УДК 616.24-002.5:616.155.16

НОВЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ ТЕСТ НА ФЕТАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИН В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Кривенцев Ю.А.[1], Гудинская Н.И.[1], Кривенцева М.Ю.[2], Носков А.И.[1]

[1]ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru;
[2] ГБУЗ АО «Патологоанатомическое бюро», Астрахань, e-mail: cpab@mail.ru

На основе оптимизации алгоритма количественного анализа фетального гемоглобина методом ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия, разработан иммунохимический тест на этот белок, отличающийся абсолютной специфичностью, высокой чувствительностью (порог чувствительности – 1,71±0,26 мг/л) и точностью (максимальная погрешность ±2,1%). С помощью нового теста проведена клиническая апробация теста на фетальный гемоглобин в 471 образце крови от 287 пациентов, больных туберкулезом легких разных форм. Анализ результатов исследования показал статистически значимое повышение относительной концентрации фетального гемоглобина (в процентах от уровня общего гемоглобина) по отношению к показателям в группе контроля (здоровые доноры). Проведенный количественный иммунохимический анализ фетального гемоглобина крови в исследуемых клинических выборках в динамике показал высокую обратную корреляцию между уровнем исследуемого белка и сроками терапии патологического процесса только в группе пациентов, перенесших оперативное вмешательство. Оценка диагностической значимости разработанного иммунохимического теста на фетальный гемоглобин показала высокие значения диагностической эффективности и абсолютные показатели специфичности, что является несомненным преимуществом теста и объясняется полным отсутствием ложноположительных результатов при его применении.

Ключевые слова: туберкулез, фетальный гемоглобин, иммунохимия, тест-система, диагностика.

NEW IMMUNOCHEMICAL TEST FOR FETAL HEMOGLOBIN IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS OF LUNGS

Kriventsev Y.A.[1], Gudinskaja N.I., Kriventseva M.Y.[2], Noskov A.I.[1]

[1]Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: agma@astranet.ru;
[2] Mortem Bureau Astrachan, e-mail: cpab@mail.ru

Based on the optimization of the quantitative analysis algorithm for fetal hemoglobin by rocket electrophoresis in an agar gel with sodium dodecyl sulfate, an immunochemical test for this protein was developed. With the help of the new test, a clinical approbation of a test for fetal hemoglobin in 471 blood samples from 287 patients with pulmonary tuberculosis of various forms was carried out. Analysis of the results of the study showed a statistically significant increase in the relative concentration of fetal hemoglobin (as a percentage of total hemoglobin level) above concentration in the control group (healthy donors). The immunochemical analysis of fetal hemoglobin in the clinical samples studied in the dynamics showed a high inverse correlation between the level of the studied protein and the terms of therapy of the pathological process only in the group of patients who underwent surgery. This shows the diagnostic efficiency, highly sensitive (sensitivity threshold of 1.71 ± 0.26 mg/l), accuracy (maximum error ± 2.1%) and absolute specificity of the immunochemical test for fetal hemoglobin.

Keywords: tuberculosis, fetal hemoglobin, immunochemistry, test system, diagnostics.

Согласно данным медицинской статистики, с начала столетия и по настоящее время заболеваемость туберкулезом в России очень медленно, но неуклонно снижается. Тем не менее, несмотря на успехи последних десятилетий в области фтизиатрии и государственных программ по предупреждению данной патологии, туберкулез остается одной из актуальнейших проблем социального характера, ежегодно приводящей к длительной нетрудоспособности и инвалидизации десятки тысяч граждан нашей страны. Следует отметить, что самая распространенная форма этого заболевания – туберкулез легких,

традиционно поражает преимущественно самые трудоспособные слои населения - лиц молодого и зрелого возраста, демографическую основу российских народов, приводя, в масштабах страны, как к ухудшению здоровья популяции, так и к существенным экономическим потерям. В этом свете острая проблема борьбы с туберкулезом является не только медицинской, но и общегосударственной задачей [1-3].

В решении проблемы туберкулеза в нашей стране значительную роль играют федеральные программы, направленные на медленный, но неуклонный рост благосостояния среднего россиянина, улучшение общей ситуации в сфере здравоохранения, профилактические меры, регулярное медицинское обследование населения, пропаганду здорового образа жизни и др. Однако, несмотря на это, даже в XXI веке заболеваемость туберкулезом остается пугающе высокой. Объясняется это тем, что, во-первых, даже ежегодная плановая диспансеризация не в силах охватить все слои населения, во-вторых, методы современного скрининг-обследования (флюорография и др.) не способны выявить данную патологию на стадии активации процесса, когда поражения в легочной ткани еще не носят манифестного характера. Именно недостатки на этапе ранней диагностики туберкулеза являются одной из основных причин, препятствующих эффективному решению описываемой проблемы [1; 2; 4].

В свете вышесказанного поиск нового неспецифического маркера туберкулезного процесса и создание соответственного лабораторного теста, способного дополнить общепринятую диагностическую панель по данной нозологии и тем самым улучшить своевременное выявление туберкулеза на самых ранних стадиях заболевания, является актуальной задачей современной медицины.

Высокий интерес в этом смысле представляет фетальный (плодовый) гемоглобин человека (HbF). Этот гемсодержащий мультимер построен из двух α- и двух γ-цепей. pI - 6,9-7,15. Его продукция активируется с 12-13-й недели гестации, и к моменту рождения его концентрация в крови составляет 55-85% от общего гемоглобина. У взрослого на долю HbF приходится около 1,5% от общего гемоглобина [5-7].

Исходя из литературных данных последних лет, доказывающих диагностическую значимость иммунохимического теста на фетальный гемоглобин, как надежный маркер хронической гипоксии различного генеза [8-10], авторами было сделано предположение, что изменение продукции этого протеина вполне вероятно при туберкулезном процессе легких, зачастую сопровождающемся хроническими гипоксемическими явлениями.

Цель исследования: разработка нового иммунохимического теста на фетальный гемоглобин для оценки тяжести поражения легких, определения прогноза, мониторинга лечения туберкулеза легких и анализ его диагностической значимости.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование проведено в период с 2015 по 2017 г. В качестве клинического материала использовалась гемолизированная кровь больных туберкулезом легких и здоровых доноров (контрольная группа) общей численностью 471 образец, взятый от 287 человек (табл. 1). Материал получали в ГБУЗ АО «Областной клинический противотуберкулезный стационар» и на Астраханской областной станции переливания крови.

Таблица 1

Перечень использованного в работе материала

Материал	**Число образцов**	**Число человек**
Кровь больных туберкулезом легких	410	226
очаговая форма	92	58
инфильтративная форма	86	49
диссеминированная форма	54	30
фиброзно-кавернозная форма	88	42
послеоперационные реконвалесценты	90	47
Кровь здоровых доноров (группы контроля)	61	61
Всего	**471**	**287**

Клинический анализ форм данной нозологии проводился при участии квалифицированных фтизиатров.

Для оценки сатурации крови использовали пульсоксиметр.

Для очистки препарата HbF использовали методы термически-механического гемолиза, щелочного осаждения (поэтапная обработка биоматериала раствором сульфата аммония 50% насыщенности и 1,25 М раствором NaOH с дальнейшей седиментацией при 6000 g), электрофоретического фракционирования в агаровом геле на 0,15 М цитратном буфере с pH 6,2 (в авторской модификации), электрофореза в полиакриламидном геле, ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50 и гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-200. Антисыворотки получали путем иммунизации кроликов малыми дозами очищенного препарата HbF с полным адъювантом Фрейнда по общепринятой схеме. Для количественного анализа общего гемоглобина в исследуемых пробах применяли унифицированный гемоглобинцианидный метод.

Для селективной количественной регистрации фетального гемоглобина в исследуемых образцах использовали разработанный и запатентованный ранее метод

ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) [11; 12].

При анализе диагностической значимости предлагаемого теста на HbF референтная оценка носила альтернативный характер, а изучаемый тест давал количественный результат. В этом случае использовали точку разделения (дискриминантную концентрацию), превышение которой считается достаточным основанием для качественной оценки. Числовое значение точки разделения по каждому показателю выбирали как сумму (или разницу, в зависимости от вектора отклонения исследуемого признака при данной патологии) среднего значения изучаемого белка в группе контроля и четырехкратного среднеквадратического отклонения (M±4σ). Нормальным считалась концентрация, не превышающая дискриминантный уровень. Повышенным считали показатель, который более чем на 10% превышал точку разделения. При таком подходе количественный результат оценивался так же, как альтернативный.

Для математического анализа и оценки статистической значимости полученных результатов использовали лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2016 (Microsoft) и Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc., США). Вычисляли средние величины (M) в каждой выборке, средние ошибки средней арифметической (m). С целью определения значимости p различий сопоставляемых средних величин применяли критерий t Стьюдента с поправкой Бонферрони и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для анализа зависимости между сравниваемыми группами 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.

Результаты исследования и их обсуждение

Данное исследование являлось закономерным продолжением проведенной ранее работы, в ходе которой был оптимизирован способ выделения HbF, получены моновалентные антисыворотки на этот белок, смоделирована соответствующая иммунохимическая тест-система (в которой тест-антигеном являлся гемолизат пуповинной крови новорожденных в разведении: 1/128, порог чувствительности тест-системы – 2,23±0,25 мг/л ($p<0,005$)). Для количественного анализа HbF разработан способ ракетного электрофореза в агаровом геле с ДСН, отличающийся абсолютной специфичностью определения HbF, точностью (максимальная погрешность ±2,1%), высокой чувствительностью (порог чувствительности – 1,71±0,26 мг/л), значимостью регистрации, в том числе и при определении малых величин гемоглобина ($F=8,2$; $p<0,01$). Корреляционный

анализ показал высокую прямую зависимость концентрации исследуемого белка от квадрата диаметра кольца преципитации (r=0,94; p<0,001). Широкая клиническая апробация теста показала высокую значимость фетального гемоглобина как неспецифического маркера хронической гипоксии [7; 11].

При трактовке полученных данных в настоящей работе возникала проблема выбора подходов к оценке концентрации HbF. Дело в том, что у значительной доли пациентов (23%) исследуемой выборки отмечалась анемия различной степени выраженности. Следовательно, анализ уровня фетального гемоглобина по абсолютным величинам (г/л) был невозможен, т.к. уровни общего гемоглобина у разных пациентов (с анемией и без) значительно различались, то не исключались варианты, при которых видимое изменение концентрации HbF фактически могло оказаться недостоверным в силу пропорционального изменения уровня общего гемоглобина.

Поэтому, для максимальной верификации полученных результатов по фетальному гемоглобину, в тех же выборках нами было проведено конвертирование абсолютных величин концентрации (г/л), полученных в ходе иммунохимического исследования, в относительные величины - процент HbF от общего гемоглобина в каждой нозологической группе. Полученные данные (в %) в целом адекватно соотносились с результатами определения изучаемого белка.

Проведен количественный иммунохимический анализ HbF методом ракетного электрофореза с ДСН в представленных клинических группах (табл. 2).

Таблица 2

Результаты иммунохимического определения HbF в исследуемых группах

Исследуемые формы туберкулеза легких	**n**	**Средний процент HbF от общего Hb**	**Корреляция уровня HbF с сатурацией крови (r)**
Очаговая форма	92	2,24±0,09	-0,76
Инфильтративная форма	86	3,46±0,12	-0,80
Диссеминированная форма	54	5,31±0,21	-0,84
Фиброзно-кавернозная форма	88	3,88±0,19	-0,92
Послеоперационные реконвалесценты	90	2,81±0,13	-0,79
Здоровые доноры (контрольная группа)	61	1,52±0,07	
Всего	**471**		

Как видно из таблицы 2, показаны высокие уровни обратной корреляции между средними концентрациями HbF и средними показателями сатурации крови во всех клинических выборках, что доказывает значимость HbF как маркера гипоксии.

Анализ дисперсии по клиническим формам и различия между парными выборками (контрольная группа и пациенты с соответствующей патологией) оказались статистически значимыми во всех группах:

- очаговая форма туберкулеза легких: коэффициент Стьюдента $t=3,97$; доверительная вероятность ошибки (p) $< 0,05$; коэффициент дисперсии $F=4,9$;
- инфильтративная форма: $t=4,22$; $p<0,05$; $F=5,3$;
- диссеминированная форма: $t=5,34$; $p<0,01$; $F=5,7$;
- фиброзно-кавернозная форма: $t=4,42$; $p<0,05$; $F=5,4$;
- послеоперационные реконвалесценты: $t=4,42$; $p<0,05$; $F=5,4$.

Различия уровней HbF у больных и здоровых в целом оказались достоверными ($p<0,01$), так же как и между пациентами с различными формами туберкулеза ($p<0,05$).

На наш взгляд, активация продукции HbF у больных с туберкулезом легких является компенсаторной реакцией на гипоксемические изменения и объясняется пролиферацией клона эритробластов, способных к синтезу HbF. Можно предположить, что главным фактором, регулирующим эритропоэз, должно быть отношение между снабжением тканей кислородом и их потребностью в этом газе. Вероятно, что метаболические изменения, касающиеся латентной или явной декомпенсации процессов газоснабжения тканей у туберкулезных больных, создают то микроокружение эритроидных клеток, которое влияет на их программирование с преимущественным образованием фетального гемоглобина.

Был также проведен количественный иммунохимический анализ фетального гемоглобина крови в клинических выборках в динамике (во временном диапазоне с момента поступления пациента в стационар по 12-й месяц терапии включительно). Данное исследование показало довольно низкие (на грани достоверности) корреляционные связи между уровнем HbF и сроками терапии патологического процесса:

- очаговая форма: коэффициент Пирсона (r) = -0,43 ($p<0,05$);
- инфильтративная форма: $r = -0,51$ ($p<0,05$);
- диссеминированная форма: $r = -0,63$ ($p<0,05$);
- фиброзно-кавернозная форма: $r = -0,34$ ($p<0,05$).

Очевидно, слабые, невыраженные тенденции к нормализации уровня HbF в процессе лечения исследуемых групп патологии объясняются тем, что, в соответствии со спецификой нозологии, противотуберкулезная терапия отличается длительностью и далеко не всегда дает быстрый позитивный результат.

Исключение составила группа пациентов, перенесших оперативное вмешательство по удалению очага поражения (туберкулема, инфильтрат и др.). В этой выборке была показана высокая обратная корреляция между средними показателями HbF и сроком послеоперационной реабилитации (r = -0,85). Данный факт можно объяснить нормализацией процессов тканевого дыхания в результате успешного хирургического лечения.

На последнем этапе работы была проведена оценка диагностической значимости (ДЗ) разработанного иммунохимического теста на фетальный гемоглобин по всем критериям этого показателя: диагностической чувствительности, диагностической специфичности, прогностичности положительного и отрицательного результатов, диагностической эффективности.

Поскольку иммунохимический тест на фетальный гемоглобин давал количественные результаты, а его оценка носила альтернативный характер (см. выше), вычисленная точка разделения по относительной концентрации HbF была равна 1,77% от общего гемоглобина.

Анализ показателей качества предлагаемого теста на HbF, как диагностического инструмента при туберкулезе легких, дал высокие результаты:

- чувствительность теста – 93,3%;
- специфичность – 100%;
- прогностичность положительного результата – 100%;
- прогностичность отрицательного результата – 86,2%;
- диагностическая эффективность – 96,7%.

Как показал анализ ДЗ, иммунохимический тест на HbF имеет абсолютные показатели специфичности, высокие значения диагностической эффективности и прогностичности положительного результата, что является несомненным преимуществом теста и объясняется полным отсутствием ложноположительных результатов при его применении.

Заключение

Клиническая апробация разработанного иммунохимического теста на фетальный гемоглобин показала его состоятельность. Учитывая полную специфичность и высокую диагностическую эффективность предлагаемого теста, можно заключить, что его широкое внедрение в клиническую практику, безусловно, эффективно дополнит общепринятую диагностическую панель туберкулеза легких.

Список литературы

1. Чабанова О.Н. Эпидемиологические и медико-социальные проблемы туберкулёза / О.Н. Чабанова, Е.Н. Стрельцова, А.Г. Сердюков. – Астрахань, 2010. – С. 9-16.

2. Бойко О.В. Молекулярные механизмы бактерионосительства (характеристика и подробный анализ) / О.В. Бойко, А.А. Терентьев, В.И. Бойко. – Palmarium academic publishing, Saarbrücken, Germany, 2012. – С. 67-72.

3. Тюлькина Е.А. Фактическая функция врачебной должности врача-фтизиатра в Удмуртской Республике // Современные проблемы науки и образования. - 2017. - № 6. - URL: https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27156 (дата обращения: 25.05.2018).

4. Рыжкова О.А. Структурный анализ сыворотки крови при туберкулёзе / О.А. Рыжкова, Е.Н. Стрельцова. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2010. – С. 65-69.

5. Топунов А.Ф. Гемоглобины и системы их восстановления / А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции / под ред. Е.Л. Глориозова. - 2017. - С. 32-38.

6. Бриллиант С.А. Гетерогенность белковых фракций гемоглобина костного мозга и системы крови при экстремальных воздействиях на организм / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. - № 5. - С. 17-18.

7. 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. 272-274.

8. Hoogewijs D. Androglobin, a new metazoan family of chimeric globins with a N-terminal calpain-like protease domain, preferentially expressed in vertebrate testes / D. Hoogewijs [et al.] // Mol. Biol. Evol. - 2012. - V. 29. - P. 1105-1114.

9. Шамратова В.Г. Фетальный гемоглобин - маркер кислородного дефицита клеток при гиподинамии / В.Г. Шамратова, Е.Е. Исаева, С.Р. Усманова // Вестник Башкирского университета. - 2015. - Т. 20. - № 1. - С. 101-105.

10. Бойко О.В. Влияние Астраханского газоперерабатывающего завода на загрязнение воздуха производственных помещений и территории / О.В. Бойко, В.И. Бойко, Н.И. Гудинская // Гигиена и санитария. - 2016. - Т. 95. - № 2. - С. 167-171.

11. Кривенцев Ю.А. Гемоглобины человека: иммунобиохимическая характеристика и медико-биологическое значение: автореф. дис. … докт. мед. наук. – М., 2009. - 42 с.

12. 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.