

ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ПЛОДОВЫЙ ГЕМОГЛОБИН В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ

Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Гудинская Н.И., Кривенцева М.Ю.,
Кривенцева Л.А.

ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», Астрахань, e-mail: rabbit1630@mail.ru

Создана моновалентная иммунохимическая тест-система на плодовой гемоглобин, в которой тест-антигеном являлся гемоллизат пуповинной крови в разведении: 1/128, порог чувствительности – 2,24±0,26 мг/л. Разработан оптимальный алгоритм количественного анализа HbF методом ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия. Широкая клиническая апробация иммунохимического теста на HbF, проведенная на 945 пациентах, показала достоверное повышение уровня этого протеина при миелопролиферативных заболеваниях крови: эритремии (на 78,9 % выше референтных значений), сублейкемическом миелозе (на 42,8 %), остром (на 58,1 %) и хроническом (на 70,2 %) миелолейкозе; у новорожденных с внутриутробной гипоксией и сопутствующей патологией (на 30,1 %), особенно, с задержкой внутриутробного развития (на 68,5 %); а также у больных с алкогольной зависимостью (на 129 %) и пациентов с опийной наркоманией (на 183 %).

Ключевые слова: плодовой гемоглобин, иммунохимия, тест-система, миелобластозы, гипоксия, наркомания.

CLINICAL INTRODUCTION OF DIAGNOSTIC TEST FOR DEPEND OF FETAL HEMOGLOBIN

Kriventsev Y.A., Bisaliev R.A., Gudinskaja N.I., Kriventseva M.Y.,
Kriventseva L.A.

Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: rabbit1630@mail.ru

Presented monovalent immunochemical test for hemoglobin system of the fetus. The test antigen is hemolysate of blood from umbilical cord. It dilution is 1/128, reference interval – 2,24±0,26 mg/l. Submit an optimal algorithm for quantitative analysis of HbF by rocket electrophoresis in agarose gel with sodium dodecyl sulfate. Immunochemical analysis of 945 patients, showed a significant increase in the level of this protein. There are myeloproliferative blood disorders: some of erythremia (78.9 % higher than the reference value), subleukemic myelosis (42.8 %), acute (58.1 %) and chronic (70.2 %), myeloleukemia; of newly-born child with intrauterine hypoxia and concomitant diseases (30.1%), especially with intrauterine growth retardation (68.5 %); and of patients with alcohol dependence (129 %) and patients with the baic drug addict (183 %).

Keywords: fetal hemoglobin, immunochemistry, test system, hematological malignancies, hypoxia, drug addiction.

На сегодняшний день описано множество генотипов гемоглобина, которые можно разделить на три группы: постоянно присутствующие в крови человека; появляющиеся только на определенных этапах развития организма и патологические. В последние годы повышается интерес к отдельным типам гемоглобина как диагностически значимым маркерам. Гетерогенная система гемоглобина человека является каноническим примером сложной полифункциональной белковой системы, включающей более 300 изоформ этого протеина. Одним из самых манифестных и значимых типов гемоглобина является эмбриоспецифический протеин – плодовой (фетальный) гемоглобин (HbF). Это железосодержащий тетрамер, состоящий из двух α - и двух γ -цепей. Изоэлектрическая точка белка, по данным разных авторов, составляет 6,9–7,15. Синтез плодового гемоглобина

человека начинается с 12–13 недели гестации, и к 6 месяцам этот белок полностью замещает собой онтогенетически более ранний эмбриональный гемоглобин. Концентрация HbF к моменту рождения составляет 50–80 % от общего гемоглобина. В крови взрослого здорового человека на долю плодового гемоглобина приходится не более 1,5 % от общего гемоглобина [5, 6].

Многочисленные литературные данные последних лет свидетельствуют о высокой диагностической значимости HbF. Его концентрация в крови достоверно изменяется при талассемиях, анемиях, патологии новорожденных, гипоксических состояниях, заболеваниях легких, эндокринных нарушениях, интоксикациях и др. [1, 2, 7, 9].

В современной клинической практике большинства стран для количественного анализа гемоглобинов в качестве стандартных применяются колориметрические циангемоглобиновые методы, рекомендованные комитетом по стандартизации Европейского и Международного Общества по Гематологии. Большинство колориметрических методов количественного определения гемоглобина не отличаются избирательностью: с их помощью определяется лишь общее количество гемоглобина крови, а не отдельные его типы. Даже в случае определения щелочеустойчивой фракции гемоглобина по Зингеру и Бетке регистрируются несколько типов гемоглобина, а не только плодовой гемоглобин [5, 6, 7].

В связи с вышесказанным, в последние годы ведется активный поиск и разработка новых оптимальных алгоритмов по количественному анализу плодового гемоглобина человека [6, 8, 9].

Актуальным и целесообразным является моделирование иммунохимических тест-систем на HbF, отличающихся абсолютной специфичностью и высокой точностью определения

Цель исследования: разработка иммунохимического теста количественного анализа плодового гемоглобина человека и его широкая клиническая апробация.

Материалы и методы исследования

Исследование было проведено в период с 2007 по 2015 г. на биоматериале общей численностью 945 образцов (табл. 1).

Таблица 1

Перечень использованного в работе материала

<i>Материал</i>	<i>Число образцов</i>
Кровь гематологических больных	243
Кровь наркологических больных	95
Пуповинная кровь новорожденных	194

Кровь пациентов с заболеваниями печени	202
Кровь здоровых доноров (группы контроля)	211
ВСЕГО	945

В работе применяли методы механически-термического гемолиза, комбинированной щелочной денатурации (поэтапная обработка гемолизата раствором сернокислового аммония 50 % насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующей седиментацией при 8000 g), препаративного электрофореза в агаровом геле на 0,1 М цитратном буфере с pH 6,0 (в авторской модификации), аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50 и гель-фильтрации на сефадексе G-200. Антисыворотки получали путем иммунизации кроликов породы «шиншилл» дробными дозами очищенного антигена с адьювантом Фрейнда по стандартной схеме. Для качественной и количественной регистрации белков в исследуемом биоматериале использовали: определение общего гемоглобина спектрофотометрически при 280 и 260 нм по Варбургу, иммунодиффузионное титрование по Ouchterlony, ракетный электрофорез в агаровом геле по Laurell [3].

Для математической обработки и оценки статистической значимости результатов исследования использовали лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), Excel-2007 (Microsoft). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), среднее квадратичное отклонение (σ), средние ошибки средней арифметической (m). С целью определения значимости p различий сопоставляемых величин применяли критерий t Стьюдента с поправкой Бонферрони и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для оценки межгрупповой зависимости проводили линейный корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции – r). Корреляция считалась высокой при приближении модульной величины r к единице. Статистические взаимосвязи между показателями оценивали применением корреляционного, регрессионного анализа и методов многомерной статистики [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее нами были получены новые данные по физико-химическим свойствам HbF и разработан оптимальный алгоритм выделения и очистки этого белка [7, 8], что легло в основу представленной работы, в ходе которой был использован очищенный препарат HbF для иммунизации кроликов и получения специфических иммунных антисывороток.

Нами проведена масштабная работа, включающая следующие, успешно завершённые этапы:

1. Моделирование моновалентной иммунохимической тест-системы на плодовой гемоглобин человека;
2. Разработка оптимального алгоритма количественного определения HbF;
3. Широкая клиническая апробация нового иммунохимического теста на HbF.

На первом этапе работы была смоделирована моновалентная иммунохимическая тест-система на HbF, в которой тест-антигеном являлся гемолизат пуповинной крови в разведении: 1/128, порог чувствительности тест-системы – $2,24 \pm 0,26$ мг/л ($p < 0,005$).

Селективность и чувствительность полученной тест-системы была верифицирована путем иммунохимического анализа с необходимым антигенным материалом, специфического окрашивания бензидиновым и гваяколовым методами, иммуноэлектрофорезом и иммунодиффузией по Оухтерлони.

Полученную иммунохимическую тест-систему в дальнейшем использовали для разработки оптимального способа количественного анализа плодового гемоглобина.

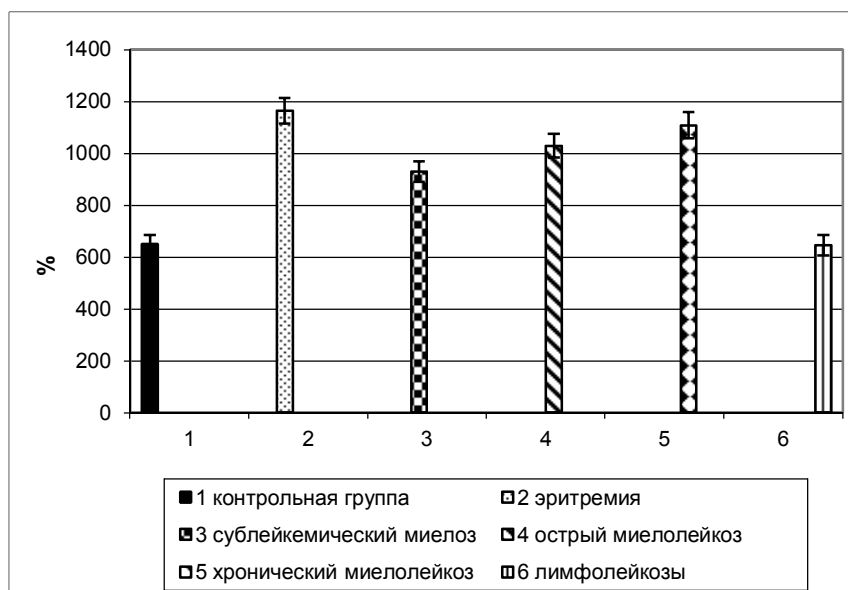
Для данной цели был разработан способ ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия [8]. Корреляционный анализ Пирсона показал высокую прямую зависимость концентрации HbF от квадрата диаметра кольца преципитации ($r = 0,96$; $p < 0,001$). Преимущества способа: специфичность, высокая чувствительность (порог чувствительности – $1,72 \pm 0,27$ мг/л), точность (максимальная погрешность $\pm 2\%$), экономия времени (8-10 ч), значимость регистрации, в том числе и при определении малых величин гемоглобина ($F = 8,3$; $p < 0,01$).

На заключительном этапе работы проведена апробация разработанного теста на широком клиническом материале, результаты которой приводятся ниже.

1. Миелопролиферативные заболевания

Отмечено значительное достоверное ($t > 4,65$; $p < 0,005$) повышение концентрации HbF в крови больных эритремией (на 78,9 % выше референтных значений), сублейкемическим миелозом (на 42,8 %), острым (на 58,1 %) и хроническим (на 70,2 %) миелолейкозом.

Для дополнительной верификации полученных результатов в тех же выборках было проведено их конвертирование в относительные величины: процент от общего гемоглобина в каждой нозологической группе. Полученные данные (в %) в целом адекватно соотносились с результатами иммунохимического тестирования HbF (в мг/л) (рисунок).



Уровень HbF при некоторых гемобластозах

Полученные результаты свидетельствуют, что плодовой гемоглобин может рассматриваться как канцероэмбриональный антиген, иммунохимическая регистрация которого может повысить качество диагностики миелопролиферативных заболеваний. Следует отметить, что в силу дешевизны, простоты и доступности (для проведения тестов на HbF по предложенной схеме достаточно 0,1 мл крови из пальца), разработанный иммунохимический тест на HbF может применяться в скрининг-обследовании групп риска по данной нозологии.

2. Патология новорожденных

Проведен иммунохимический анализ HbF у новорожденных с внутриутробной гипоксией и сопутствующей патологией. Показано значительное достоверное ($t=5,53$; $p<0,002$; $F>4,9$) повышение уровня HbF в крови новорожденных с тяжелой внутриутробной гипоксией (на 30,1% выше, чем в группе контроля), и, особенно, с задержкой внутриутробного развития в сочетании с тяжелой внутриутробной гипоксией (на 68,5%). Концентрация HbF в крови новорожденных с массой тела менее 1000 г, наоборот, оказалась на 58,3% ниже, чем в контрольной группе ($t=7,2$; $p<0,001$; $F=9,1$).

Сравнительный анализ уровня плодового гемоглобина у новорожденных по гендерному признаку показал, что уровень HbF в крови новорожденных девочек достоверно ($t=4,9$; $p<0,001$; $F=7,1$) превышает таковой у новорожденных мальчиков. И если в группе здоровых детей эта разница невелика, то в группе новорожденных с внутриутробной

гипоксией уровень HbF в крови новорожденных девочек значительно выше, чем у мальчиков ($t=7,3$; $P<0,0005$; $F=6,8$).

Полученные данные о повышении уровня плодового гемоглобина при гипоксии, очевидно, объясняются тем, что этот протеин имеет большее сродство к кислороду, чем гемоглобин взрослого, следовательно, увеличение уровня HbF в крови способствует более оптимальному тканевому газообмену в условиях тканевой гипоксии. Значительный разброс средних концентраций HbF в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией можно объяснить более высокими компенсаторными возможностями женского организма в этом онтогенетическом периоде.

3. Наркоманическая и алкогольная зависимость

Иммунохимический анализ уровня плодового гемоглобина у больных с алкогольной зависимостью и пациентов с опийной наркоманией показал манифестные результаты. Показано значительное превышение концентрации HbF в крови больных алкогольной зависимостью и опийной наркоманией почти в три раза, по сравнению с уровнем концентрации этого белка в крови доноров контрольной группы (табл. 2). Анализ статистической значимости полученных результатов показал высокую степень достоверности как в группе больных опийной наркоманией ($t=7,20$; $P<0,001$), так и в группе больных алкоголизмом ($t=6,39$; $P<0,001$).

Таблица 2

Показатели HbF в крови наркологических больных

<i>Исследуемая группа</i>	<i>n</i>	<i>Концентрация HbF (мг/л)</i>	<i>Процент HbF от общего Hb</i>
Кровь больных опийной наркоманией	50	1847±97	4,25
Кровь больных алкоголизмом	45	1632±84	3,77
Кровь здоровых (контрольная группа)	43	653±46	1,52

Экспрессия гамма-гена плодового гемоглобина у наркологических больных, по нашему мнению, объясняется тем, что метаболический диссонанс, возникающий в результате хронической интоксикации психоактивными веществами, затрагивает процессы митохондриального тканевого дыхания, что приводит к развитию гипоксических состояний. А HbF, как было сказано выше, является ферропротеином, эволюционно адаптированным к оптимизации тканевого газообмена в условиях хронической гипоксии. С другой стороны, возможно в результате хронической интоксикации ПАВ, в некоторых гемопэтических

стволовых клетках возникает трансформация генетических структур, ведущая к изменению интенсивности синтеза фетального гемоглобина.

Заключение

Иммунохимический тест на плодовой гемоглобин является абсолютно специфичным и высокочувствительным диагностическим тестом на данный белок. Его широкое внедрение в клиническую практику, безусловно, повысит качество и эффективность диагностики в соответствующих нозологических сферах.

Список литературы

1. Безрукавникова Н.В. Стероидсвязывающие белки у больных раком молочной железы / Н.В. Безрукавникова, А.В. Коханов, Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Л.М. Берштейн, В.В. Кутуков // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 409-413.
2. Бойко О.В. Исследование уровня цитокинов в биологических жидкостях бактерионосителей / О.В. Бойко, А.Х. Ахминеева, Н.И. Гудинская, Л.И. Алексашина // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 366.
3. Галь Э. Электрофорез в разделении биохимических макромолекул / Э. Галь, Г. Медьеша, Л. Верецки. – М. : Знание, 1982. – 446 с.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланцл. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
5. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб.: Элби-СПб, 2000. – 324 с.
6. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства / Л. И. Иржак. – М. : Наука, 1983. – 150 с.
7. Касьянова Т.Р. Диагностическое значение определения фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени / Т.Р. Касьянова, Б.Н. Левитан, Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10-3. – С. 505-508.
8. Кривенцев Ю.А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией / Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Р.А. Бисалиева // Омский научный вестник. – 2006. – Т. 46, № 9. – С. 272.
9. Токарев Ю.Н. Иммунохимический метод ряда гемоглобинопатий: методические рекомендации / Ю. Н. Токарев, А. Н. Ахундова, А. П. Андреева. – Баку: Новая книжная типография, 1982. – 9 с.