

## ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

**Иммунохимический анализ HbF методом РИД по Оухтерлони впервые показал значительный процент выявления HbF у больных с эритромами (66,67%), сублейкемическими миеломами (36,36%), острыми миелолейкозами HbF (22,22%) случаев, при острых и хронических лимфолейкозах HbF иммунохимическими методами не выявляется.**

Гемоглобины человека изучаются уже на протяжении почти века, но, тем не менее, эмбриональный гемоглобин (HbF, синоним - HbE) является одним из самых малоизученных белков человеческого организма. Сведения о HbF в научной литературе до сих пор крайне скудны. Такой парадоксально низкий интерес ученых к этому белку можно объяснить следующими причинами: а) методологический фактор: получение препарата HbF крайне затруднительно из-за сложностей получения биоматериала (HbF синтезируется только в раннем эмбриогенезе, с 5 по 18 гестации), экстрагирования и очистки белка; б) практический фактор: по мнению большинства клиницистов, данный белок не представляет прикладной (диагностическо-прогностической) ценности, т.к. активность его гена полностью репрессирована как у детей, так и у взрослых [1; 2; 3].

В данной работе авторы исходили из предположения, что активация гена HbF в постнатальном периоде жизни человека возможна при патологии, связанной с понижением степени дифференцировки, т.н. «омоложением» клеток эритроцитарного ростка. К таким состояниям можно отнести некоторые онкологические заболевания тканей красного костного мозга, в первую очередь, эритремии, сублейкемические миелозы, а также, возможно, некоторые миелолейкозы.

**Цель:** иммунохимический качественный анализ наличия эмбрионального гемоглобина в эритроцитах больных эритромами, сублейкемическими миеломами и лейкозами различных типов.

В процессе научно-экспериментального исследования физико-химических свойств эмбрионального гемоглобина авторами разработан оптимальный алгоритм выделения этого белка.

Исходным биоматериалом для выделения и очистки HbF служил абортный материал сроком 7-9 недель (отделение неонатологии больницы № 5 г. Астрахани). После промывки и сортировки эмбриональные ткани подвергались механическо-термической гомогенизации путем двукратного замораживания

и оттаивания. После экстрагирования цитозольных белков взвесь центрифугировали при 8000 г в течение 30 мин., после чего осадок отбрасывали.

Поскольку устойчивость эмбрионального гемоглобина несколько ниже, чем у фетального [2], для очистки HbF нами была модифицирована стандартная методика щелочной денатурации для выделения фетального гемоглобина [3, 4], состоящая в 40-секундной обработке смеси 1,2 М раствором NaOH с последовательным осаждением белков раствором сульфата аммония (до 50%-й насыщенности). После центрифугирования при 8000 об/мин. в течение 30 мин. осадок отделяли. В надосадочной жидкости оставался эмбриональный гемоглобин с незначительным количеством белковых примесей.

Полученный белковый препарат подвергали обесоливантию путем гель-проникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-25, рабочий буфер — 0,05 М, фосфатный буферный раствор pH 7,4.

Окончательную очистку HbF от оставшихся щелочеустойчивых компонентов в полученном на предыдущем этапе препарате проводили путем ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе G-50 на 0,01 М трисхлоридном буфере pH 8,1 в градиенте ионной силы.

*Анализ чистоты полученных препаратов осуществляли методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле.*

Полученные очищенные препараты HbF использовали, в частности, для получения специфических антисывороток на данный белок методом иммунизации кроликов. Иммунизация проводилась с полным адьювантом Фрейнда по стандартной методике [5].

Для контроля качества антисывороток проводили их иммунохимическое сопоставление с другими антигенными композитами, а также специфическую окраску полученных преципитатов бензидиновым методом [4]. При наличии дополнительных линий преципитации проводили дробное истощение антисыворотки соответствующей белковой фракцией.

Таблица 1  
Перечень использованного в работе материала

Исследуемый материал (кровь)	Количество проб
Здоровые	36
Больные эритремиями	12
Больные сублейкемическими миелоэозами	11
Больные хроническими миелолейкозами	22
Больные острыми миелолейкозами	9
Больные острыми и хроническими лимфолейкозами	17
ВСЕГО	107

Таблица 2  
Результаты иммунохимической индикации НбР в крови онкогематологических больных

Исследуемый материал	Количество проб	Количество положительных результатов на НбР	Процент положительных результатов на НбР
Здоровые	36	0	0,0
Больные эритремиями	12	8	66,67
Больные сублейкемическими миелоэозами	11	4	36,36
Больные хроническими миелолейкозами	22	1	4,55
Больные острыми миелолейкозами	9	2	22,22
Больные острыми и хроническими лимфолейкозами	17	0	0,0

В результате проведенной работы разработаны специфические иммунохимические тест-системы на эмбриональный гемоглобин, в которой тест-антигеном является очищенный препарат НбР (полученный вышеописанным способом) в рабочем разведении: 1/2 или экстракт тканей эмбриона (срок — 6-9 недель) в рабочем разведении 1/8-1/16. Тест-системы не использовали для иммунохимической индикации НбР в исследуемом материале.

Объектом нашего исследования являлась гепаринизированная кровь больных некоторыми гематологическими онкозаболеваниями. Всего было обследовано 96 образцов крови. Из них: 12 больных эритромиа, 11 больных сублейкемическими миелоэозами, 31 больной острыми и хроническими миелолейкозами, 17 больных острыми и хроническими лимфолейкозами, а также 36 образцов крови здоровых людей (группа контроля) (табл. 1).

Сбор биоматериала проводили в гематологическом отделении 1-й областной больницы г. Астрахани.

Подготовка проб к анализу состояла в их предварительном гемолизе путем двукратного замораживания (при  $-18^{\circ}\text{C}$ ) и оттаивания.

Индикация НбР в образцах осуществлялась путем иммунодиффузии по Оучтерлони [5]. В ходе работы использовались моновалентные иммунохимические тест-системы на НбР (см. выше).

После иммунопроявления агаровые стекла высушивали и подвергали специфическому окрашиванию на гемоглобины гваяколовым методом, модифицированным авторами: 0,2 г гваякола в 50 мл ледяной уксусной кислоты, затем добавляли этот раствор в 0,1М ацетатный буфер рН 4,6 с 0,2% хлоридом марганца (II) до 0,3% концентрации. Туда же добавляли

перекись водорода до концентрации 1%. Экспозиция 45 мин. В результате окраски гемоглобиновые преципитаты приобретали голубой цвет.

Стекла фотографировали в отраженно-рассеянном свете. Считывание результатов проводили только по отчетливым окрашенным линиям преципитации.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием статистических компьютерных программ.

В результате проведенного иммунохимического анализа исследуемого материала на эмбриональный гемоглобин методом радиальной иммунодиффузии по Оучтерлони получены следующие результаты (табл. 2). Не выявлено НбР в крови здоровых (контрольная группа), а также больных острыми и хроническими лимфолейкозами, что объяснимо исходя из цитологической специфики данных опухолей. Отмечена единичная регистрация НбР в крови больных хроническими миелолейкозами (4,55%), не являющаяся статистически достоверной. Эмбриональный гемоглобин впервые выявлен в крови больных эритремиями (частота выявления — 66,67%), сублейкемическими миелоэозами (36,36%) и острыми миелолейкозами (22,22%).

Публикация приведенных данных наряду с внедрением иммунохимического метода определения эмбрионального гемоглобина в прикладную медицину способствует повышению качества диагностики ряда онкогематологических заболеваний.

#### Библиографический список

1. Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника. — СПб, ООО "ЭЛБИ-СПб", 2000. — 384 с.

2. 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.

3. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш.Зайчик, А.П. Чурилов. — С.-Пб. «Элби-СПб». — 2000. — 182 с.

4. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / Й. Тодоров. — София. Медицина и физкультура. — 1968. — С. 278-310.

5. Никулина Д.М. Практическое освоение иммунохимических методов / Д.М. Никулина. — Метод. рекомендации. — Астрахань. — 1991. — 36 с.

**КРИВЕНЦЕВ Юрий Алексеевич**, кандидат медицинских наук, доцент.

**НИКУЛИНА Дина Максимовна**, кандидат медицинских наук, доцент, профессор.

**БИСАЛИЕВА Рината Альбкалиевна**, ассистент.

**БОРИСОВА Наталья Владимировна**, клинический ординатор.

Статья поступила в редакцию 10.10.06.

© Кривенцев Ю. А., Никулина Д. М., Бисалиева Р. А.,

Борисова Н. В.

УДК 617.55-007.43-053.31-089.844

**Д. А. ПЛОХИХ**

Кемеровская государственная  
медицинская академия

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРВИЧНОЙ И ОТСРОЧЕННОЙ ПЛАСТИКИ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ НОВЫМ СПОСОБОМ У БОЛЬНЫХ С ГАСТРОШИЗИСОМ**

Целью настоящей работы было сравнение результатов первичной пластики передней брюшной стенки и пластики новым способом у больных гастрошизисом с висцероабдоминальной диспропорцией (ВАД).

Разработанный нами новый способ хирургического лечения гастрошизиса исследован у 15 больных с гастрошизисом — основная группа. Группу сравнения составили 22 новорождённых ребенка с гастрошизисом, которым проводилась первичная пластика передней брюшной стенки местными тканями.

В результате исследования получены следующие данные. У больных группы сравнения операция приводила к значительному ухудшению состояния. В 16 наблюдениях отмечен синдром повышенного внутрибрюшного давления (СПВД). Умерло 9 детей. В основной группе послеоперационный период протекал легче, проявлений СПВД не было. Умер 1 ребенок. Таким образом, разработанный способ хирургического лечения гастрошизиса может стать операцией выбора при гастрошизисе с ВАД.

Вопрос оптимальной хирургической коррекции гастрошизиса до настоящего времени остается спорным [5, 7, 13, 17, 19]. Большинство хирургов отдает предпочтение первичной пластике местными тканями, дополняя ее мануальным растяжением передней брюшной стенки и удалением кишечного содержимого [1-5, 7, 10, 12]. Однако осложнения, связанные с повышением внутрибрюшного давления, возникающие у больных с висцероабдоминальной диспропорцией, вынуждают применять различные методики отсроченной пластики и вести поиск новых, более рациональных способов хирургического лечения [5, 6, 11, 14].

Целью настоящей работы было сравнение результатов первичной пластики и отсроченной пластики передней брюшной стенки разработанным нами новым способом у больных гастрошизисом с висцероабдоминальной диспропорцией.

### **Материал и методы**

Работа основана на результатах лечения 46 новорожденных детей с гастрошизисом, поступивших с

января 1995 по май 2006 года в клинику детской хирургии МУЗ ДГКБ № 5 г. Кемерова.

Новый способ хирургического лечения гастрошизиса исследован у 15 больных гастрошизисом — основная группа.

Группу сравнения составили 22 новорожденных ребенка с гастрошизисом, которым проводилась первичная пластика передней брюшной стенки местными тканями.

Исследование одобрено Комитетом по этике и доказательности медицинских научных исследований ГОУ ВПО Кемеровской государственной медицинской академии. Группы сформированы методом простой рандомизации.

В исследование включены только случаи гастрошизиса с висцероабдоминальной диспропорцией (ВАД). В качестве критериев исключения были приняты: 1. Наличие сопутствующей патологии (сочетанные пороки, другие заболевания), которая стала непосредственной причиной смерти больного или существенно повлияла на течение заболевания; 2. Ятрогенные осложнения, повлиявшие на исход заболевания.