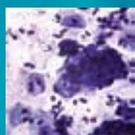


№ 3  
АПРЕЛЬ  
2010

# ВЕСТНИК

«ЛАБОРАТОРИИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ»

## ТЕМЫ НОМЕРА:



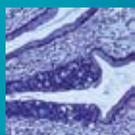
**СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ  
О РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ**



**ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА:  
РОЛЬ В ВОЗНИКНОВЕНИИ РШМ**



**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
В ДИАГНОСТИКЕ ДИСПЛАЗИЙ И РШМ**



**ПРИМЕНЕНИЕ ОНКОМАРКЕРА SCCA  
ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ**



**ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИС**



**НАШ СПРАВОЧНИК**



## Содержание

Актуальность проблемы диагностики рака шейки матки..... 2

Вирус папилломы человека: современные представления, роль в возникновении рака шейки матки, способы выявления.....3

Современные подходы к цитологическим исследованиям для диагностики дисплазий и рака шейки матки.....9

Применение онкомаркера SCCA при раке шейки матки .....13

Формы выдачи цитологических заключений с использованием лабораторной информационной системы, или почему мы так делаем? .....14

Врачи шутят..... 16

**Наш справочник.** Влияние лекарственных препаратов на результаты лабораторных анализов ..... 3-я стр. обл.



**Е. В. Селиванов,** главный редактор, к. м. н., заместитель директора ООО Медицинский центр «Лаборатория ДНК-Диагностики» по лечебной работе

### Уважаемые читатели!

Вы держите в руках уже третий номер нашего «Вестника». В этот раз мы решили отойти от привычной рубрики, и сделать этот выпуск тематическим, одновременно на треть увеличив объём журнала.

Весь апрельский номер будет посвящен одной, но крайне важной и актуальной медицинской проблеме — раку шейки матки. Известно, что это тяжёлое заболевание стойко удерживает пятую-шестую позиции в структуре женской онкологической патологии, а частота заболеваемости в России — около 11 случаев на 100 тыс. населения. Необходимость создания тематического номера «Вестника» была связана ещё и с невозможностью полноценного освещения всех важных моментов каждого этапа диагностического поиска в формате и рамках одного обзора.

Надеемся, наше нововведение придется читателям по вкусу, и мы будем и впредь один из трёх выпусков делать тематическим.

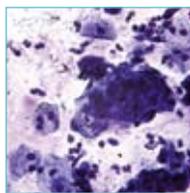
Ждем Ваших отзывов.

Сеть медицинских центров



**Вестник «Лаборатории ДНК-Диагностики» — корпоративное издание ООО Медицинский центр «Лаборатория ДНК-Диагностики».**

**Наш адрес:** г. Барнаул, ул. А. Петрова, 247Б. **Тел./факс:** 3852 289069. **E-mail:** otvet@dnklab.com. **Web:** www.dnklab.ru.  
**Главный редактор:** Е. В. Селиванов. **Технический редактор:** Е. Н. Звягинцев. **Печать и допечатная подготовка:** типография Printexpress, г. Барнаул, ул. Кирова, 47, тел./факс: 3852 363626.  
**Тираж:** 600 экз.



## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

**Р**ак шейки матки (РШМ) занимает около 15 % среди всех онкологических заболеваний женщин и первое место среди причин женской смертности от рака в развивающихся странах. Среди поражений органов репродуктивной системы РШМ занимает стабильно третье место после рака молочной железы и рака эндометрия. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 500 тыс. случаев РШМ, каждый второй из которых заканчивается смертью пациентки в течение первого года после постановки диагноза. Так, каждый год в странах Европейского союза диагностируется более 25000 случаев возникновения рака шейки матки и около 12000 летальных исходов от него, что количественно превышает даже смертность от СПИДа и гепатита В.

РШМ принадлежит к опухолям, которые длительно протекают без симптомов. Первым неспецифическим симптомом РШМ являются бели (на которые женщины редко обращают внимания), реже кровотечения в виде кровянистых мажущих выделений, часто после полового акта.

К сожалению, до 40 % РШМ выявляется уже в поздних стадиях (III–IV). Особенно заметна тенденция увеличения случаев РШМ у женщин до 30 лет.

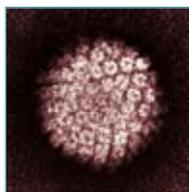
В 80–90 % случаев опухоли шейки матки представлены плоскоклеточным раком. Оставшиеся 10–20 % составляют аденокарциномы. Аденокарциномы чаще встречаются у женщин, родившихся в последние 20–30 лет. Иногда рак шейки матки имеет черты как плоскоклеточного рака, так и аденокарциномы (смешанные карциномы).

В последние годы утвердилось мнение, что основной этиологической причиной РШМ являются вирусы папилломы человека (ВПЧ), которые способны трансформировать эпителиальные клетки шейки матки, что в сочетании с другими факторами приводит к РШМ. ДНК ВПЧ выявляется практически у всех больных с предраковыми состояниями и РШМ, в связи с чем Международное агентство по исследованию рака (IARC) официально объявило ВПЧ типов 16 и 18 канцерогенными факторами.

При правильно поставленных технологиях ранней диагностики РШМ легко выявить и даже предупредить развитие этого заболевания. Среди лабораторных методов наиболее актуальными являются 4 направления диагностики:

1. Цитологические методы диагностики (включая жидкостную цитологию).
2. Гистологические методы диагностики.
3. Молекулярно-биологические методы выявления вируса папилломы человека (ВПЧ) — гибридизация *in situ*, иммунный блот, ПЦР-диагностика и др.
4. Мониторинг за опухолями с помощью маркера плоскоклеточного рака SCC.

Об особенностях каждого вида диагностики мы расскажем ниже.



## **ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА: современные представления, роль в возникновении рака шейки матки, способы выявления**

*Прилепская В. Н., Селиванов Е. В., Кубышкина Т. Ю.*

*Вирус папилломы человека* (ВПЧ) — инфекционный агент, поражающий покровный эпителий и слизистые оболочки. Как правило, ВПЧ поражает половые органы, но может вызывать патологию и других эпителиальных систем (например, папилломатоз гортани). Сегодня папилломавирусная инфекция (ПВИ, ВПЧ-инфекция) — одна из наиболее распространенных и важных инфекций, передающихся половым путем (ИППП), которой инфицирована значительная часть сексуально активного населения планеты. Заболеваемость ВПЧ инфекцией значительно выросла после сексуальной революции, в результате которой стало нормой менять большое число половых партнеров в течение жизни.

Пик заражения ПВИ наблюдается в 18-25-летнем возрасте и снижается после 30 лет, когда существенно возрастает частота дисплазий и рака шейки матки, пик которого приходится на 45 лет.

Интерес к ВПЧ инфекции резко возрос после получения данных о присутствии вируса в подавляющем большинстве опухолевых клеток при раке шейки матки (РШМ).

К тому времени в развитых странах уже действовали программы цитологического скрининга РШМ. После получения новых данных о роли ВПЧ экспертная группа Международного агентства по исследованию рака (IARC) тщательно изучала этиологические факторы РШМ и способы ранней диагностики. В 2004 году на апрельском симпозиуме

IARC был представлен важный вывод: для ранней диагностики РШМ, помимо цитологического скрининга, в обязательном порядке необходимы исследования на наличие ВПЧ.

Опыт последних лет показывает, что цитологический метод диагностики и выявление ВПЧ неразрывно связаны друг с другом и максимально эффективны только в сочетании. Поодиночке они имеют недостаточную эффективность.

### **Несколько слов о вирусе папилломы человека**

Папилломавирусы относятся к семейству паповавирусов. ВПЧ не культивируется в культуре клеток. Геном вируса представлен двуспиральной, кольцевидно скрученной ДНК. В процессе размножения можно обнаружить от 8 до 10 белковых продуктов, обозначаемых буквой E и порядковым номером. Так, за онкогенные свойства вируса ответственны онкобелки E6 и E7. Гены E6 и E7 всегда выявляются в опухолевых клетках, зараженных ВПЧ, в то время как другие фрагменты вирусного генома могут быть утрачены в процессе его длительной персистенции в организме.

Взаимодействие ВПЧ и организма в период между инфицированием и опухолевым ростом проходит в несколько этапов:

- первичная ИППП;
- персистенция генома вируса в эпителиальной форме с продукцией вирусных частиц;

- интеграция вирусной ДНК в геном клеток эпителия;
- индукция мутаций в ДНК эпителиальных клеток;
- преимущественное быстрое деление клеток с мутантной ДНК, начало трансформации эпителия;
- активное размножение клеток опухоли и её рост.

Инфицирование эпителиальных клеток ВПЧ — необходимое, но недостаточное условие для ракового перерождения. Известно, что значительная часть женщин, инфицированных в молодости ВПЧ, к 40-45 годам самоизлечиваются. Как предполагают, для формирования необратимой неоплазии необходимы (в тех или иных сочетаниях):

- активная экспрессия генов и продукция белков Е6, Е7 вируса;
- сдвиг метаболизма эстрадиола в сторону канцерогенного метаболита 16 $\alpha$ -гидроксиэстрогена (16 $\alpha$ -ОНЕ1);
- индукция множественных повреждений хромосомной ДНК в инфицированной клетке, которая завершает процесс перерождения;
- коинфекция другими вирусами (герпеса и т. п.);
- аномалии гена белка p53 и т. п.

Гормональным факторам опухолевого процесса была посвящена статья в первом номере «Вестника», поэтому на этом вопросе мы останавливаться не будем. Добавим лишь, что активная репродукция ВПЧ вызывает образование агрессивного метаболита эстрадиола в инфицированных клетках. Это соединение обладает самостоятельной канцерогенной активностью, что создает дополнительные условия для злокачественного перерождения клеток, содержащих ВПЧ.

Вирус папилломы человека имеет большое число типов — около 70, имеющих разный онкогенный потенциал, при этом не все типы ВПЧ способны вызывать необратимую неоплазию. В связи с этим ВПЧ классифицируют по канцерогенному потенциалу:

1. **ВПЧ низкого онкогенного риска:**
  - ВПЧ типов 6, 11, 13 вызывают поражение вульвы, влагалища, полового члена, шейки матки, дыхательных путей и т.п. в виде папиллом и остроконечных кондилом.
  - ВПЧ типов 1-4 — это подошвенные бородавки, которые по виду напоминают мозоли.
  - ВПЧ типов 3, 10, 28, 49 проявляет себя как плоские бородавки.
  - Некоторые виды папиллом, такие как ВПЧ 27, вызывают образование обыкновенных бородавок и «бородавок мясников».
  - ВПЧ типов 7, 10, 14, 15, 17, 19-24, 26, 29 связывают с появлением других бородавок;
2. **ВПЧ среднего онкогенного риска** (часто эту группу соединяют с вирусами высокого онкогенного риска, с чем авторы в корне не согласны):
  - ВПЧ типов 31, 33, 39, 52, 58, 70, а также типов 30, 40, 42, 43, 51, 55, 57, 59, 61, 62, 64, 67-69, которые связывают с предраковыми состояниями; такая ПВИ не проявляется разрастаниями эпителия.
3. **ВПЧ высокого онкогенного риска** составляют два типа ВПЧ — 16 и 18. При этом 16 тип в опухолевых клетках встречается гораздо чаще: его обнаруживают в 50-70 % случаев РШМ, и лишь в 10-20 % выявляется ВПЧ типа 18.

### Эпидемиология

Инфицирование ВПЧ половых органов (как и кожных покровов в целом) происходит при наличии микротравм (механической травматизации во время полового контакта, бактериальных микроразрывов и т.д.). При этом следует учитывать, что резервуаром ПВИ могут служить уретра, семенная жидкость и предстательная железа.

Поскольку генитальная ВПЧ-инфекция передается половым путем, она, как и другие уrogenитальные ИППП,

часто бывает многоочаговой и ассоциированной более чем с одним типом ВПЧ и/или с другими возбудителями ИППП. *Одним или несколькими типами ВПЧ инфицированы не менее 50% взрослых, живущих активной половой жизнью*, причем в большинстве случаев генитальная ПВИ у них является нераспознанной, протекающей субклинически или асимптомно. Генитальная ВПЧ-инфекция имеет высокую контагиозность и приобретает во время первых нескольких половых контактов; заражение при однократном половом акте происходит примерно в 60% случаев. Среди лиц, живущих активной половой жизнью, особенно в возрасте до 30 лет, ВПЧ-инфекция с одинаковой частотой поражает и мужчин, и женщин. У мужчин ПВИ течёт бессимптомно, вызывая наиболее серьезные поражения у женщин.

В целом частота ПВИ зависит от сексуального поведения: она повышается при раннем начале половой жизни, а также при частой смене половых партнеров.

### **Клиника**

Спектр клинических проявлений генитальной ВПЧ-инфекции варьирует от субклинических признаков до рака шейки матки. Как правило, ВПЧ-инфекция долгое время течет бессимптомно и выявляется только лабораторно — по цитологическим изменениям или обнаружению ВПЧ методом ПЦР. При этом, если цитологические изменения сочетаются с ПЦР выявлением ВПЧ, говорят о субклиническом варианте ПВИ, если же изолированно обнаруживается ДНК ВПЧ без цитологических изменений, то это бессимптомное ВПЧ-носительство.

Клиническими проявлениями ВПЧ-инфекции типами низкого онкогенного риска могут быть остроконечные, плоские или эндофитные кондиломы. Чаще всего причиной является ВПЧ 6 или 11 типов. Это визуальная форма инфекции, которая хорошо диагностируется и не представляет угрозы с точки зрения раз-

вития РШМ.

Морфологические изменения шейки матки, вызываемые ВПЧ, представляют собой спектр предраковых поражений, которые, в свою очередь, обозначаются как цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) или дисплазия, способная прогрессировать в плоскоклеточную карциному. Классификация, предложенная Национальным институтом по изучению рака США (Betesda, 1991), подразделяет плоскоклеточные интраэпителиальные поражения (SIL) на две категории: низкой и высокой степени тяжести (Low & High grade). Клеточные элементы, которые трудно поддаются классификации, именуются как атипичные клетки плоского эпителия неопределенного значения (atypical squamous cell undetermined significance, ASCUS). Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести объединяют цитологические изменения, указывающие на слабую дисплазию (CIN I) и ВПЧ-индуцированные морфологические изменения (койлоцитотическая атипия). SIL высокой степени тяжести включают умеренную дисплазию (CIN II), тяжелую дисплазию и карциному in situ (CIN III). При этом дисплазия без лечения может наблюдаться в течение длительного времени и даже спонтанно регрессировать, хотя со степенью прогрессии и возрастом шансы на это уменьшаются, и в сроки от 2 до 10 лет такие предраковые поражения могут привести к инвазивному раку шейки матки.

Не следует забывать о том, что большой также нередко может инфицироваться новыми для него типами ВПЧ. Реинфекция одним и тем же типом встречается редко, возможно, благодаря приобретенному иммунитету.

### **Диагностика**

Диагностика РШМ ( в т.ч. и ПВИ) основана на 4 методах:

- расширенная кольпоскопия;
- цитологическая диагностика (обыч-

- ная и жидкостная цитология, цитология с окраской по Папаниколау);
- молекулярно-биологические методы (гибридизационный захват-2 (НС2), ПЦР, ЛЦР и др.);
- определение онкогенных белков ВПЧ — Е6 и Е7 в клетках эпителия.

## ПЦР-диагностика

Поскольку первые два метода являются диагностическими для любых дисплазий, в этой статье мы коснемся только выявления собственно ВПЧ методами молекулярно-биологической диагностики<sup>1</sup>.

В наши дни, как правило, используют два основных теста:

- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- гибридизационный захват-2 (НС2) или Hybrid Capture.

Гибридизационные методы позволяют определять локализацию вирусных частиц в клетках эпителия, однако технологически трудоемки, сложны, дорогостоящи.

Гораздо более эффективными являются методы ПЦР-диагностики, позволяющие не только выявить факт инфицирования ВПЧ, но и установить тип вируса и определить вирусную нагрузку. Определение типа вируса зачастую играет решающее значение в выборе тактики ведения пациентки. В этом ПЦР-диагностика значительно превосходит гибридизационные технологии.

Есть в этой бочке меда и своя ложка дегтя. Выпускаемые в России тест-системы, хоть и разрешены к применению, все же не стандартизованы должным образом. Спектр выявляемых типов ВПЧ, специфичность и чувствительность сильно варьируют от производителя к производителю. В нашей лаборатории при выявлении ВПЧ тест-системами трех

ведущих производителей полное совпадение результатов из одной и той же пробы было получено только в 78 % случаев. Еще больший разброс результатов исследования происходит при использовании т.н. скрининговых тест-систем (ПЦР-скрининг на ВПЧ), где в зависимости от производителя сильно меняется набор выявляемых типов ВПЧ.

С клинической точки зрения упражнения производителей в максимально большем выявлении типов ВПЧ конечной цели не достигают, т.к. добавление новых типов к уже сложившейся группе практически не дает прироста выявления РШМ, зато вносит элемент неоднозначности трактовки результатов, полученных разными тест-системами.

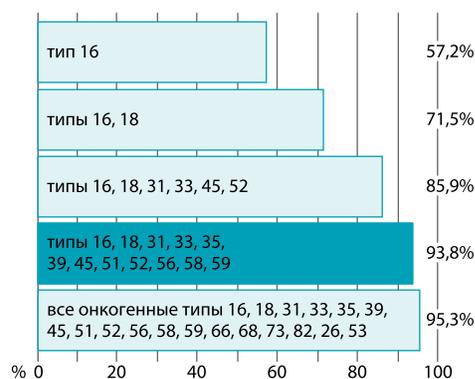


Рис. 1. Распространённость различных типов ВПЧ при РШМ, % (M. Muñoz, X. Bosch et al. Int. J. Cancer: 111, 278-285 (2004)).

В настоящее время установлено, что нагрузка (количество) ДНК ВПЧ может отражать тяжесть и прогноз течения ПВИ. Считается, что при правильном и стандартизированном заборе клинического материала вирусная нагрузка менее  $10^5$  геномных эквивалентов (ГЭ) ВПЧ в соскобе (Snijders, 2003), или  $10^3$  ГЭ, приходящихся на  $10^5$  клеток человека, клинически малозначима, так как практически не встречается при тяжёлой дисплазии и раке шейки матки, а также ассоциирована с минимальным риском их развития. Напротив, количество вируса более  $10^5$  ГЭ, приходящихся на  $10^5$  клеток, при установленном факте персистентного те-

1 Несмотря на то, что мужчины являются основным резервуаром для персистенции вируса и его переноса в популяции, скрининг на ВПЧ у мужчин не проводится



Рис. 2. Интерпретация результата количественно-го определения ВПЧ ([www.interlabservice.ru](http://www.interlabservice.ru))

чения инфекции (ВПЧ выявляется более 1 года) обозначается как повышенная нагрузка ВПЧ, ассоциировано с повышенным риском развития тяжёлой дисплазии и чаще встречается при раке шейки матки. Наконец, определённую информацию можно получить при мониторинге вирусной нагрузки. Так, считается, что снижение количества ДНК ВПЧ более чем в 10 раз может являться маркёром транзитной инфекции, а рост вирусной нагрузки через 3, 6 и 9 мес после проведённого лечения свидетельствует о возможности рецидива.

В процессе внедрения многоканальных ПЦР-детекторов режима реального времени (например, ДТ-96) на рынке появились тест-системы для количественного определения нагрузки ВПЧ в эпителиальных клетках. Особенностью данной технологии является использование участка ДНК бета-глобинового гена эпителиальных клеток человека, присутствующего в мазке в количестве, эквивалентном количеству эпителиальных клеток (1 фрагмент гена на 1 клетку), в качестве эндогенного внутреннего контроля, концентрация которого затем используется для нормализации количественного результата ПЦР — соотнесения полученной концентрации ДНК HPV на количество геномной ДНК с целью ни-

велирования эффекта вариации при взятии материала. Полученный показатель достаточно стабилен и в силу этого важен для тактики ведения пациентки.

Следует отметить, что для того, чтобы ПЦР-скрининг работал правильно и эффективно, необходимо соблюдать возрастные рамки его назначения:

- начало проведения — с возраста 25-30 лет (руководство Американского общества рака по скринингу на РШМ рекомендует проводить его с 30-летнего возраста);
- не ранее чем через 7-10 лет после вступления в половую жизнь.

Не имеет смысла проводить цитологический или ВПЧ-скрининг женщинам после 55-60 лет.

### Определение онкобелка E7

ПЦР-диагностика, помимо преимуществ в прямом обнаружении возбудителя, имеет и недостаток в виде высокой выявляемости ВПЧ в пробах. Далеко не каждая пациентка, у которой сейчас выявлен ВПЧ, даст в будущем дисплазию и рак. Этот факт заставляет врачей искать маркеры перехода ВПЧ-инфекции в онкогенную стадию. В качестве кандидатов на такие маркеры рассматривается тест выявления белка E7. Как было отмечено ранее, наблюдались случаи, когда вирус и ДНК не обнаруживаются, но имеется выраженная дисплазия и в клетках эпителия присутствует белок E7, синтез которого активируется вирусной ДНК после встраивания в геном клетки. Таким образом, факт интеграции вирусной ДНК может быть зарегистрирован по синтезу онкобелка E7.

Неоспоримым достоинством E7 как онкомаркера является то, что в норме этот белок в тканях не синтезируется. Наличие его в цервикальных пробах может рассматриваться как однозначное свидетельство начавшегося процесса малигнизации эпителиальных клеток, содержащих интегрированную копию генома ВПЧ.

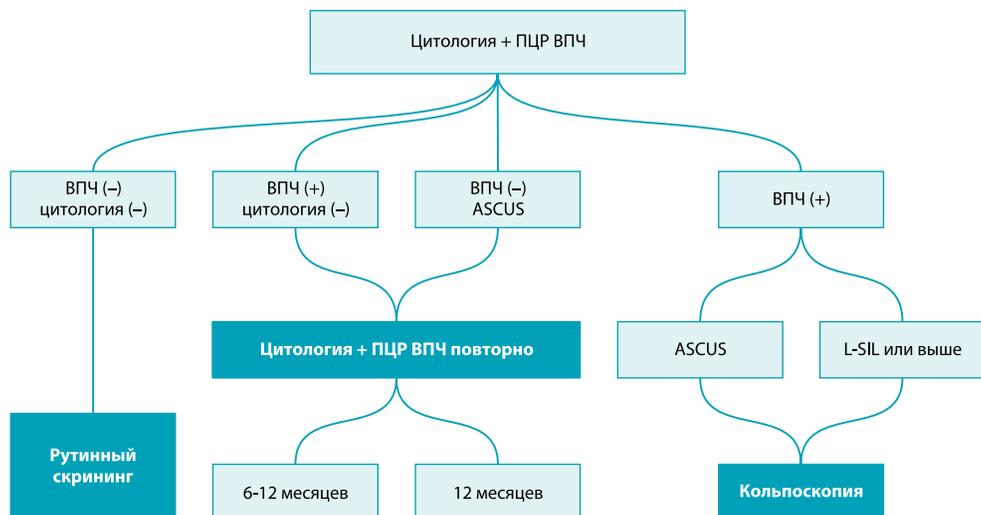


Рис. 3. Руководство ASCCP по использованию ВПЧ-теста в дополнение к цитологии (American Society of Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) Interim Guidance on the use of HPV DNA testing as an adjunct to cervical cytology. Wright T.C., *Obstetr Gynecol* 2004; 103: 304-9)

Измерение белка E7 в цервикальных пробах позволяет сделать следующие выводы:

1. Определение стадии развития вирусной инфекции. Повышенный синтез онкобелка E7 указывает на интегративную фазу инфекционного процесса, при которой вероятность спонтанной ремиссии очень низкая.
2. Уровень онкобелка E7 достоверно коррелирует с агрессивностью зарождающегося опухолевого процесса, высокий уровень белка E7 может рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак.
3. Онкобелок E7 является мощным иммуносупрессивным агентом, существенно снижающим эффективность интерферонотерапии с использованием индукторов интерферона и иммуномодуляторов.

### Алгоритм ведения женщин с ВПЧ инфекцией

Предлагается следующий алгоритм ведения женщин с ПВИ.

#### 1 этап. Обследование

— выявление и лечение других гени-

тальных инфекций, включая СПИД, сифилис, гепатит и дисбиоз влагалища;

- кольпоскопия и определение ВПЧ в цервикальном канале с его типированием;
- биопсия из очагов поражения (по показаниям) или PAP-тест;
- обследование и лечение (при необходимости) половых партнеров;
- исследование иммунной системы с акцентом на интерфероновый статус.

#### 2 этап. Определение тактики

Выбор тактики лечения или наблюдения осуществляется дифференцированно, в зависимости от результатов обследования.

**Показания для наблюдения:** латентная форма ПВИ. Периодическое обследование, включающее кольпоскопию, ПАП-тест и ПЦР ДНК ВПЧ. Частота обследования: при персистенции высокоонкогенных типов — ВПЧ 1 раз в 6 мес, при их отсутствии — 1 раз в год.

**Показания для лечения:** клинические, субклинические формы ПВИ, CIN и рак шейки матки.



## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ДИСПЛАЗИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Голикова О. И., Селиванов Е. В.

Цитологический метод является одним из основных в диагностике патологии шейки матки. Использование цитологических методик и цитологического скрининга позволило снизить в первом десятилетии XXI века заболеваемость РШМ в развитых странах на 70-80%.

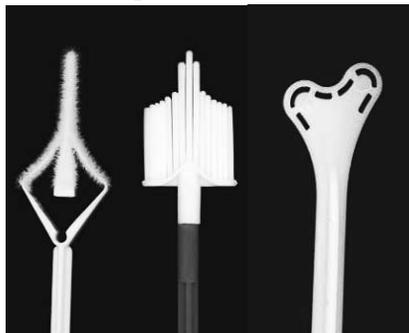
Метод цитологического скрининга признан классическим и рекомендован ВОЗ для использования в национальных программах. Чувствительность цитологического метода исследования, по данным разных авторов, составляет 66-83%, специфичность — 60-85%.

Информативность цитологического метода определяется уровнем подготовки специалистов, и, особенно, качеством взятия материала для цитологического исследования, так как неправильное взятие материала повышает частоту ложноотрицательных результатов.

### Как взять материал правильно:

1. Готовим пациентку. Не рекомендуется проводить обследование во время менструации, при наличии воспалительного процесса. За 48 часов до взятия ПАП-мазка необходимо воздержаться от сексуальных контактов, применения тампонов, использования любых вагинальных кремов, суппозиторий и лекарств, спринцеваний и вагинального душа.
2. Мазок следует брать до гинекологического осмотра, кольпоскопии или не ранее чем через 48 часов после этих манипуляций.

3. Мазок для цитологического исследования следует брать с поверхности экзоцервикса с помощью шпателя, из эндоцервикса — с помощью щетки-эндобраша.
4. Наносят материал тонким слоем на специально обработанное обезжиренное стекло. Допустимо нанесение двух образцов (с экзоцервикса и эндоцервикса) на одно стекло.



Для препаратов, которые в дальнейшем будут окрашиваться традиционными способами, допускается высушивание на воздухе, однако такие препараты дают значительно меньше информации, чем препараты окрашенные по Папаниколау. Важно знать, что для лучшего результата ПАП-теста мазок сразу после взятия должен быть обработан фиксатором для предотвращения высыхания клеток, поскольку их структура может необратимо деформироваться и трактовка такого материала будет затруднена. В продаже имеются специальные фиксаторы, в т.ч. аэрозольные. При отсутствии специального фиксатора препараты мож-

но помещать в смесь Никифорова (смесь спирта и эфира в соотношении 1:1) на 20 минут.

### Окраска препаратов по Папаниколау

Более 60 лет назад, в 40-е годы XX века, доктор Папаниколау предложил особую смесь красителей и последовательность их нанесения для окраски цитологических препаратов для выявления патологии шейки матки. Методика впоследствии получила название «Окраска по Папаниколау» или ПАП-тест.

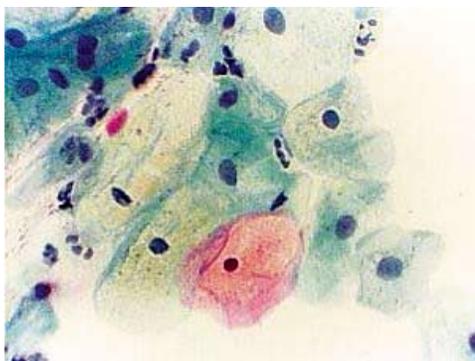


Рис. 1. Микроскопическая картина цервикального мазка при окраске по Папаниколау.

ПАП-тест широко используется в развитых странах для скрининга рака шейки матки, предраковых и фоновых состояний. Сегодня существуют полностью автоматические системы получения, окраски, оценки и архивирования таких препаратов; например BD SurePath + BD FocalPoint GS. В России из-за сложности окраски и высокой стоимости красителей ПАП-тест не получил должного распространения. Скрининговое применение ПАП-теста в странах Северной Европы с последующим лечением предопухольных состояний и ранних форм рака позволило уменьшить смертность от инвазивной цервикальной карциномы на 50-70 %.

**Интерпретация результатов.** Сначала оценивается качество мазка: качественный, некачественный. Если качество мазка неудовлетворительное, мазок необходимо повторить.

Мазок по Папаниколау может быть отрицательным (I класс) или положительным (II–V классы). В норме атипичных клеток нет, все клетки одинаковой формы и размеров. Наличие клеток эпителия с полиморфными гиперхромными ядрами характеризуется как положительный мазок по Папаниколау. Положительный результат мазка на атипичные клетки не означает рака или предракового состояния, а лишь свидетельствует о необходимости дальнейших исследований. Причиной появления атипичных клеток может быть наличие воспаления (хламидиоз, герпетическая инфекция, гонорея, трихомоноз), инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ).

При папилломавирусной инфекции часто обнаруживается *койлоцитоз клеток*. Койлоциты — клетки плоского эпителия неправильной формы, с четкими границами. Размеры койлоцитов различные, обычно они больше нормальных клеток. Ядра койлоцитов увеличены в разной степени, ядерная мембрана неровная, складчатая. Вокруг ядра отмечается зона просветления цитоплазмы.

### Цитологическая классификация по Папаниколау:

- 1 класс** — нормальная цитологическая картина;
- 2 класс** — изменение морфологии клеток, обусловленное воспалительным процессом во влагалище и (или) шейке матки;
- 3 класс** — единичные клетки с аномалией ядер и цитоплазмы (подозрение на злокачественное новообразование);
- 4 класс** — отдельные клетки с явными признаками озлокачествления;
- 5 класс** — большое число типично раковых клеток. Диагноз злокачественного новообразования не вызывает сомнений.

При классификации по системе Bethesda (The Bethesda System — TBS) в заключении врача-цитолога могут

встретиться следующие термины:

**ASCUS** (atypical squamous cells of undetermined significance) или АПНЗ (атипия плоскоклеточная неопределенной значимости);

**CIN** (cervical intraepithelial neoplasia) или ЦИН (цервикальная интраэпителиальная неоплазия) (термин применяется как синоним дисплазии шейки матки);

**LSIL** (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions) или Н-ПИП (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени выраженности);

**HSIL** (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions) или В-ПИП (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени выраженности).

### Жидкостная цитология

Необходимым условием для точной оценки мазка врачом-цитологом является правильно сделанный и хорошо окрашенный мазок. Эффективность цитологической диагностики в значительной мере определяется качеством приготовления препаратов. К сожалению, именно здесь и происходит большее число ошибок, приводящих к неадекватности материала. Наиболее частой причиной отказов и неточной диагностики является небрежно нанесенный на предметное стекло материал. Слизь, при-

сутствующая в материале с поверхности слизистой оболочки, мешает перенести на мазок клетки, также такой материал невозможно равномерно перемешать. Мазок может быть неравномерно распределен на стекле. Слишком толстый мазок является причиной получения неполноценного материала. При переносе материала на стекло традиционным способом клетки целого региона цервикса могут не попасть в препарат. Подсушивание и потеря прилипших к инструменту клеток значительно уменьшает диагностическую информативность микропрепаратов. Исследование подобных мазков крайне затруднено, клеточные элементы слеплены друг с другом, и цитолог часто не в состоянии рассмотреть их морфологию.

Для исключения негативных факторов классической онкоцитологии и преодоления трудностей в изготовлении качественных цитологических мазков была разработана инновационная технология, позволившая при минимуме затрат добиться получения препарата отличного качества в 99% случаев.

Эта технология получила название «жидкостной цитологии» (ЖЦ). В отличие от классического приготовления препарата, когда мазок наносится на стекло, при ЖЦ собранные с помощью цервикальной щетки клетки помещаются в жидкую консервационную среду. В лаборатории клетки при помощи спе-

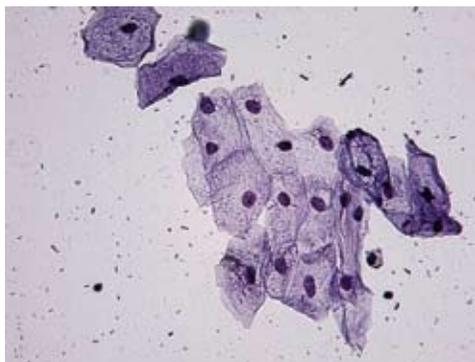
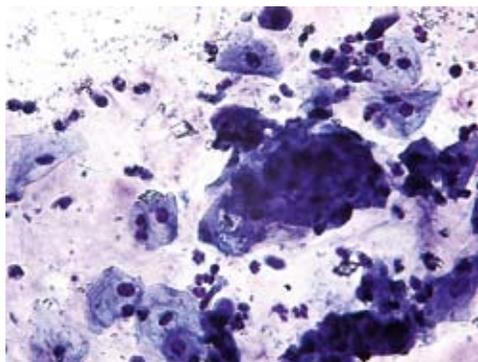


Рис 2. Цитологический препарат, полученный традиционным методом (слева) и по технологии Cytoscreen (справа). Микрофотограммы предоставлены кафедрой клинической лабораторной диагностики РМАПО.

циальной цитоцентрифути наносятся ровным тонким слоем на стекло для изучения. При этом весь клеточный материал сохраняет без изменения свои морфологические и иммуноцитохимические свойства. Полученный препарат имеет отличные характеристики. Все клетки в нем доступны для просмотра цитолога, да и количество клеток намного больше, чем в классическом мазке. Оставшийся образец сохраняется для проведения тестирования на ВПЧ.

Известно несколько систем для автоматизации процесса ЖЦ: AutoCytePrep (CytoRich), Cytoscreen, LABONORD Easy Prep, Thin Prep.

За последние 5 лет в разных странах проводилось много исследований, в которых сравнивалась эффективность традиционной техники и ЖЦ, используя для подтверждения диагнозов гистологическую экспертизу как «золотой стандарт» и оценку цитопрепаратов согласно классификации TBS (The Bethesda System). В исследовании участвовали как поликлинические, так и стационарные отделения, обследовавшие тысячи пациентов. По обобщенным данным,

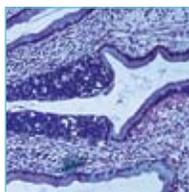
чувствительность ЖЦ составила 71-95 %, специфичность 67-76 %, тогда как классическая техника имеет чувствительность 55-65 %, а специфичность — 65-70 %. Авторы исследований резюмировали, что метод ЖЦ является более надежным лабораторным тестом, уменьшает количество ложноотрицательных результатов, уменьшает количество неудовлетворительных для анализа препаратов и снижает время, необходимое цитологу для оценки препарата.

Таким образом, можно констатировать, что методика ЖЦ уменьшает число ложноотрицательных результатов и повышает выявляемость цервикального рака. Очевидно, что использование жидкостной цитологии также уменьшит число неудовлетворительных мазков и затраты времени для получения образцов.

Существует ещё один аспект онкоцитологических исследований, заслуживающий обсуждения — постаналитический этап исследования, или формальные правила описания мазка. Попытка освещения этой темы предпринята в следующей статье.

Наша лаборатория выполняет следующие исследования, необходимые для диагностики рака шейки матки:

- мазок на онкоцитологию с шейки матки;
- мазок на онкоцитологию с шейки матки с PAP-тестом (окраска по Папаниколау);
- жидкостная цитология с шейки матки (тонкослойная цитология с одновременным выполнением ПЦР ВПЧ 16/18 типов);
- жидкостная цитология с шейки матки без ПЦР-детекции ВПЧ;
- ПЦР скрининг на ВПЧ (типы 16, 18, 31, 33, 35, 35Н, 39, 45, 52, 58-59, 67);
- ПЦР скрининг на ВПЧ (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58-59) методом real-time ПЦР количественно;
- ПЦР ВПЧ высокого онкогенного риска (типы 16, 18);
- ПЦР ВПЧ высокого онкогенного риска (типы 16, 18) методом real-time ПЦР количественно;
- ПЦР ВПЧ среднего онкогенного риска (типы 31, 33);
- ПЦР ВПЧ низкого онкогенного риска (типы 6, 11);
- ПЦР раздельное выявление ВПЧ 16 и 18 типов;
- ПЦР типирование ВПЧ (типы 6/11, 16/18, 31/33);
- ПЦР полное типирование ВПЧ (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58-59, 66).



## ПРИМЕНЕНИЕ ОНКОМАРКЕРА SCCA ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

*Выражаем признательность компании «Биохиммак», предоставившей основные материалы о маркере SCCA*

К онкомаркерам традиционно относят вещества, которые продуцируются преимущественно опухолевыми клетками, и не встречаются или встречаются в незначительных количествах у взрослых. Основная часть злокачественных новообразований шейки матки — это плоскоклеточный рак. При этом заболевании самым информативным из онкомаркеров, применяемых для мониторинга течения заболевания и оценки эффективности проводимого лечения, является антиген плоскоклеточной карциномы SCCA (SCC, TA-4), опухоль-ассоциированный антиген плоскоклеточных карцином различных локализаций, впервые выделенный из тканей плоскоклеточной карциномы шейки матки в 1977 году. Дополнительно можно использовать раково-эмбриональный антиген (РЭА) и цитокератин TPS.

Как показано в таблице 1, реальное клиническое повышение начинается только со стадий IIВ-III, поэтому диагностическая ценность SCCA невелика, а клиническое значение имеет лишь использование для мониторинга. Кроме того, SCCA повышается при других плоскоклеточных карциномах, например при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (SCCHN).

Так, повышенный уровень SCCA до лечения коррелирует с размером опухоли и поражением лимфатических узлов. Высокие исходные значения маркера SCCA (выше 8,6 нг/мл) свидетельствуют о высоком риске метастатического поражения тазовых лимфоузлов у оперированных больных РШМ. По данным различных клиник, применявших мониторинг SCCA, рост уровня маркера позволял вы-

явить развитие рецидива за 2-13 месяцев до его клинического выявления.

Таблица 1  
Частота повышения уровня SCCA в зависимости от стадии заболевания

Стадия	% повышенных уровней SCCA
IB	37.8
IIA	50.5
IIB	67.1
III	82.8
IV	83.3

Период полужизни SCCA составляет около часа, поэтому уже в первые двое суток после операции его уровень снижается до нормальных показателей. Недостаточное снижение уровня может свидетельствовать о неполном удалении опухоли или наличии удаленных метастазов. Также коррелирует уровень этого маркера и с эффективностью химио- и лучевой терапии: повышенный уровень всегда означает неэффективное лечение.

При проведении анализа на определение SCCA следует помнить, что загрязнение проб слюной или элементами кожи может вести к ложноположительным результатам. Повышенный уровень SCCA обнаруживается при беременности сроком более 16 недель. Уровень SCCA может быть повышен у больных с бронхиальной астмой, при почечной или печеночной недостаточности.

Таким образом, SCCA является высокоэффективным средством мониторинга терапии и выявления рецидивов рака шейки матки, но не может быть использован для диагностики этого заболевания.



## Формы выдачи цитологических заключений с использованием лабораторной информационной системы, или почему мы так делаем?

Селиванов Е. В., Голикова О. И., Звягинцев Е. Н.

Таблица 1

При введении в практику лабораторий цифровой выдачи результатов возникла проблема оформления ответов при цитологических исследованиях. Описание цитологических препаратов зависит от многих факторов: клеточного состава мазка, правильности взятия материала, задач, которые клиницист ставит перед цитологом. Поэтому, внедрив в своей лаборатории лабораторную информационную систему (ЛИС), мы столкнулись с необходимостью разработки единого шаблона выдачи результатов, который позволял бы описать все многообразие картин мазков при онкоцитологическом исследовании шейки матки. За основу была принята форма медицинской документации №446/у, введенная приказом 174 МЗ РФ от 24.04.2003 г.

Получившийся шаблон (в табл. 1 приведены пункты стандартного бланка, заполняемого цитологом, с вариантами готовых ответов), возможно, далек от идеала, и может быть непривычным для восприятия врачом, привыкшим к пространственным цитологическим описаниям, однако он довольно точно воспроизводит требования упомянутого приказа. Поскольку такая форма выдачи цитологического заключения вызывает неоднозначную реакцию клиницистов, мы хотели бы показать, что наш вариант описания в первую очередь отталкивается от нормативных документов, принятых сегодня в России (рис. 1).

Параметр	Значение
Качество препарата	Адекватный, недостаточно адекватный, неадекватный
Лейкоцитоз	0-5, до 30, свыше 30 в поле зрения
Слизь	Отсутствует, незначительное количество, большое количество
Эритроциты	Отсутствуют, незначительное количество свежих эритроцитов, большое количество свежих эритроцитов, измененные эритроциты
Койлоциты	Отсутствуют, выявлены
Атипичские клетки	Отсутствуют, выявлены
Клетки плоского эпителия	Поверхностных слоёв, промежуточных слоёв, базально-парабазальных слоёв, с признаками гиперкератоза, с признаками паракератоза, с признаками дискератоза, с признаками плоскоклеточной метаплазии, плоскоклеточная метаплазия с атипией, пласты резервного эпителия, с признаками лучевых изменений, характерных для ВПЧ-инфекции, с признаками дисплазии 1 степени, 2 степени, 3 степени, с признаками атипии
Клетки цилиндрического эпителия	Отсутствуют, с признаками пролиферации, с признаками секреции, с признаками дегенеративных изменений, с признаками репаративных изменений, с признаками дистрофии
Цитограмма соответствует	возрастной норме, пролиферации (гиперплазии) железистого эпителия, гиперкератозу (паракератозу, дискератозу) плоского эпителия, атрофическому кольпиту, воспалительной атипии, плоскоклеточной метаплазии, плоскоклеточной метаплазии с атипией, дегенеративным изменениям эпителия, репаративным изменениям эпителия, лучевым изменениям эпителия (лучевой патоморфоз), изменениям клеток плоского эпителия, характерным для папилломавирусной инфекции, бактериальному вагинозу, раку (плоскоклеточный, плоскоклеточный с ороговением, плоскоклеточный из мелких клеток), аденокарциноме, воспалительному процессу (см. ниже)
Этиологический фактор воспалительного процесса:	отсутствует, трихомонада, дрожжеподобные грибы, псевдомонгелии и споры грибов, коккобациллярная флора, лептотрикс, смешанная флора, актиномицеты, изменения, характерные для герпесвирусной инфекции, для ВПЧ-инфекции
Выраженность воспалительного процесса:	воспалительный процесс отсутствует, умеренно выраженный, выраженный
Заключение	цитогрaмма без особенностей, клетки с признаками гиперкератоза и скоплением безъядерных чешуек, клетки с признаками гиперкератоза, паракератоза, дискератоза, цитогрaмма фолликулярного цервицита, цитогрaмма воспаления, цитогрaмма трихомонадного кольпита, цитогрaмма кандидозного кольпита, цитогрaмма с признаками хламидийной инфекции, изменения, характерные для герпетической инфекции, изменения, характерные для папилломавирусной инфекции, цитогрaмма атрофического кольпита, цитогрaмма атрофического типа (без воспаления), гиперплазия резервного эпителия с участками плоскоклеточной метаплазии, эстрогенный тип мазка у женщин в менопаузе длительностью более 10 лет, признаки бактериального вагиноза, изменения клеток плоского эпителия с признаками дисплазии 1, 2, 3 степени, цитогрaмма плоскоклеточного рака с ороговением, цитогрaмма плоскоклеточного рака без ороговения, подозрение на плоскоклеточный рак, цитогрaмма аденокарциномы (высокодифференцированной, умеренно дифференцированной, низкодифференцированной)
PAP тест	отрицательный (1 класс); положительный (2 класс, 3 класс, 4 класс, 5 класс)
Рекомендации	нет; рекомендуется дополнительное обследование

1. Качество препарата: адекватный, недостаточно адекватный, неадекватный (нужно подчеркнуть)
2. Цитограмма (нужно ответить)
  - 2.1. Без особенностей (для репродуктивного возраста) (дать описание): .....
  - 2.2. С возрастными изменениями слизистыми оболочками:
    - атрофический тип мазка;
    - эстрогенный тип мазка.

3. Цитограмма (описание) .....

- Соответствует (нужно отметить):
- 3.1. Проплиферации (гиперплазии) железистого эпителия
  - 3.2. Гиперкератозу плоского эпителия
  - 3.3. Воспалительному процессу слизистой оболочки (вагинит, эктоцервицит, эндоцервицит) уточнить:
    - этиологический фактор
    - степень выраженности .....

- 3.4. Бактериальному вагинозу
- 3.5. Атрофическому кольпиту
- 3.6. Нарезко выраженным изменениям клеток плоского эпителия:
  - лёгкой дисплазии;
  - изменениям, характерным для папилломавирусной инфекции.
- 3.7. Изменениям клеток плоского эпителия (уточнить):
  - умеренной дисплазии;
  - тяжёлой дисплазии.
- 3.8. Раку (уточнить форму) .....

4. Другие типы патологических заключений .....
5. Дополнительные уточнения .....



**ООО МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР ЛАБОРАТОРИЯ «ДНК-ДИАГНОСТИКА»**  
 г. Барнаул, тел. (38532) 289-0391 г. Новосибирск, (383) 274-90-83  
 г. Омск: +7 961 873 8830 г. Красноярск: (911) 294-43-26  
 Лицензия Ростребнадзора № 22.01.16.001.16.001.10.12.06 от 04.12.2006 г.

Пациент **Имарек А Ю** Заявка **XVZ/16** от **17/03/10** Пол **Ж**  
 Адрес пациента **21068**  
 Предполагаемый диагноз  
 Заказчик **Клиника доктора Иванова** Код **-** Телефон **-**  
 Врач **---** Код **-** Телефон **-**  
 Тип образца **Мазок** Дата поступления **12-3-2010 8-40-00** Замечание

Название	Результат	Единиц	Референтные значения
<b>15.5.100 Мазок на онкоцитологию</b>	Здеватный	.	Здеватный
Лейкоцитоз	0-5 в поле зрения	.	0-6 в поле зрения
Слизь	<b>незначительное количество</b>	.	отсутствует
Эритроциты	отсутствуют	.	отсутствуют
Атипические клетки	отсутствуют	.	отсутствуют
Клетки плоского эпителия	поверхностных слоев	.	
Клетки цилиндрического эпителия	<b>признаки дистрофии</b>	.	отсутствуют
Койлоциты	не выявлены	.	не выявлены
Цитограмма соответствует	выявлены возрастной норме	.	возрастной норме
Этиологический фактор воспалительного процесса	отсутствует	.	отсутствует
Степень выраженности воспалительного процесса	отсутствует	.	отсутствует
Заключение: цитограмма	без особенностей	.	без особенностей

\* - Результат выходит за пределы референтных значений

Результат распечатан дежурными администратором регионального офиса

Рис 1. Соответствия между формой № 446/у и формализованным бланком результатов онкоцитологического исследования нашей лаборатории.

Лежат в маме два эмбриончика. Один эмбриончик спрашивает другого: «Как ты думаешь, а есть ли жизнь после беременности???» «Не знаю, — отвечает другой, — оттуда еще никто не возвращался...»

Идут испытания нового лекарства. Пациенты поделены на две группы — опытную и контрольную. Один из пациентов заходит к врачу:

— Доктор, почему вы заменили мой препарат? Доктор (очень осторожно):

— А что заставляет вас думать, что я его заменил?

— Понимаете, раньше, когда я кидал эти таблетки в унитаз, они плавали, а теперь вдруг стали тонуть.

Администратор в частной клинике сильно удивилась, когда из смотрового кабинета вылетела монашка и умчалась, не заплатив. Когда следом вышел врач, она спросила, что случилось.

— Я осмотрел ее и сказал, что она беременна, — заявил врач.

— Но, доктор, — воскликнула администратор, этого же не может быть!

— Конечно, не может, — ответил врач, зато икоту как рукой сняло.

— Доктор, у меня тик какой-то странный, как только начинаю пить чай, в глазу больно колет.

— А вы ложку из стакана вынимаете?

Осмотрев пациента, врач отводит его жену в сторону и говорит:

— Мне ваш муж не нравится...

— Мне тоже, доктор... Но он хороший семьянин.

— Доктор, ваше лекарство мне чудесно помогло!

— Ну, что я могу вам сказать? Бывает

— Доктор, у меня голова длинная.

— Это вам к акушеру вашему надо было обратиться лет 30 назад.

— Так я ему орал, орал...

— Доктор, какие грибы можно есть?

— Все, но некоторые только один раз.

— Доктор, я проглотил золотую ложку.

— Когда это случилось?

— 3 месяца назад.

— Что же Вы не пришли раньше?

— Я не нуждался в деньгах.

— Доктор! По мне все время бегают чертики.

— Какие еще чертики?

— Да вот эти, и эти, и эти...

— Да что же вы их на меня-то бросаете!!!

— У вас повышенное давление, — говорит врач пациенту-рыбаку.

— Это последствия рыбалки...

— Рыбалка, напротив, успокаивает...

— Согласен с вами, доктор. Но я ловлю рыбу в запрещенном месте.

— Итак, вас обвиняют в шарлатанстве. Вы продавали своим клиентам эликсир молодости. Вы уже осуждались?

— Да, в 1650, 1730 и 1890 годах.

Доктор: «Вам нельзя ни пить, не курить, ни играть в карты.» Больной: «Видно, тут уже побывала моя жена.»

Пациентка: «Доктор, вы просили показать язык... Но вы даже не взглянули на него.» Врач: «Извините. Я просто хотел написать рецепт в спокойной обстановке.»

Мужчина приходит на прием к врачу: «Доктор, я так волнуюсь, мне жена изменяет, а рога почему-то не растут». Врач: «А они и не должны расти, это образное выражение». Мужчина: «Спасибо, доктор, вы меня успокоили! А то я волноваться начал, думал, может кальция в организме не хватает.»

— Доктор, в последнее время я очень озабочен своими умственными способностями.

— А в чем дело? Каковы симптомы?

— Очень тревожные: все, что говорит моя жена, кажется мне разумным...

После осмотра врач говорит пациентке:

— Вы совершенно здоровы. Я только рекомендовал бы вам больше бывать на свежем воздухе, а зимой теплее одеваться. Дома муж спросил ее, что сказал врач.

— Рекомендовал мне летом отдых на море, а зимой — норковую шубу.

# Врачи шутят

Поздравляем с днём юмора!



## Влияние лекарств на результаты лабораторных тестов (продолжение)

Лабораторный показатель	Повышение	Снижение
АЧТВ/АПТВ	Гепарин Хлорпромазин Вальпроевая кислота	
Прямой тест Кумбса	Цефалоспорины Рифампицин Пенициллины Тетрациклин Ибупрофен Инсулин Изониазид Леводопа Триамтерен	
Антитромбин III	Анаболические стероиды Варфарин	Гепарин Эстрогены Оральные контрацептивы Аспарагиназа
Время кровотечения	Аллопуринол Аспирин Цефоперазон Карбенициллин Нифедипин Нестероидные противовоспалительные средства Пропранолол	
Протеин С	Оральные контрацептивы	
Протромбиновое время, МНО	Анаболические стероиды Цефалоспорины Этанол Гепарин Слабительные Варфарин Метотрексат Интерферон	Аспирин Оральные контрацептивы
Агрегация тромбоцитов	Никотиновая кислота Липемия	Аспирин Карбенициллин Диуретики Нифедипин Анестетики Трициклические антидепрессанты
Тромбиновое время	Гепарин Аспарагиназа	



Фото: Е. Селиванов