6. — P. 2903–2905.
27. *Rosner W., Auchus R., Azziz R.* et al. // *J. Clin. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 92. — P. 405–413.
28. *Sarkova T., Eriksson C. J.* // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* — 2003. — Vol. 27, N 4. — P. 682–685.
29. *Schurmeyer T., Nieschlag E.* // *Ninth Tenovus Workshop-Immunoassays of Steroids in Saliva.* — Cardiff, 1982. — P. 202–209.
30. *Sikaris K., McLachlan R. I., Kazlauskas R.* et al. // *J. Clin. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 90, N 11. — P. 5928–5936.
31. *Stockl D., Franzini C., Kratochvila J.* et al. // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1996. — Vol. 34. — P. 319–337.
32. *Svaritberg J., Jorde R., Sundsfjord J.* et al. // *J. Clin. Endocrinol.* — 2003. — Vol. 88. — P. 3099–3104.
33. *Taieb J., Mathian B., Millot F.* et al. // *Clin. Chem.* — 2003. — Vol. 49. — P. 1371–1385.
34. *Van Uytanghe K., Stockl D., Kaufman J. M.* et al. // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 2101–2110.
35. *Vermeulen A., Kaufman J. M.* // *Horm. Res.* — 1995. — Vol. 43, N 1–3. — P. 25–28.
36. *Vermeulen A., Kaufman J. M., Giagulli V. A.* // *J. Clin. Endocrinol.* — 1996. — Vol. 81. — P. 1821–1826.
37. *Vermeulen A., Verdonc K. L., Kaufman J. M.* // *J. Clin. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 84. — P. 3666–3672.
38. *Vermeulen A., Kaufman J. M.* // *Aging Male.* — 2002. — Vol. 5. — P. 170–176.
39. *Waggoner W., Boots L. R., Azziz R.* // *Gynecol. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 13, N 6. — P. 394–400.
40. *Wall J. R., Jarrett R. J., Zimmet P. Z.* et al. // *Lancet.* — 1973. — Vol. 1. — P. 967–968.
41. *Wang C., Catlin D. H., Demers L. M.* et al. // *J. Clin. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 89. — P. 534–543.
42. *Wheeler M. J.* // *CPD Clin. Biochem.* — 2003. — Vol. 5. — P. 86–90.
43. *Zhan Sh.* // *Curr. Pharm. Analys.* — 2005. — Vol. 1. — P. 3–14.

Поступила 21.03.08

◆ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.441-006.6-07-08

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Клинические рекомендации согласительной комиссии

Состав согласительной комиссии

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва	В. Ж. Бржезовский, Т. И. Зайцева, Т. Т. Кондратьева, М. А. Кропотов, Е. Г. Матякин, А. И. Павловская, А. И. Пачес, В. Г. Поляков, С. Субраманиан, Р. В. Шишков, В. Н. Шолохов
ФГУ ЭНЦ Росмедтехнологий, Москва	А. Ю. Абросимов, Д. Г. Бельцевич, В. Э. Ванушко, И. И. Дедов, Н. С. Кузнецов, Н. В. Мазурина, Г. А. Мельниченко, Н. М. Платонова, В. Н. Сморшок, Е. А. Трошина, В. В. Фадеев
ФГУ МНИОИ им. П. А. Герцена Росмедтехнологий	В. О. Ольшанский, И. В. Решетов
ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск	П. И. Гарбузов, Б. Я. Дроздовский, А. А. Ильин, В. С. Паршин, А. А. Родичев, П. О. Румянцев, А. Ф. Цыб
НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН	Е. Л. Чойнзонов
ФГУ НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова Росмедтехнологий, Санкт-Петербург	А. С. Барчук, Л. М. Берштейн, Р. И. Вагнер, Е. В. Левченко, А. Е. Михнин
Ростовский НИИ онкологии Минздравсоцразвития РФ	П. В. Светицкий
ОКД № 1 Москвы	Л. Г. Кожанов, М. А. Сдвижков, М. Р. Финкельштерн
Алтайский филиал ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН	И. В. Вихлянов