

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАЗВИТИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ВНУТРИБРЮШНЫХ СРАЩЕНИЙ

П. М. Лаврешин¹, И. С. Тюменцева², В. К. Гобеджишвили¹,
В. В. Гобеджишвили¹, И. Г. Келасов¹

¹Ставропольская государственная медицинская академия

²Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

В связи с расширением показаний к хирургическому лечению заболеваний органов брюшной полости и отсутствием надежных средств профилактики адгезивного процесса число послеоперационных спаечных осложнений продолжает оставаться высоким. По поводу спаечной болезни ежегодно в хирургических отделениях лечатся около 1 % прооперированных ранее больных, у 50–75 % этой категории больных развивается кишечная непроходимость с высокой летальностью. Консервативное лечение спаечной болезни малоэффективно, а после оперативных вмешательств рецидивы встречаются у 32–71 % пациентов, смертность составляет от 13 до 55 % [4, 8, 10].

В течение последних десятилетий в медико-биологических исследованиях для избирательного концентрирования различных микроорганизмов и вирусов, их антигенов, иммуноглобулинов различных классов широко используется метод иммуномагнитной сепарации [11, 12, 14, 15, 16]. Для иммунодиагностики диффузных болезней соединительной ткани, оценки динамики тяжести заболеваний, эффективности проводимой терапии предложены иммобилизованные гранулированные антигенные диагностические препараты с магнитными свойствами на основе полиакриламидного геля (ПААГ) [3, 5]. Однако при всех положительных свойствах указанного ПААГ-носителя он имеет ряд ограничений: длительность и многостадийность получения, использование дорогостоящих импортных высокотоксичных реактивов при синтезе [1, 2, 6].

Цель исследования. Конструирование магнимоносorbентной тест-системы для прогнозирования развития послеоперационного спаечного процесса в брюшной полости и определение ее диагностической ценности.

Лаврешин Петр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: (8652)357201.

Тюменцева Ирина Степановна, доктор медицинских наук, заведующая научно-производственной лабораторией особо опасных и других инфекций ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора; тел.: 8(8652)264039.

Гобеджишвили Владимир Кишвардиевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей хирургии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: (8652)296889; e-mail: v_lin@mail.ru.

Гобеджишвили Вахтанг Владимирович, очный аспирант кафедры общей хирургии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: (8652)296889; e-mail: v_lin@mail.ru.

Келасов Ираклий Георгиевич, заочный аспирант кафедры общей хирургии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: 89283404027.

Материал и методы. Клинические исследования проводились на базе хирургического отделения МУЗ «2-я городская клиническая больница» г. Ставрополя у 48 больных, оперированных по поводу острого катарального аппендицита. Экспериментальные исследования и конструирование магнимоносorbентной тест-системы осуществлены совместно с научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций (профессор И. С. Тюменцева) ФГУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Для наиболее полного извлечения антигенных компонентов из спаечной ткани за основу приняли методы L. Dexter с соавт. [7] в модификации F. O. Forlaender [9] и A. Boivin и L. Mesrobian [13].

Результаты и обсуждение. Используя принципы получения композиционных органокремнеземных сорбентов [1, 2, 6], разработали аффинный магнимоносorbент для диагностики аутоиммунного процесса при спайкообразовании в иммуноферментном анализе (ИФА).

В качестве сорбционного материала использовали кремнезем – алюмосиликат, химическое модифицирование поверхности которого с целью образования на ней функционально-активных групп, способных ковалентно связываться с белковым лигандом, осуществляли в присутствии полимера – декстрана (полиглюкина) и поверхностно-активного вещества (ПАВ) – вторичного алкилсульфата натрия.

Процесс изготовления магнитного иммуносorbента можно разделить на две основные стадии: 1 стадия – получение магнимоносorbента (МС); 2 стадия – получение магнимоиммуносorbента (МИС).

Для получения МС к 1,5 г алюмосиликатного наполнителя добавляли 30 мл 6 % водного раствора полиглюкина и 3 г магнитного порошка (Fe_2O_3), перемешивали и проводили гелеобразование при температуре $22 \pm 4^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Значение pH гелеобразования составляло 7,0. Полученный сорбент высушивали при $100\text{--}110^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, измельчали и методом отсева выделяли фракции с размером частиц до 50 микрон. Полученный МС имел следующие структурные характеристики: удельная поверхность – $18,5\text{ м}^2/\text{г}$; объем пор – $1,19\text{ см}^3/\text{г}$; радиус пор – 132,2 нм. Магнимоносorbенты были изучены на автоматическом счетчике частиц TC10TM («Bio-Rad», США) с применением одно-разовых слайдов с камерами для суспензии частиц размером от 4 до 50 мкм в диаметре. Изображение частиц просматривали на экране. Результаты подсчетов экспортировали на внешний USB-носитель (флеш-карту) и просматривали в программе Microsoft Excel на компьютере, далее исследовали гистограмму распределения частиц в образце на основании их диаметра. Магнитные частицы имели однородную структуру без признаков слипания. Для химического активирования поверхности МС использован вторичный алкилсуль-

фат натрия. Оно заключалось в следующем: к 1 г МС приливали 7,5 мл дистиллированной воды (ДВ), содержащей 0,25 мл ПАВ. Смесь инкубировали 1–2 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$, затем сорбент отмывали 100 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и 100 мл ДВ.

Для придания магносорбенту биоспецифических свойств и получения магноиммуносорбента на поверхность МС иммобилизовали специфический лиганд, которым служил комплексный спаечный аутоантиген. Иммобилизацию лиганда проводили следующим образом: к 0,4 мл 10 % взвеси МС добавляли 1 мл антигена с концентрацией белка 2,0 мг/мл, инкубировали 2 ч при значении pH раствора 6,0–7,0 и температуре от 22 до 37°C . Полученный сорбент использован для проведения иммуномагнитной сепарации специфических аутоантител (Ат) в сыворотках крови морских свинок со спаечным процессом в брюшной полости и детекции их в иммуноферментном анализе, при этом в качестве твердой фазы вместо полистироловых микропланшетов, традиционно используемых при постановке ИФА, применяли разработанные нами МИС при постановке «сэндвич»-варианта этого метода.

При проведении сочетанного метода МИС + ИФА аутоантитела, содержащиеся в исследуемых сыворотках крови больных, специфически взаимодействовали с комплексным спаечным аутоантигеном, иммобилизованным на МИС. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляли с помощью конъюгата пероксидазного против иммуноглобулинов морских свинок в рабочем разведении (коммерческий препарат НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), который катализировал расщепление хромогена – ортофенилендиамина. Количество связанного конъюгата определяли цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена. При этом интенсивность окрашивания пропорциональна количеству содержащихся Ат в исследуемом образце сыворотки крови.

Модифицированный «сэндвич» – ИФА с использованием алюмосиликатных МИС проводили следующим образом. В опытные и контрольные флаконы вносили по 50 мкл 10 % взвеси МИС. Затем в опытные флаконы вносили по 200 мкл сыворотки крови морских свинок в разведении 1:10 и более; во флакон с отрицательным контролем – 200 мкл ФСБ с 0,05 % твина-20. Инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 ± 3 мин. После удаления из флаконов жидкости МИС трижды промывали ФСБ с твин-20, придерживая постоянным магнитом каждый флакон с сорбентом. Затем во все флаконы вносили по 200 мкл рабочего разведения иммунопероксидазного конъюгата, в который перед внесением добавляли 10 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 1 мл конъюгата, инкубировали при $22 \pm 4^\circ\text{C}$ в течение 15 мин, промывали, как описано выше, 5–6 раз. После этого во флакон с отрицательным контролем вносили 200 мкл субстрат-индикаторного раствора и наблюдали за реакцией. Как только содержимое флакона начинало желтеть, его в количестве 100 мкл вносили в лунку микропланшета, не захватывая сорбент, и останавливали реакцию внесением 50 мкл стоп-реагента. Аналогичную операцию проводили с опытными образцами. Время регистрации результатов – в течение 1–2 мин. При положительном результате происходило оранжево-коричневое окрашивание, при отрицательном – раствор ингредиентов реакции оставался бесцветным. Учет результатов проводили на регистрирующем фотометре ИФА-ОЭП (Россия) при длине волны 492 нм. Положительными считали пробы, если их оптическая

плотность (ОП) в 1,5 и более раз превышала ОП отрицательного контроля.

Результаты проведенных исследований показали, что равновесный процесс между Ат и МИС наступал через 30 мин, а между образовавшимся комплексом сорбент-Аг-Ат с конъюгатом – через 15 мин.

Для оценки специфичности разработанной тест-системы были получены сыворотки у 22 морских свинок с антителами против различных здоровых органов животных. Для этого из печени, легкого, брюшины, рубцов морских свинок были изолированы водорастворимые антигенные комплексы, которыми иммунизировали животных путем 4-кратных внутримышечных введений с интервалом в 5 дней. При контроле наличия специфических антител в реакции преципитации по Оухтерлони было показано наличие полос преципитации сыворотки при постановке иммуноферментного анализа с применением МИС для диагностики спаечного процесса. В остальных случаях были получены отрицательные или диагностически недостоверные результаты, что свидетельствовало о достаточной специфичности разработанной тест-системы.

Вышеизложенное показывает принципиальную возможность использования иммуноферментного анализа с применением антигенного аффинного сорбента с магнитными свойствами для оценки иммунологических сдвигов при развитии патологического спайкообразования.

Эти опыты дали нам основание создать магноиммуносорбентную антигенную тест-систему для выявления предрасположенности к развитию внутрибрюшных спаек у человека. При этом в качестве лиганда, иммобилизуемого на поверхность магносорбента, использовали водорастворимый антигенный комплекс из внутрибрюшных спаек. Технология получения МИС была аналогична таковой при разработке тест-системы для экспериментальных животных.

С целью изучения диагностических возможностей сконструированной нами тест-системы (СТС) для прогнозирования предрасположенности к развитию послеоперационного адгезивного процесса по сравнению с предложенной ранее (ТС) были исследованы сыворотки крови 48 больных, оперированных ранее (аппендэктомия), у которых через 1,5 месяца и более при операциях по поводу другой патологии выявлены спайки в брюшной полости. Изучение сывороток этих пациентов в иммуноферментном анализе с МИС с антигенными комплексами, выделенными из нормальной брюшины, дали отрицательный результат в сроки от 30 до 60 суток. МИС с антигенными комплексами из внутрибрюшных спаек в те же сроки исследования с сыворотками крови изучаемой группы больных дали положительную реакцию в разведениях последней 1:80 – 1:640. Обращает на себя внимание динамика изменений титра антител сывороток крови больных в разные сроки исследования. На 30-е сутки сыворотки крови всех исследуемых с внутрибрюшными спайками давали реакцию с СТС в разведении 1:80, а в разведении 1:160 лишь в 22 (45,8 %) случаях, в разведении 1:320 – только у 8 (16,7 %) пациентов. С 30 до 45 суток эта динамика изменялась: увеличивалось число пациентов, сыворотки которых давали положительную реакцию в титрах 1:160 и 1:320 – 26 (54,2 %) и 15 (31,3 %) соответственно. У 6 (15,8 %) больных реакция зафиксирована с титром сыворотки 1:640. Результаты иммуноферментного анализа сывороток больных с внутрибрюшными спайками к 60-м суткам показывали тенденцию к нарастанию положительных реакций сывороток крови пациентов с СТС в разведениях 1:160 – 1:640.

ТС с АСК из внутрибрюшных спаек в те же сроки исследования с сыворотками крови этой же группы больных дала положительную реакцию в разведениях последней 1:80 – 1:320 в значительно меньшем количестве случаев (рис. 1, 2).

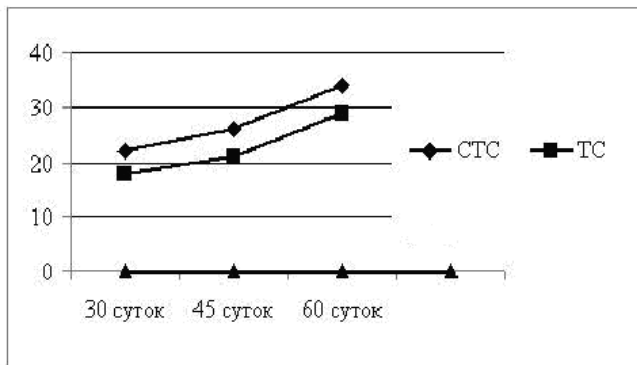


Рис. 1. Динамика изменений титра антител сыворотки крови больных в ИФА с ТС и ТС (титр 1:160)

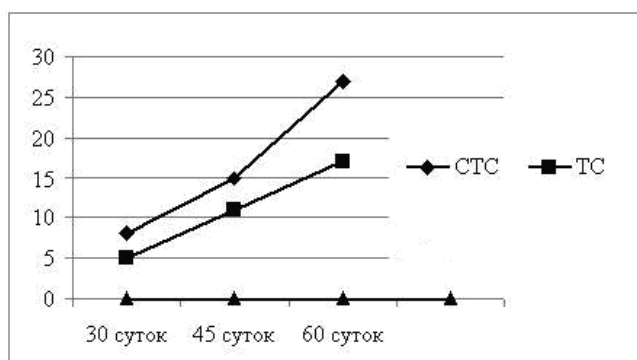


Рис. 2. Динамика изменений титра антител сыворотки крови больных в ИФА с ТС и ТС (титр 1:320)

Результаты проведенного исследования доказали более высокую диагностическую ценность ТС по сравнению с ТС. Следует отметить, что если число положительных реакций сыворотки крови больных с ТС в ИФА при разведении сыворотки 1:160 выше в 1,2 раза, то при титре сыворотки 1:640 – в 2,6 раза.

Результаты иммуноферментного анализа сывороток 48 пациентов, сопоставимых по полу, возрасту, имевшейся патологии с предыдущей группой больных, у которых в брюшной полости спаек не образовалось, были отрицательными. Лишь в единичных случаях ($n=3$) сыворотки реагировали в разведении 1:10 с МИС с иммобилизованными антигенными комплексами из спаек.

Заключение. Сконструированная нами магнитоиммуносорбентная тест-система для прогнозирования развития патологического спайкообразования в иммуноферментном анализе обладает высокой диагностической ценностью и информативностью.

Литература

- Афанасьев, Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Афанасьев Е.Н. – Ростов н/Д, 2000. – 45 с.
- Жарникова, И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Жарникова И.В. – Ставрополь, 2004. – 39 с.
- Зборовский, А.Б. Перспективы применения магнитосорбентов в иммунодиагностике и лечении системной красной волчанки и ревматоидного артрита / А.Б. Зборовский, И.П. Гонтарь // Клиническая медицина. – Т. 79, № 2. – 2001. – С. 42–45.
- Канцалиев, Л.Б. Функциональное состояние печени при острой кишечной непроходимости / Л.Б. Канцалиев, Г.Б. Каиров // IX Всерос. съезд хирургов. – Волгоград, 2000. – С. 174–175.
- Мнацаканян, С.Г. Клинико-диагностическое значение определения антител к ксантиноксидазе у больных ревматоидным артритом с использованием иммобилизированной формы магнитоуправляемого сорбента : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Мнацаканян С.Г. – Волгоград, 2008. – 27 с.
- Тюменцева, И.С. Научно-методические основы конструирования и усовершенствования производства диагностических тест-систем для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Тюменцева И.С. – Ставрополь, 1996. – 57 с.
- Dexter, L. Renal humoral processor mechanism in man preparation and assay of human rennin, human hypertensinogen and hypertension / L. Dexter, F.W. Gaynes, W.C. Bridges // J. Clin. Invest. – 1945. – № 24. – P. 62.
- Divilio, L.T. Surgical adhesion development and prevention / L.T.Divilio // Int Surg. – 2005. – Vol. 90, № 3. – P. 6–9.
- Forlaender, F.O. В кн.: P. Miescher, K.O. Forlaender (Hrsg.). Immunopathologie in klinik und Forschung Stuttgart. – 1957. – P. 376.
- Freeman, M.L. Expression of transforming growth factor beta isoform mRNA in injured peritoneum that healed with adhesions and without adhesions and in uninjured peritoneum / M.L. Freeman, G.M. Saed, T.F. Elhamady // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2003. – № 3 [Epub ahead of print].
- Grinde, B. Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain / B. Grinde, T.O. Johanssen, H. Ushijima // J. Virol. Methods. – 1995. – Vol. 55, № 3. – P. 327–338.
- Haukanes, B.I. Application of magnetic beads in bioassays / B.I. Haukanes, C. Kyam // Biotechnology (NY). – 1993. – Vol. 11, № 1, – P. 60–63.
- Кэбот, Е.А. Антигены типа Буавена / Е.А. Кэбот, М.М. Мейер // Экспериментальная иммунология : пер. с англ. – М. : Медицина, 1968. – С. 549–551.
- Recovery of Cryptosporidium oocysts and cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation / R.M. McCuin et al. // J. Microbiol. Methods. – 2001. – Vol. 45, № 2. – P. 69–76.
- Banatvala, Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens / P.F. Muir [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 1. – P. 31–38.
- Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology / O. Olsvik [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 1994. – № 7(1). – P. 43–54.

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
РАЗВИТИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ
ВНУТРИБРЮШНЫХ СРАЩЕНИЙ**

П. М. ЛАВРЕШИН, И. С. ТЮМЕНЦЕВА,
В. К. ГОБЕДЖИШВИЛИ, В. В. ГОБЕДЖИШВИЛИ,
И. Г. КЕЛАСОВ

Сконструирована магноиммунсорбентная тест-система для прогнозирования развития послеоперационного спаечного процесса в брюшной полости и определена ее диагностическая ценность.

Обследовано 48 больных, оперированных по поводу острого катарального аппендицита. Показана принципиальная возможность использования иммуноферментного анализа с применением антигенного аффинного сорбента с магнитными свойствами для оценки иммунологических сдвигов при развитии патологического спайкообразования.

Создана магноиммунсорбентная антигенная тест-система для выявления предрасположенности к развитию внутрибрюшных спаек у человека. При этом в качестве лиганда, иммобилизуемого на поверхность магносорбента, использовали водорастворимый антигенный комплекс из внутрибрюшных спаек.

Сконструированная магноиммунсорбентная тест-система для прогнозирования развития патологического спайкообразования обладает высокой диагностической ценностью и информативностью.

Ключевые слова: брюшная полость, спаечный процесс, тест-система, прогнозирование, диагностика

**TEST-SYSTEM FOR DIAGNOSTICS
OF POSTOPERATIVE ABDOMINAL ADHESIONS
DEVELOPMENT**

LAVRESHIN P.M., TUMENTCEVA I.S.,
GOBEDZHISHVILI V.K.,
GOBEDZHISHVILI V.V., KELASOV I.G.

Magnoimmunosorbent test-system for prediction of postoperative abdominal adhesions development was constructed and its diagnostic value was assessed.

The possibility of enzymeimmunoassay using antigen affinity adsorbent with magnetic properties to reveal the immunological changes during adhesions formation was assessed in 48 patients operated for acute catarrhal appendicitis. The above magnoimmunosorbent antigen test-system can be used for detection of predisposition to the development of intra-abdominal adhesions. Water-soluble antigenic complex of intra-abdominal adhesions was used as the ligand immobilized on the surface of magnosorbent.

Key words: abdominal cavity, adhesive process, test-system, prediction, diagnostics

© Коллектив авторов, 2012
УДК 618.3-06:616.8-009.24; 571.27

К ВОПРОСУ О ПРОГНОЗИРОВАНИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ТЯЖЕЛОГО ГЕСТОЗА

В. А. Аксененко, А. А. Дубовой, О. В. Найденова, Ф. Р. Тоторкулова
Ставропольская государственная медицинская академия

Гестоз занимает одну из лидирующих позиций в структуре материнской смертности (третье место в России и Ставропольском крае), при этом частота других акушерских осложнений, перинатальная заболеваемость и смертность превышают средние показатели в несколько раз. По данным зарубежных авторов гестоз встречается в 3–14 % всех беременностей [11], в России же частота встречаемости данной патологии составляет 14–24 % [1, 5, 7], а в стационарах высокого риска, в том числе Ставрополя, она достигает 26–30 %. Несмотря на то, что гестоз является так

называемой управляемой причиной материнской смертности (предотвратимость смертельных исходов составляет от 60 до 85 %), частота данной патологии не имеет тенденции к снижению [4].

По нашим данным, легкий гестоз встречается в 81 % случаев, средней степени – у 11 %, тяжелый – у 8 % пациенток. По возрастному критерию беременные распределяются следующим образом: до 20 лет – 15,6 %; 21–29 лет – 59,6 %; старше 30 лет – 24,8 %. Проведенный нами анализ историй родов с 2002 по 2010 год показывает, что чаще данной патологией страдают первобеременные, чем повторнобеременные (64 % против 36 % соответственно).

Во многих странах проводятся исследования, направленные на поиск и разработку прогностических и диагностических критериев, значимых для данного осложнения беременности. В США существует рабочая группа по высокому артериальному давлению при беременности (Национальный институт здоровья США), аналогичные исследования ведутся и в нашей стране.

Однако, несмотря на активное изучение гестоза, единая концепция этиологии, патогенеза, а также четкие критерии степени тяжести этой патологии отсутствуют.

Аксененко Виктор Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: 8(8652)716323.

Дубовой Александр Александрович, аспирант кафедры акушерства и гинекологии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: 89288100109; e-mail: alexanderdubovoy@gmail.com.

Найденова Ольга Валерьевна, соискатель кафедры акушерства и гинекологии Ставропольской государственной медицинской академии; тел.: 89283066003; e-mail: olganay@yandex.ru.