

клинических признаков туберкулеза. Реакция на туберкулин (Манту) уменьшилась с $12,0 \pm 0,2$ мм до $8,0 \pm 0,1$ мм ($p = 0,03$). Из 20 детей с сомнительной реакцией на препарат Диаскинтест после химио-профилактики, Диаскинтест-отрицательными стали 9 (45 %) детей, 11 (55 %) проб остались сомнительными.

Таким образом, проведенное исследование подтверждает, что включение в комплексное обследование детей нового препарата Диаскинтест позволяет уточнить характер чувствительности к туберкулину. В то же время мы не исключаем влияния сопутствующей патологии на результат реакции по пробе с Диаскинтестом. Дальнейшие исследования будут продолжены в этом направлении. В настоящее время, на наш взгляд, наиболее целесообразно применение данного теста при дифференциальной диагностике выража туберкулиновой чувствительности и поствакцинальной аллергии.

Список литературы

1. Аксенова, В. А. Выявление туберкулеза и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска по заболеванию туберкулезом с использованием препарата Диаскинтест (аллерген туберкулезный рекомбинантный) / В. А. Аксенова, Д. Т. Леви, Н. И. Клевно и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 2. – С. 13–19.
2. Киселев, В. И. Клинические исследования нового кожного теста Диаскинтест для диагностики туберкулеза / В. И. Киселев, П. М. Барановский, И. В. Рудых и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 2. – С. 1–8.
3. Лебедева, Л. В. Чувствительность к туберкулину и инфицированность микобактериями туберкулеза у детей / Л. В. Лебедева, С. Г. Грачева // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 1. – С. 5–9.
4. Овсянкина, Е. С. Факторы, определяющие развитие туберкулеза у детей / Е. С. Овсянкина, М. Г. Кобулашвили, М. Ф. Губкина и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 19–22.
5. Приказ Минздравсоцразвития России от 29.10.2009 № 855 «О внесении изменения в приложение № 4 к приказу Минздрава России от 21.03.2003 № 109». – Режим доступа : <http://www.minzdravsoc.ru/docs/mzsr/orders>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. рус. – Дата обращения: 10.11.2010.

Стрельцова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой туберкулеза ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru.

Степанова Наталья Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры туберкулеза ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 49-71-28, e-mail: stepaniida@ya.ru.

Кобзева Нина Тимофеевна, заместитель главного врача по детству ГБУЗ АО «Городская поликлиника № 10», Россия, 414006, г. Астрахань, ул. Дзержинского, д. 56, тел.: (8512) 56-15-34, e-mail: muzgp10@rambler.ru.

УДК 577.152.313: 57.083.3

© М.А. Чишиева, А.А. Мяснянкин, А.В. Коханов, 2012

М.А. Чишиева, А.А. Мяснянкин, А.В. Коханов

БЕЛКИ МОЗГА С ЭКСТРЕМАЛЬНЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ: ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

Получены антисыворотки к экстрактам дефинитивного мозга и продуктам их фракционирования осаждающими агентами. Идентифицировано два новых белка мозга с подвижностью альфа1- и альфа2-глобулинов. Дана сравнительная характеристика двух органоспецифических и трех межорганных антигенов мозга. На оба органоспецифических белка мозга сконструированы иммунохимические тест-системы для иммунодиффузионного и иммуноферментного анализа.

Ключевые слова: органоспецифические белки мозга, межорганные белки мозга, физико-химическая характеристика, иммунодиффузионный анализ, иммуноферментный анализ.

**THE BRAIN PROTEINS WITH PHYSICO-CHEMICAL PARAMETRES:
IMMUNOCHEMICAL IDENTIFICATION AND MODELING TEST SYSTEM**

Antisera to extracts of the definitive brain and products of their fractionation by saturated agents and the processing of their boiling were obtained. Two new proteins of the brain with the mobility of alpha 1 and alpha 2-globulins were identified. Comparative characteristics of the two organ-specific antigens and three interorganic brain antigens was given. The immunochemical test system for immunodiffusion and ELISA to both organ-specific proteins of the brain was made.

Key words: *organ-specific proteins of the brain, interorganic brain proteins, physico-chemical characteristics, immunodiffusion analysis, immunoassay.*

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) остается одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения [4]. Несмотря на постоянное совершенствование современной нейрохирургической техники и методов интенсивной терапии травматической болезни головного мозга, растет число больных с последствиями и осложнениями ЧМТ. Для динамического мониторинга и своевременного прогнозирования ранних внутричерепных и внечерепных осложнений травматической болезни мозга наиболее перспективно применение иммунохимических методов анализа специфических антигенов мозга [1, 3].

Развитие методов иммунохимического анализа привело к открытию целого спектра нейроспецифических белков и разработке иммунохимических технологий их регистрации при различных патологических процессах в центральной и периферической нервной системе [8].

Однако на некоторые органоспецифические антигены мозга, в том числе впервые выявленные в Астраханской медакадемии, не существует доступных коммерческих тест-систем. К таким белкам относятся термостабильные и кислотостабильные белки мозга, обнаруженные М.А. Чишиевой [9]. Разработка методов их выделения, очистки и конструирования тест-систем на эти белки представляет собой самостоятельную важную биохимическую проблему. Основная масса водорастворимых тканевых белков денатурирует в экстремальных физико-химических условиях, для их выделения и очистки требуются достаточно мягкие физиологические условия фракционирования [6]. Существует небольшая группа водорастворимых белков, способных сохранять свои нативные свойства при жестких методах фракционирования – кипячении (ферритин), обработке сильными органическими кислотами (эмбриональный преальбумин), растворами щелочей (фетальный гемоглобин), насыщенными растворами сульфата аммония (белок S-100), спиртовым раствором трихлоруксусной кислоты (альфа-фетопроtein) и т.д. Такие белки-«экстремалы» привлекают внимание биохимиков легкостью своего получения и особенностью своего строения, обеспечивающего уникальную стабильность макромолекулы и биологической функции.

Цель: разработать и внедрить в нейрохирургическую практику иммунохимических тестов на новые органоспецифические белки мозга с экстремальными физико-химическими параметрами.

Задачи исследования:

1. Выделить органоспецифические антигены мозга человека, устойчивые к температуре и воздействию сильными органическими кислотами, изучить их физико-химические свойства и получить на них антисыворотки для конструирования моноспецифических тест-систем.
2. Разработать методы количественного определения вновь выявленных органоспецифических белков мозга и изучить динамику их уровней в крови пострадавших в различные периоды травматической болезни головного мозга.

Материалы и методы. Для количественного определения органоспецифических антигенов мозга (ОСАМ) в 16 экстрактах тканей мозга применяли методы: двойной радиальной иммунодиффузии (РИД) в агаре по О. Оухтерлони в модификации Н.И. Храмовой и Г.И. Абелева [7] (чувствительность этого классического метода 3–5 мкг/мл), встречного иммуноэлектрофореза по J. Кону [10] (чувствительность метода 100–300 нг/мл), метод «ракетного» иммуноэлектрофореза по С.В. Laurell [12] (чувствительность метода 1–3 мкг/мл).

Для проведения иммуноферментного анализа ИФА [2] на ОСАМ 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 ОСАМ 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 «Titertech Multiscan» (Финляндия). Для характеристики белков на этапах очистки использовали диск- и SDS-электрофорез [11] в ПААГ, электрофорез в градиенте концентраций (5–40 %) ПААГ и градиенте мочевины (0–8 М), двухмерные системы (фингерпринты); препаративный электрофорез [5]. Содержание общего белка в экстрактах мозга и белковых растворах определяли спектрофотометрически при 280 и 260 нм по О.Г. Варбургу (исследование 1911 г.) [6]. Полученные результаты исследований обработаны с помощью пакета статистического анализа Statistica 6.

Результаты. Были получены антисыворотки к экстрактам дефинитивного мозга и продуктам их фракционирования различными осаждающими агентами. После абсорбции антисывороток сывороткой крови доноров и сухой плазмой, а также смесью экстрактов различных органов удалось получить тест-системы к 3 органоспецифическим антигенам, аналогичным, описанным в литературе трем белкам мозга и 2 межорганным антигенам: 1) термостабильному антигену Каспари-Филда или к альфа1-ВЕ-глобулин мозга, 2) кислотостабильному антигену мозга, идентичному альфа-2-СС-глобулину мозга, 3) кислотостабильному антигену мозга, иммунохимически идентичного коммерческому раковоэмбриональному антигену (РЭА), 4) растворимому в насыщенном сульфате аммония белку мозга, иммунохимически идентичного коммерческому антигену S-100 и 5) термостабильному железосодержащему белку, идентичному коммерческому ферритину.

В первой серии экспериментов нами были исследованы физико-химические параметры этих органоспецифических и межорганных антигенов мозга (табл.).

Таблица

**Физико-химические характеристики антигенов,
идентифицированных в дефинитивной ткани мозга человека**

Параметры	α 2-СС	α 1-ВЕ	Фр	РЭА	S-100
Субъединичное строение	мономер	мономер	24 субъед	мономер	димер
Э/ф подвижность	α 2	α 1	α 2	α 1	α 2
Молекулярная масса (КДа)	145	139	450	180	21
Мозг человека:					
нативный экстракт	+	++	++	+	++
кипяченный экстракт	–	+	+	–	–
риваноловый осадок	+	–	+	–	+
риваноловый фильтрат	–	+	–	+	–
сульфосалициловый фильтрат	+	–	–	+	–
50 % насыщения сернокислым аммонием осадок	+	–	+	–	–
50 % насыщения сернокислым аммонием фильтрат	–	+	–	+	+
100 % насыщения сернокислым аммонием фильтрат	–	–	–	–	+

Примечание: (–) – реакция отрицательная, (±) – «подгиб» линии преципитации тест-антигена, (+) – антиген определяется в титре до 1/4, (++) – антиген определяется в титре 1/8 и выше

В результате решения поставленных задач нами идентифицированы два органоспецифических антигена мозга. Один из органоспецифических антигенов мозга (термостабильный спиртонерастворимый антиген) имеет подвижность альфа1-глобулина. Сведения о нем представлены в таблице, из которой следует, что он обратимо осаждается риванолом и сернокислым аммонием, а необратимо – трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами.

Сказанное позволило нам разработать схему его очистки, которая складывается из следующих этапов: 1) экстракция ткани головного мозга и термическая обработка в течение 60 мин в водяной бане при 100 °С; 2) осаждение антигена 0,5 % раствором риванола и перевод его в раствор хлористым натрием; 3) доочистка органоспецифического белка мозга комбинацией хроматографических методов.

Следует отметить, что альфа1-термостабильный нейроспецифический белок обладает высокой аутоантигенной потенцией. Это выражается в том, что антисыворотки к термически обработанным экстрактам мозга человека преципитируют иммунохимически идентичный антиген из состава ауто- и гомологичных экстрактов мозга кролика – продуцента антител.

Закключение. В наших опытах наиболее оптимальным источником органоспецифических антигенов мозга оказались белки зоны альфа-глобулинов. Сравнение молекулярных параметров и физико-

химических свойств описанных нами альфа1- и альфа2-глобулинов мозга с параметрами наиболее известных нейроспецифических белков позволяет нам заключить, что они не являются ими, так как молекулярные массы описанных нейроспецифических белков не превышают 40–50 КДа [8]. На оба белка сконструированы иммунохимические тест-системы для иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунодиффузионного (ИДА). Чувствительность разработанных тест-систем для ИФА составила: для α 1-ВЕ-глобулина мозга 5 нг/мл и для α 2-СС-глобулина мозга – 10 нг/мл, для ИДА – 2 и 5 мг/л, соответственно.

Моноспецифические тест-системы на органоспецифические антигены мозга были использованы нами для поиска их в составе сывороточных белков при ЧМТ и ТБМ.

Список литературы

1. Белопасов, В. В. Клинико-диагностическое значение иммунохимического анализа белкового спектра ликвора при заболеваниях нервной системы : дис. ... д-ра мед. наук / В. В. Белопасов. – Астрахань, 1997. – 327 с.
2. Иммуноферментный анализ / под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М. : Мир, 1988. – 446 с.
3. Коханов, А. В. Взаимосвязь уровней сывороточных, острофазовых белков и онкомаркеров с количественной оценкой тяжести травмы и общего состояния пострадавших / А. В. Коханов, В. В. Белопасов, Е. В. Метелкина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 9. – С. 40.
4. Лихтерман, Л. Б. Неотложная нейрохирургия : руководство для врачей / Л. Б. Лихтерман, В. В. Лебедев, В. В. Крылов. – М. : Медицина, 2000. – 568 с.
5. Маурер, Г. Диск электрофорез / Г. Маурер. – М. : Мир, 1971. – 284 с.
6. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М. : Мир, 1985. – 358 с.
7. Храмкова, Н. И. Предел чувствительности метода преципитации в агаре / Н. И. Храмкова, Г. И. Абелев // Бюллетень экспериментальной биологии. – 1961. – № 12. – С. 107–109.
8. Чехонин, В. П. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов / В. П. Чехонин, Т. Б. Дмитриева, Ю. А. Жирков. – М. : Медицина, 1999. – 416 с.
9. Чишиева, М. А. Иммунохимические исследования водорастворимых антигенов фетальной, дефинитивной и опухолевой ткани мозга человека : автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. А. Чишиева. – Астрахань, 1978. – 22 с.
10. Kohn, J. Method for the detection and identification of α 1-fetoprotein in serum / J. Kohn // J. Clin. Path. – 1970. – Vol. 23. – P. 733.
11. Laemmle, Y. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / Y. K. Laemmle // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–682.
12. Laurell, C. B. Electroimmuno assay / C. B. Laurell // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. – 1972. – № 124. – P. 21–37.

Чишиева Мерчия Адиевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-51-64, e-mail: agma@astranet. ru.

Мяснянкин Александр Алексеевич, заочный аспирант кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-51-64, e-mail: agma@astranet. ru.

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, д. 121, тел.: (8512) 52-51-64, e-mail: agma@astranet. ru.