

НОВЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ТЕСТ В ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НАРКОТИЧЕСКОЙ И АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ

Кривенцев Ю.А.¹, Носков А.И.¹, Кривенцева М.Ю.², Гудинская Н.И.¹,
Мухамедзянова Р.И.¹

¹ ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru;

² ГБУЗ АО «Патологоанатомическое бюро», Астрахань, e-mail: cpab@mail.ru

В ходе работы создана моновалентная иммунохимическая тест-система на плодовой гемоглобин человека, в которой тест-антигеном являлся гемолизат пуповинной крови в разведении: 1/256, порог чувствительности – $2,26 \pm 0,24$ мг/л. Разработан оптимальный алгоритм количественного анализа плодового гемоглобина методом ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия. Иммунохимический анализ уровня плодового гемоглобина в исследуемых группах показал значительное достоверное повышение средней концентрации этого белка в крови пациентов с алкогольной (на 151,84% выше референтных величин) и наркотической зависимостью (на 183,89%). Доказана высокая диагностическая значимость иммунохимического теста на плодовой гемоглобин при наркологической патологии по всем характеристикам: специфичности (99,3%), чувствительности теста (94,7%), прогностичности положительного (97,7%) и отрицательного (84,1%) результата. Диагностическая эффективность предлагаемого теста составила 96,8%.

Ключевые слова: плодовой гемоглобин, иммунохимия, тест-система, зависимость, алкоголизм, наркомания

A NEW DIAGNOSTIC TEST IN THE ANALYSIS OF PATIENTS WITH DRUG AND ALCOHOL ADDICTION

Kriventsev Y.A.¹, Noskov A.I.¹, Kriventseva M.Y.², Gudinskaja N.I.¹,
Muhamedzanova R.I.¹

¹ Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: agma@astranet.ru

² mortem Bureau Astrachan, e-mail: cpab@mail.ru

In this work proposed monovalent immunochemical test system in the human fetal hemoglobin. The test antigen is hemolysate of blood from umbilical cord. It dilution is 1/256, reference interval — $2,26 \pm 0,24$ mg/l. The result of research is optimal algorithm for quantitative analysis of fetal hemoglobin by rocket electrophoresis in agarose gel with sodium dodecyl sulfate. Immunochemical analysis of the level of fetal hemoglobin in the treatment groups showed a significant increase in the average concentration of this protein in the blood of patients with alcohol addiction (more than 151,84% above the reference value) and drug addiction (more than 183,89% above the reference value). It proves the high diagnostic value of the immunochemical test for fetal hemoglobin at drug pathology. The test is specificity (99,3%), sensitivity (94,7%), the positive predictability (97,7%) and negative predictability (84,1%) result. The diagnostic efficiency of the proposed test was 96.8%.

Keywords: fetal hemoglobin, immunochemistry, test system, addiction, alcoholism, drug addiction

Литературные данные последних десятилетий свидетельствуют о неуклонном росте распространенности наркотической и алкогольной зависимости как среди различных социальных групп населения Российской Федерации, так и в большинстве зарубежных стран. Данная проблема давно перешла из ранга медико-профилактической в масштаб социальной, ее решение является на сегодняшний день одной из первостепенных общегосударственных задач [4, 8, 9].

Описанная угрожающая тенденция широкого вовлечения населения в процесс систематического употребления наркотических препаратов и алкоголя, а также

недостаточная эффективность методик профилактики, диагностики и лечения алкогольной и наркотической зависимости остро ставит вопрос о необходимости разработки оптимальных методов предотвращения, раннего выявления и терапевтических мер, направленных на борьбу с этим негативным медико-социальным феноменом. Следует заметить, что на сегодняшний день недостаточно изученными остаются вопросы гомеостатического дисбаланса, нарушения энергетических и метаболических процессов на молекулярно-биохимическом уровне при данной патологии [8, 9].

В свете вышесказанного разработка новых методов диагностики, оценки клинического состояния и эффективности терапии пациентов с наркотической и алкогольной зависимостью представляется актуальной задачей.

В данной работе авторы руководствовались предположением, что метаболический диссонанс, возникающий при хронической интоксикации психоактивными веществами (ПАВ), затрагивает процессы аэробного митохондриального окисления, что влечет за собой развитие тканевой гипоксии. Периферическое звено эритрона является сверхчувствительной системой, тонко реагирующей на изменения гомеостаза, в частности – на изменение газового состава крови и тканей [2, 4, 6].

Наиболее перспективным маркером хронической гипоксии, на наш взгляд, является стадиоспецифический хромопротеин человека – плодовой (фетальный) гемоглобин (HbF). Активация γ -гена этого белка в постнатальном периоде жизни человека возможна при состояниях, сопровождающихся гипоксиями различного генеза, приводящими к индукции синтеза HbF, как адаптивного эмбриоспецифического белка, способствующего оптимизации процессов тканевого газообмена в условиях хронической гипоксемии. Данный феномен объясняется более высоким сродством плодового гемоглобина к кислороду, нежели гемоглобин взрослого [5, 6, 10].

По названным причинам в качестве диагностического маркера соматического статуса больных алкогольной и наркотической зависимостью авторами был выбран HbF. Изучение динамики продукции этого белка при названной патологии в перспективе позволит совершенствовать основные методологические подходы к проведению клинко-лабораторных обследований и будет способствовать более обширному и глубокому пониманию основных механизмов развития наркологической патологии.

Цель исследования. Разработка нового диагностического теста для оценки клинического состояния и эффективности терапии пациентов с наркотической и алкогольной зависимостью.

Материалы и методы исследования

Работа проведена в период с 2009 по 2015 гг.

Объектом исследования являлась периферическая кровь наркологических пациентов в возрастном диапазоне от 18 до 47 лет. В ходе работы были подвергнуты исследованию образцы крови 285 человек, из них: 105 проб от больных с опийной наркоманией, 114 образцов от пациентов с алкогольной зависимостью и 66 проб от здоровых доноров (контрольная группа). Сбор клинического материала проводился в наркологическом учебно-научно-лечебном центре Астраханского государственного медицинского университета. Отбор образцов крови в группу контроля проводили на станции переливания крови города Астрахани от доноров в возрастном диапазоне 20–45 лет.

Следует отметить, что исследуемая группа имела значительную половую диспропорцию. Общеизвестно, что алкогольная и опийная зависимости (равно как и смертность) являются преимущественно «мужскими» феноменами. Согласно литературным данным в среде пациентов-опиоманов и страдающих хроническим алкоголизмом отмечается явная половая диспропорция: соотношение лиц мужского и женского пола в этой группе колеблется в интервале от 4/1 до 10/1 [3, 8, 9]. В силу названных причин гендерный профиль исследуемых групп в данной работе был соответственно асимметричен: большая часть пациентов (91,8%) были мужчинами. Исходя из этого в целях получения более объективных и достоверных результатов контрольная группа имела адекватный половой профиль: 91,1 % мужчин и 8,9% женщин.

Клинический статус пациентов соответствовал острому абстинентному синдрому и проявлялся симптомами соматического и неврологического характера (повышение артериального давления, тахикардия, головная боль, головокружение, тошнота, одышка различной степени выраженности, ломота в теле, кожный зуд), а также психопатологическими симптомами синдрома отмены: аффективными расстройствами (тревожность, раздражительность, депрессия, гетеро- и аутоагрессия), нарушениями сна, сновидениями на наркологическую тематику (сцены застолья, употребление ПАВ, приготовление наркотических веществ), кошмарными сновидениями. Терапия острого абстинентного синдрома как в группе опиоманов, так и в группе больных алкоголизмом по своим подходам не имело принципиальных отличий. Лечение было комплексным, включало назначение обезболивающих средств, психотропных препаратов, антиконвульсантов, ноотропов. Кроме того, всем пациентам назначались вегетотропные, гепатопротекторные средства, витамины.

Забор периферической крови у лиц исследуемых групп проводили из кубитальной вены, в условиях физиологического покоя, в пластиковые пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (5,3 мг / 4 мл).

Гемолиз крови полученных образцов осуществляли добавлением 1% сопонина с последующей очисткой от субклеточных компонентов путем центрифугирования раствора при 9000 об/мин.

Исходным материалом для выделения и очистки HbF служила пуповинная кровь новорожденных.

В работе применяли методы химического гемолиза, препаративного электрофореза в агаровом геле на 0,1 М цитратном буфере с pH 6,0 (в авторской модификации), аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, комбинированного щелочного осаждения, включающего поэтапную обработку препарата раствором сернокислого аммония 50% насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующим центрифугированием при 6000 об/мин и ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50 с 0,01 М трис-хлоридным рабочим буфером pH 8,1 в восходящем градиенте ионной силы. Специфические антисыворотки получали методом иммунизации кроликов породы «шиншилл» дробными дозами очищенного антигена с адьювантом Фрейнда по стандартной схеме [6]. 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.

Количественный иммунохимический анализ плодового гемоглобина в исследуемых образцах проводили методом ракетного иммуноэлектрофореза с додецилсульфатом натрия в запатентованной авторской модификации [7]. Стандартные калибровочные кривые строили, используя очищенные препараты HbF с концентрацией от 0,7 мг/л до 5000 мг/л по исследуемому белку.

Для математической обработки и оценки статистической значимости результатов исследования использовали лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc., США), Excel-2007 (Microsoft). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), 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 в выборках оценивали применением корреляционного, регрессионного анализа и методов многомерной статистики.

Результаты исследования и их обсуждение

Данная работа состояла в углублении и расширении полученных ранее данных [1] на основе применения нового, более точного способа количественного анализа HbF (см. ниже) и значительного расширения выборки клинического материала.

На основе полученных ранее сведений по физико-химическим свойствам плодового гемоглобина [1, 6] в ходе работы был оптимизирован оригинальный алгоритм выделения и очистки этого белка, включающий следующие последовательные этапы. Исходный материал (пуповинную кровь новорожденных) подвергали гемолизу добавлением 1%-ного раствора сопонина (с 60-минутной экспозицией). Далее гемолизат подвергали комбинированному щелочному осаждению, включающему обработку раствором сернокислого аммония 50% насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующим центрифугированием при 6000 об/мин. Белки полученного супернатанта подвергали фракционированию методом препаративного электрофореза в агаровом геле на 0,1 М цитратном буфере с рН 6,0 (в авторской модификации). Окончательную очистку проводили методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50 в 0,01 М трис-хлоридном буфере рН 8,1 в восходящем ступенчатом градиенте ионной силы (добавление 0,5 М раствора хлорида натрия).

В результате был получен очищенный препарат HbF, который использовали для иммунизации кроликов с целью получения моновалентных иммунных антисывороток.

В ходе иммунизации и последующего истощения была получена специфическая антисыворотка с высоким титром антител на HbF, на основе которой была смоделирована моновалентная иммунохимическая тест-система на этот белок, в которой тест-антигеном являлся гемолизат пуповинной крови в разведении: 1/256.

Анализ качества полученной тест-системы, верифицированной путем иммунохимического сопоставления с различными антигенными композитами, иммуноэлектрофорезом, иммунодиффузией по Оухтерлони, специфическим окрашиванием гваяколовым и бензидиновым методами, показал ее высокую чувствительность (порог чувствительности тест-системы – $2,26 \pm 0,24$ мг/л ($p < 0,005$)) и полную антигенную специфичность.

Разработанную специфическую иммунохимическую тест-систему на HbF в дальнейшем использовали для моделирования оптимального способа количественного анализа плодового гемоглобина.

Для количественной индикации HbF в исследуемых группах был оптимизирован разработанный ранее [7] способ ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия. Корреляционный анализ Пирсона показал высокую прямую

зависимость концентрации HbF от высоты электрофоретических пиков преципитации ($r=0,95$; $p<0,001$). Преимущества предлагаемого способа: высокая чувствительность (порог чувствительности – $1,74\pm 0,29$ мг/л), полная специфичность, точность (максимальная погрешность $\pm 2,1\%$), значимость регистрации, в том числе и при определении малых величин гемоглобина ($F=6,2$; $p<0,01$), экономия времени (8–10 ч).

Разработанный способ определения концентрации HbF был широко апробирован на исследуемом клиническом материале. Проведенное иммунохимическое исследование уровня плодового гемоглобина в названных выборках показало значительное превышение уровня этого белка в исследуемых группах по сравнению с его концентрацией в крови здоровых доноров контрольной группы. При этом среднее содержание HbF к крови больных с алкогольной зависимостью на 151,90% превышало полученные референтные величины по контрольной группе, а у пациентов с опийной наркоманией – на 181,82% (табл.).

Средние показатели уровня HbF в крови пациентов с алкогольной и наркотической зависимостью

Исследуемая группа	n	Средняя концентрация HbF (мг/л)	Процент HbF от общего гемоглобина
Кровь больных алкоголизмом	114	1592 ± 84	3,70
Кровь больных опийной наркоманией	105	1781 ± 97	4,14
Кровь здоровых доноров (контрольная группа)	66	632 ± 46	1,47

Стандартное отклонение (σ) по генеральной совокупности 62,78, коэффициент дисперсии (F) = 5,4. Межгрупповая степень свободы = 2.

Анализ статистической значимости полученных результатов по HbF в каждой исследуемой нозологической группе по отношению к группе контроля показал высокую степень достоверности как в группе больных опийной наркоманией ($t=6,82$; $P<0,001$), так и в группе больных алкоголизмом ($t=6,36$; $P<0,001$).

Активация γ -гена плодового гемоглобина, приводящая к увеличению продукции этого белка у пациентов с наркотической и алкогольной зависимостью, по нашему мнению, объясняется тем, что метаболические нарушения, возникающие в результате хронической интоксикации психоактивными веществами, затрагивают процессы аэробного окисления, что неизбежно приводит к развитию гипоксических состояний. А HbF, как было сказано выше, является хромопротеидом, эволюционно адаптированным к нормализации тканевого газообмена в условиях хронической гипоксии. Очевидно, что метаболические изменения, касающиеся процессов тканевого дыхания у наркологических больных, создают то

микроокружение эритроидных клеток, которое влияет на их программирование с преимущественным образованием плодового гемоглобина. Однако, возможно, в результате хронической интоксикации ПАВ в некоторых гемопоэтических стволовых клетках возникает трансформация генетических структур, ведущая к изменению интенсивности синтеза HbF.

На заключительном этапе работы была проведена оценка диагностической значимости разработанного иммунохимического теста на HbF в оценке состояний опийной и алкогольной зависимости.

Рассчитано значение точки разделения: $639,7 + 4 \times 45,3 = 820,9$ мг/л.

Статистическая оценка диагностической значимости предлагаемого теста показала высокие значения по всем характеристикам:

- специфичность – 99,3%;
- чувствительность теста – 94,7%;
- прогностичность положительного результата – 97,7%;
- прогностичность отрицательного результата – 84,1%;
- диагностическая эффективность – 96,8%.

Заключение

Разработанный тест на плодовой гемоглобин является абсолютно специфичным и высокочувствительным. Отмечено достоверное превышение концентрации плодового гемоглобина в крови больных опийной наркоманией и алкогольной зависимостью. Доказана высокая диагностическая значимость данного теста при наркологической патологии.

Список литературы

1. Бисалиева Р.А. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных / Р.А. Бисалиева, Ю.А. Кривенцев, Р.В. Бисалиев, В.С. Кальной // Наркология. – 2009. – Т. 8. № 1. – С. 95–97.
2. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 33–38.
3. Бойко В.И. Характеристика производственного шума на Астраханском газоперерабатывающем заводе / В.И. Бойко, Ю.И. Доценко, О.В. Бойко // Гигиена и санитария. – 2011. – № 4. – С. 45–47.
4. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. — СПб.: Элби-СПб. – 2000. – 324 с.
5. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства / Л. И. Иржак. – М.: Наука, 1983. – 150 с.

6. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М. Строение и биологическая роль белков гемоглобинового профиля / учебное пособие для студентов медицинских и биологических факультетов высших учебных заведений : учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям: 060101 (040100) — Лечебное дело, 060103 (040200) — Педиатрия, 060104 (040300) — Медико-профилактическое дело / Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина; Астраханская гос. мед. акад. Астрахань, 2007. – 101 с.
7. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М., Бисалиева Р.А. Способ количественного определения фетального гемоглобина человека // Патент России № 2310204. 2006. Бюл. № 31.
8. Сирота Н.А. Наркотики. Проблемы и их решение: пособие для студентов (изд. дополненное и переработанное). / Н.А. Сирота, В.М. Ялтонский. – М.: Москва, 2003. – 33 с.
9. Соломзес Дж.А. Наркотики и общество / Дж.А. Соломзес, В. Чебурсон, Г. Соколовский. – М.: OCR Палек, 1998. – 72 с.
10. Стародуб Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль / Н.Ф. Стародуб, В.И. Назаренко. – АН УССР, Институт молекулярной биологии и генетики. Киев: Наукова думка, 1987. – 198 с.