

**Погорелова** Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела медико-биологических проблем ФГУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» Минздравсоцразвития России, Россия, 344012, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43, тел. (8632) 27-50-77.

**Линде** Виктор Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии» Минздравсоцразвития России, Россия, 344012, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43, тел. (8632) 32-18-40.

УДК 577.152.313: 57.083.3

© А.В. Коханов, О.В. Мусатов, А.А. Мяснянкин, Р.И. Асфандияров, И.С. Ямпольская, 2011

**А.В. Коханов<sup>1</sup>, О.В. Мусатов<sup>1</sup>, А.А. Мяснянкин<sup>2</sup>, Р.И. Асфандияров<sup>1</sup>, И.С. Ямпольская<sup>1</sup>**

## **РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАЦЕНТАРНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ**

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

<sup>2</sup>ГБУЗ АО «Александр-Мариинская областная клиническая больница», г. Астрахань

В сыворотках крови доноров, беременных различного срока гестации и больных с предполагаемым подъемом уровня плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ) проведено сравнительное биохимическое исследование 4-х методов определения этого фермента. Даны характеристики для каждого из тестов индикации ПЩФ: специфичность, чувствительность, воспроизводимость. Наиболее эффективным признан иммуноферментный анализ ПЩФ.

**Ключевые слова:** плацентарная щелочная фосфатаза, иммуноферментный анализ.

A.V. Kokhanov, O.V. Musatov, A.A. Myasnyankin, R.I. Asfandiyarov, I.S. Yampolskaya

## **DEVELOPMENT OF TEST SYSTEM FOR QUANTITATIVE ESTIMATION OF ALKALINE PHOSPHATASE PLACENTAL**

In the blood sera of donors, pregnant women of different gestational ages and patients with an estimated rise of the level of placental alkaline phosphatase (PLAP), a comparative biochemical study of 4 methods of determination of this enzyme is conducted. The characteristics from each of the tests of indication of PLAP (specificity, sensitivity and reproducibility) is given. Enzyme-linked immunoassay of PLAP is recognized as the most effective.

**Key words:** placental alkaline phosphatase, enzyme immunoassay

Щелочные фосфатазы (ЩФ) являются Zn-содержащими гликопротеинами с серином в активном центре, гидролизующими различные фосфатные эфиры при щелочных значениях pH. Оптимум pH лежит в диапазоне pH 8,6—10,1, отсюда ЩФ получила название [1, 2]. Молекулярные массы ЩФ колеблются от 100 до 200 кД, как правило [3]. Повышенный интерес к ПЩФ возник после того, как Fishman W. в 1968 году [6] обнаружил в ткани аденокарциномы легкого, плевральном экссудате и сыворотке больного раком легкого термостабильную щелочную фосфатазу, иммунохимически идентичную плацентарной, которую он назвал по имени больного «изоэнзим Регана». Таким образом, обнаружение в кровотоке фермента плацентарной щелочной фосфатазы (ПЩФ) имеет важное диагностическое значение при различных физиологических и патологических состояниях организма [1, 3]. Однако, несмотря на установленную ценность данного маркера для диагностики [1, 3], до настоящего времени не налажено коммерческое производство теста на этот белок для нужд практического здравоохранения. Вместе с тем в клинической лабораторной практике давно и широко применяется определение общей ЩФ сыворотки, основанное на оценке его ферментативной активности. Так как нет взаимосвязи между активностью ЩФ и содержанием ПЩФ, неправильно ставить знак равенства между этими двумя анализами. В этой связи существует необходимость разработки тест-системы для индикации сывороточных уровней ПЩФ.

**Цель исследования:** сравнить эффективность и диагностическую ценность различных методов определения сывороточных уровней плацентарной изоформы щелочной фосфатазы.

**Материалы и методы.** Для количественного определения ПЩФ в 36 экстрактах тканей применяли методы: двойной радиальной иммунодиффузии (РИД) в агаре по О. Оухтерлони в модификации Н.И. Храмовой и Г.И. Абелева [5] (чувствительность этого классического метода 3-5 мкг/мл), встречного иммуноэлектрофореза по Кону (1970) (чувствительность метода 100-300 нг/мл), метод «ракетного» иммуноэлектрофореза [5] (чувствительность метода 1-3 мкг/мл). Активность ЩФ оценивали фотометрически с применением соответствующих субстратов и красителей после предварительного разделения изоформ различными методами электрофореза в агарозе или в полиакриламидном геле [2, 3].

ПЩФ определяли количественными методами иммуноэлектрофореза или иммунодиффузии после окрашивания преципитатов на щелочную фосфатазу, остальные фосфатазы в единицах Боданского методом электрофореза на агарозе и в ПААГ с применением соответствующих ингибиторов и денситометрии [2].

Для проведения иммуноферментного анализа ИФА [4] на ПЩФ, из полученной на первом этапе моноспецифической антисыворотки выделяли антитела класса IgG сочетанием методов негативной ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и осаждения сульфатом аммония 40% насыщения. Антитела к ПЩФ в концентрации 1 мкг/мл адсорбировались на стрипах или планшетах для иммуноферментного анализа. После инкубации стрипов с исследуемыми образцами сывороток и промывки планшетов, регистрацию результатов ИФА в стрипах или 96-луночных планшетах «Nunc» (Дания) проводили на фотометре с вертикальным ходом луча «Titertech Multiscan» фирмы «Flow Laboratories» (Англия) при длине волны 492 нм в случае использования субстрата (паранитрофенилфосфата или БАПНА) и красителя из метода Боданского.

**Результаты.** Активность ЩФ выявлена в 100% во всех сыворотках беременных и доноров. После прогревания в сыворотках сохранялась только активность ПЩФ, ингибируемая фенилаланином. ПЩФ таким методом выявлялась в 68% сывороток беременных и в 3% сывороток доноров. В остальных методах определения щелочной фосфатазы использовался иммунохимический принцип, основанный на реакции антиген (ПЩФ) – антитело. Моноспецифические антисыворотки к ПЩФ получены нами самостоятельно путем гипериммунизации кроликов породы «шиншилла серая» очищенными и полуочищенными препаратами этого фермента. Моноспецифические антисыворотки на ПЩФ использованы для получения иммунодиффузионных и иммуноферментных наборов на ПЩФ.

Чувствительность иммунодиффузионного анализа (ИДА) ПЩФ не отличалась от первого метода, однако за счет иммунохимического принципа специфичность определения ПЩФ составила 100%. Следует обратить внимание, что по сравнению с классическим ИДА чувствительность метода для ТЩФ составила 0,1-0,5 мкг/мл. По сравнению с ИДА чувствительность ракетного иммуноэлектрофореза была в 2 раза, а встречного – в 5 раз выше ( $p < 0,01$ ). Оба метода выявляли ПЩФ во всех сыворотках беременных и у четверти доноров.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) на ПЩФ достигнуты наилучшие результаты: используя различные разведения чистого препарата ПЩФ, определена чувствительность метода ИФА, которая составила 50 нг/мл. Этот уровень чувствительности теста позволяет выявлять существенные различия в концентрациях ПЩФ в сыворотках беременных различного срока гестации и некоторых групп больных. В отличие от стандартного ИФА наша модификация проще, так как не требует этапа нанесения конъюгата белок-пероксидаза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асфандияров Р.И., Лазько А.Е., Коханов А.В. Изомеры щелочной фосфатазы и остеогенез // Морфология. – 2002. – Т. 121 – № 2-3. – С. 13.
2. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. – М.: Медицина, 1981. – 624 с.
3. Голубев А.М. Изоферменты новообразований. – М.: Медицина, 1981. – 144 с.
4. Иммуноферментный анализ / под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа – М.: Мир, 1988. – 446 с.
5. Иммунохимический анализ / под ред. Л.А. Зильбера – М.: Медицина, 1968. – 238 с.
6. Fishman W.H. Immunologic and biochemical approaches alkaline phosphatase isoenzyme analysis: the Regan isoenzyme. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1969. – Vol. 166. – P. 745-749.

**Коханов** Александр Владимирович, доктор медицинских наук, доцент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121, тел. (8512) 52-51-64.

**Мусатов** Олег Валентинович, кандидат медицинских наук, докторант кафедры оперативной хирургии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская 121, тел. (8512) 52-51-64

**Мяснянкин** Александр Алексеевич, врач-нейрохирург, нейрохирургическое отделение ГБУЗ АО «Александро-Мариинская областная клиническая больница», Россия, 414056, г. Астрахань, ул. Татищева 2, тел. (8512) 25-32-61, e-mail: lazer@astranet.ru

**Асфандияров** Растям Измайлович, доктор медицинских наук, проф. кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121., тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru

**Ямпольская** Ирина Сергеевна, заочный аспирант кафедры биохимии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121., тел. (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru