

Психиатрия и психофармакотерапия. – 2001. – Т. 6. №3. – С.100-105.

5. Кузьминов В.Н., Юрченко Н.П., Юрченко А.Н. Диагностические и терапевтические проблемы при острых психозах у лиц с алкогольной зависимостью // Международный медицинский журнал. – 2003. – Т. 9. № 3. – С.31-33.

6. Минко А.И., Линский И.В. Наркология – М.: ЭКСМО, 2004. – С.314-318.

7. Моросанова В.И. Опросник «Стиль саморегуляции поведения». – М.: Когито-Центр, 2004. – С.4-42.

8. Наркология. Национальное руководство / Под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С.445-448, 473-475.

9. Сиволоп Ю.П., Савченков В.А., Аксельрод Б.А. и др. Алкогольный делирий в общей клинической практике // Медицина критических состояний. – 2004. – №2. – С.30-36.

Информация об авторе: 309537, Белгородская область, Старооскольский р-он, с.Каплино, ул. Подгорная, д.5, раб. (4725)22-12-27, e-mail: kuscheva@mail.ru, Кушѐва Надежда Сергеевна – заочный аспирант кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, врач-психиатр, заведующая психиатрическим отделением

© КРИВЕНЦЕВ Ю.А., БИСАЛИЕВА Р.А., ИШМАМЕДОВА Л.М., НОСКОВ А.И., РАМАЗАНОВ М.В. – 2011

УДК 616.155.16:576.8.077.3

НОВЫЙ СПОСОБ КЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ГЕМОГЛОБИНОВОГО СПЕКТРА

Юрий Алексеевич Кривенцев¹, Рината Альбкалиевна Бисалиева¹, Лия Маратовна Ишмамедова²,
Андрей Игоревич Носков¹, Магомед Валединович Рамазанов¹

¹Астраханская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. Х.М. Галимзянов, кафедра биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, зав. – д.м.н., проф. Д.М. Никулина;

²Филиал №8 Окружного военного клинического госпиталя Северо-Кавказского военного округа, командир – подполковник Ю.А. Белкин, отделение терапии, начальник – подполковник Л.М. Ишмамедова)

Резюме. Впервые сконструирована селективная иммунодиффузионная тест-система на эмбриональный гемоглобин с порогом чувствительности $4,25 \pm 0,22$ мг/л. Разработаны оптимальные алгоритмы количественного анализа гемоглобинов HbA₁, HbA₂, HbF и HbP. Впервые создана и успешно апробирована комплексная схема оценки гемоглобинового спектра по основным типам гемоглобина (HbA₁, HbA₂, HbF и HbP), отличающаяся специфичностью, надежностью ($r=0,98$), чувствительностью (порог от $1,7 \pm 0,29$ до $2,13 \pm 0,3$ мг/л), точностью ($\pm 1,2\%$), значимостью ($p < 0,001$), экономичностью.

Ключевые слова: гемоглобины, иммунохимия, количественный анализ.

A NEW METHOD FOR CLINICAL EVALUATION OF HEMOGLOBIN SPECTRUM

Y.A. Kriventsev¹, R.A. Bisaliev¹, L.M. Ishmamedova², A.I. Noskov¹, M.V. Ramazanov¹

¹Astrakhan State Medical Academy; ²Branch № 8 of Military Hospital of North Caucasian Military District)

Summary. The selective immunodiffusion test system for fetal hemoglobin with a sensitivity threshold $4,25 \pm 0,22$ mg/l has been developed for the first time. The optimal algorithms for quantitative analysis of hemoglobin HbA₁, HbA₂, HbF and HbP have been developed. The complex scheme of assessment of hemoglobin spectrum on the main types of hemoglobin (HbA₁, HbA₂, HbF and HbP) has been created and successfully tested, which is notable for the specificity and reliability ($r = 0,98$), sensitivity (threshold of $1,7 \pm 0,29$ to $2,13 \pm 0,3$ mg/l), accuracy ($\pm 1,2\%$), significantly ($p < 0,001$), and economy.

Key words: hemoglobin, immunochemistry, quantitative analysis.

К наиболее физиологически значимым типам гемоглобина человека относят гемоглобины взрослого HbA₁, HbA₂, фетальный (HbF) и эмбриональный гемоглобин (HbP). Литературные данные последних лет свидетельствуют о повышении интереса к отдельным типам гемоглобина как диагностически значимым маркерам при патологии красной крови, онкопатологии, гипоксиях и др. [4,6,7,10,11].

В современной клинической практике для индикации гемоглобинов в качестве стандартного применяется унифицированный гемоглобинцианидный метод, рекомендованный комитетом по стандартизации Европейского и Международного Общества по Гематологии [2,5]. Этот метод не отличается избирательностью: с его помощью определяется лишь общее количество гемоглобина крови, а не отдельных его типов. Даже в случае определения щелочестойчивой фракции гемоглобина по Зингеру и Бетке регистрируются несколько типов гемоглобина, а не только фетальный [12].

В последние годы появились единичные работы по изучению отдельных типов гемоглобина с помощью иммунохимических тест-систем [7,8,11]. Преимуществом иммунохимических методов является их высокая специфичность, чувствительность. Кроме того, эти методы позволяют исследовать сложные биологические смеси без какой-либо предварительной очистки и выделения исследуемого белка.

Таким образом, моделирование моноспецифиче-

ских иммунохимических тест-систем на основные типы гемоглобина и разработка комплексной схемы оценки гемоглобинового спектра крови актуально и целесообразно.

Цель работы: создание комплексной иммунохимической схемы оценки гемоглобинового спектра.

Материалы и методы

Исследование было проведено в период с 2005 по 2010 гг. на биологическом материале общей численностью 485 образцов. Объектом исследования являлись гемоглобины типов A₁, A₂, F и P.

Исходным материалом для фракционирования HbA₁ и HbA₂ являлась кровь доноров и здоровых беременных женщин; для очистки HbF – пуповинная кровь здоровых новорожденных и ткани плодов; для очистки HbP – эмбриональный материал сроком гестации 5-9 нед.

В работе применяли методы механически-термического гемолиза, комбинированной щелочной денатурации (поэтапная обработка гемолизата раствором сульфата аммония 50% насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующей седиментацией при 8000 g), препаративного электрофореза в агаровом геле на 0,1 М цитратном буфере pH 6,0 (в авторской модификации), электрофореза в полиакриламидном геле, ионообменной и гель-проникающей хроматографии [1,9].

Антисыворотки получали иммунизацией кроликов

породы «шиншилл» дробными дозами чистого антигена с адьювантом Фрейнда по общепринятой схеме. При моделировании тест-систем применяли: выделение α -цепей пара-хлормеркурибензоатом, истощение путем иммуноаффинной хроматографии на Bio Gel P-200, иммуноэлектрофорез по Грабару и Уильямсу [1].

Для индикации белков в биоматериале использовали: унифицированный гемоглобинцианидный метод (по инструкции Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ 17.06.2000), определение фетального гемоглобина по Бетке [12]; определение общего спектрофотометрически при 280 и 260 нм по Варбургу, иммунодиффузионное титрование по Ouchterlony в модификации Н.И. Храмовой и Г.И. Абелева, РИД по Манчини в модификации Фехей и Мак-Келви [13], ракетный электрофорез в агаровом геле по С.В. Laurell [1].

Для статистического анализа результатов исследования был использован лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2003 (Microsoft), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), среднее квадратичное отклонение (σ), среднюю ошибку средней арифметической (m). С целью определения значимости различий сопоставляемых величин применялся критерий t Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для оценки межгрупповой зависимости проводился линейный корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции – r). Корреляция считалась высокой при приближении модульной величины r к единице. Статистические взаимосвязи между показателями оценивались применением корреляционного, регрессионного анализа и методов многомерной статистики [3,9].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были получены новые сведения по физико-химическим свойствам HbA_1 , HbA_2 , HbF и HbP и разработаны оптимальные алгоритмы фракционирования по каждому из названных протеинов [6,7].

В ходе данной работы очищенные препараты HbA_1 , HbA_2 , HbF и HbP использовали для получения специфических антисывороток путем иммунизации кроликов. Верификацию полученных антисывороток проводили методами: иммунохимического сопоставления (по Оухтерлони) с соответствующими антигенными композитами, иммуноэлектрофорезом и специфическим окрашиванием бензидиновым и гваяколовым методами.

В результате проведенной работы впервые создана специфическая иммунохимическая тест-система на HbP , в которой тест-антигеном является экстракт тканей эмбриона (срок – 6-9 недель) в рабочем разведении 1/8-1/16. Порог чувствительности (ПЧ) тест-системы $4,25 \pm 0,22$ мг/л ($p < 0,01$).

Смоделированы специфические иммунохимические тест-системы на:

HbF , в которой тест-антигеном является гемолизат пуговичной крови в разведении: 1/64-1/256, ПЧ – $2,21 \pm 0,26$ мг/л ($p < 0,005$);

HbA_1 , тест-антиген – гемолизат крови взрослых доноров в разведении: 1/128-1/512, ПЧ – $3,24 \pm 0,18$ мг/л ($p < 0,01$);

HbA_2 , тест-антиген – очищенный препарат HbA_2 в разведении: 1/32-1/64, ПЧ – $4,42 \pm 0,19$ мг/л ($p < 0,01$).

Иммунохимические тест-системы были использованы для моделирования оптимальных способов индика-

ции изучаемых типов гемоглобина.

Для количественного анализа HbF разработан способ ракетного электрофореза в агаровом геле с додецилсульфатом натрия [8]. Корреляционный анализ Пирсона показал высокую прямую линейную зависимость концентрации HbF от квадрата диаметра кольца преципитации ($r=0,96$; $p < 0,001$). Преимущества способа: селективность; высокая чувствительность (ПЧ – $1,7 \pm 0,29$ мг/л); точность (максимальная погрешность $\pm 2\%$); значимость определения, в том числе и при определении малых величин гемоглобина ($p < 0,01$; $F=8,4$); экономия времени (9-12 ч).

Предложен и успешно апробирован способ восходящей трехэтапной индикации HbP , включающий: РИД-тестирование в тест-системе с двойным наполнением лунки антисывороткой (ПЧ – $2,13 \pm 0,19$ мг/л); классическое РИД-тестирование (ПЧ – $4,25 \pm 0,22$ мг/л) и титрование в тест-системе в кратных разведениях антигена. В каждом последующем этапе тестировали только пробы, положительно прореагировавшие на предыдущем этапе.

Разработаны способы количественного анализа HbA_1 и HbA_2 , основанные на методе радиальной иммунодиффузии по Манчини в модификации Фехей и Мак-Келви. Способы отличаются: специфичностью, чувствительностью (ПЧ от $2,1 \pm 0,32$ до $2,9 \pm 0,41$ мг/л; $\sigma=0,08$); точностью (максимальная погрешность $\pm 2,8\%$); значимостью определения, в том числе и при определении малых величин гемоглобина ($F=6,9$, $p < 0,01$); экономией трудозатрат за счет сокращения времени методики (не более 12 ч).

Создана новая комплексная схема количественной оценки гемоглобинового спектра по основным типам гемоглобина. Алгоритм предлагаемой схемы включает: определение общего гемоглобина (Hb) унифицированным гемоглобинцианидным методом; определение HbA_2 , HbF и HbP (при необходимости) описанными методами индикации и определение уровня HbA_1 , как разности между количеством общего Hb и HbA_2 , HbF , HbP .

В рамках этой работы проведен сравнительный анализ HbA_1 , HbA_2 и HbF описанными иммунохимическими способами, параллельно с определением общего Hb гемоглобинцианидным методом, у 148 доноров с профессиональной выборкой по полу (74 мужчины и 74 женщины) (табл. 1). Анализ показал, что средние значения концентрации HbA_1 , HbA_2 и HbF в пересчете на относительные единицы от общего Hb составляют 94,3%, 2,1% и 2,9% соответственно. Статистический анализ показал высокую положительную корреляцию между

Таблица 1

Показатели общего гемоглобина и его изоформ в исследуемой группе

Тип Hb	Методика определения	Концентрация (г/л)	σ	% Hb
Общий Hb (n=148)	Унифицированный гемоглобинцианидный метод	$145,8 \pm 24,4$	15,62	100
HbA_1 (n=148)	Радиальная иммунодиффузия по Манчини в модификации Фехей и Мак-Келви	$137,5 \pm 19,7$	13,09	94,3
HbA_2 (n=148)	Радиальная иммунодиффузия по Манчини в модификации Фехей и Мак-Келви	$3,07 \pm 0,12$	0,10	2,1
HbF (n=148)	Ракетный электрофорез в предлагаемой модификации	$4,24 \pm 0,19$	0,16	2,9

суммой концентраций HbA_1 , HbA_2 и HbF (в мг/л), определенных иммунохимически и концентрацией общего гемоглобина, определенной гемоглобинцианидным методом ($r=0,98$). Ошибка метода составляет 0,68%.

Преимущества разработанной схемы: комплексность анализа по общему Hb и важнейшим его изоформам; специфичность; высокая чувствительность (порог чувствительности от $1,7 \pm 0,29$ до $2,13 \pm 0,3$ мг/л); точность (максимальная погрешность $\pm 1,2\%$); значимость ($p < 0,001$); экономия трудозатрат за счет исключения из общей схемы этапа иммунохимического определения HbA_1 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Галь Э., Медьеша Г., Верещи Л. Электрофорез в разделении биохимических макромолекул. – М.: Знание, 1982. – 446 с.
2. Гаранина Е.Н. Качество лабораторного анализа. Факторы, критерии и методы оценки. – М.: Лабинформ, 1997. – С.16-18.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
4. Даистаянц Г.А. Клиническая гематология. – Киев: Здоровье, 1973. – С.45-72.
5. Делекторская Л.Н., Пименова Л.М., Кадашева О.Г. Оценка диагностической информативности лабораторных тестов (методические рекомендации) // Клин. лаб. диагностика. – М., 1992. – №1/2. – С.49-59.
6. Кривенцев Ю.А. Гемоглобины человека: иммунобиохимическая характеристика и медико-биологическое значение: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2009. – 42 с.
7. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М., Бисалиева Р.А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией // Омский научный вестник. – Омск, 2006. – Т. 46. №9. – С.272-274.
8. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М., Бисалиева Р.А. Способ количественного определения фетального гемоглобина человека // Патент №2310204 (7 с). Приоритет от 13.03.06. Оpubл. 10.11.2007. – БИ №31.
9. Майборода А.А., Калягин А.Н., Зобнин Ю.В., Щербатых А.В. Современные подходы к подготовке оригинальной статьи в журнал медико-биологической направленности в свете концепции «доказательной медицины» // Сиб. мед. журнал (Иркутск). – 2008. – Т. 76. №1. – С.5-8.
10. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – С.115-167, 301-314.
11. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. – София: Медицина и физкультура, 1968. – С.278-310.
12. Токарев Ю.Н., Ахундова А.Н., Андреева А.П. Иммунохимический метод ряда гемоглинопатий: Метод, рекомендации. – Баку: Новая книжная типография, 1982. – 9 с.
13. Betke K., Marte H.R., Schlift I. Hemoglobin in Blood. // Nature. – 1979. – Vol. 184. – P.1877-1878.
14. Fahey J.L., McKelvey E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates // J. Immunol. – 1965. – P.84-90.

Информация об авторах: 414000. г. Астрахань, ул. Бакинская 121, ГОУ ВПО АГМА Росздрава (кафедра биохимии с курсом КЛД), тел. (8512)-44-74-96, e-mail: rabbit1630@mail.ru, astgosp@yandex.ru, oboltys_72@rambler.ru, ramasmv@yandex.ru, Кривенцев Юрий Алексеевич – доцент, д.м.н.; Бисалиева Рината Альбакалиевна – ассистент, к.м.н.; Ишмамедова Лия Маратовна – начальник отделения; Носков Андрей Игоревич – доцент, к.м.н.; Рамазанов Магомед Валединович – ассистент.

© ШАГДУРОВА Э.А. – 2011
УДК 612.13:616.831-005

ОЦЕНКА ВЕГЕТАТИВНОГО ТОНУСА У МЕТЕОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПАЦИЕНТОВ С ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

Эржена Анатольевна Шагдурова

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра нервных болезней, зав. – д.м.н., проф. В.И. Окладников)

Резюме. Обследованы пациенты с дисциркуляторной энцефалопатией I-II стадии. Пациенты были разделены на 2 группы: обладающие и не обладающие признаками повышенной метеочувствительности. Проведен клинико-неврологический осмотр, для оценки выраженности вегетативной дисфункции применен опросник академика А.М. Вейна, исследованы вегетативные пробы. У пациентов с ДЭ, обладающих повышенной метеочувствительностью, установлена выраженная вегетативная дисфункция с преобладанием активности симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Ключевые слова: вегетативная нервная система, дисциркуляторная энцефалопатия, метеочувствительность.

EVALUATION OF AUTONOMIC REGULATION IN METEOSENSITIVE PATIENTS WITH DISCIRCULATORY ENCEPHALOPATHY

E.A. Shagdurova

(Irkutsk State Medical University)

Summary. Comparative investigation of patients with discirculatory encephalopathy has been conducted. All the patients were divided into 2 groups depending of level of meteosensitivity: meteosensitive and non meteosensitive. We performed clinical-neurological examination. To determine vegetative dysfunction we used A.M. Wein's questionnaire and some vegetative test. In patients with discirculatory encephalopathy with meteosensitivity of higher level expressed vegetative dysfunction with prevalence of sympathetic nervous system activity has been noted.

Key words: autonomic system, discirculatory encephalopathy, meteosensitivity.

Дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ) одна из наиболее частых форм хронических сосудистых заболеваний головного мозга [4]. Одним из факторов патогенеза ДЭ является нарушение функционирования надсегментарных вегетативных образований. В то же время сама ДЭ проявляется не только когнитивными, двигательными нарушениями, но и вегетативными расстройствами, играющими значимую роль в развитии хронической сосудистой недостаточности [1,5,6]. Как известно, вегетативная нервная система обеспечивает гомеостаз и адаптацию организма к постоянно меняющимся факторам окружающей среды. При дисбалансе вегетативной регуляции факторы внешней среды оказывают большее влияние на организм человека, и это, в частности, может проявляться метеотропностью (повышенной метеочувствительностью).

Данное обстоятельство побудило нас исследовать состояние вегетативной нервной системы у пациентов ДЭ, обладающих повышенной метеочувствительностью.

Материалы и методы

Исследование проводилось в клинике нервных болезней им. Х.-Б.Г. Ходоса Иркутского государственного медицинского университета. Обследован 141 пациент с ДЭ I-II стадии. Клинический диагноз установлен в соответствии с классификацией сосудистых поражений головного и спинного мозга [4], а также существующими критериями ДЭ [2] и подтвержден лабораторными, инструментальными данными. В ходе клинического исследования пациенты были разделены на две группы: