

Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных

БИСАЛИЕВА Р.А.
КРИВЕНЦЕВ Ю.А.
БИСАЛИЕВ Р.В.
КАЛЬНОЙ В.С.

ассистент кафедры биохимии Астраханской государственной медицинской академии (АГМА)
к.м.н., доцент, кафедра биохимии АГМА
к.м.н., заместитель руководителя наркологического учебно-научно-лечебного центра АГМА
руководитель наркологического учебно-научно-лечебного центра АГМА

Даны результаты иммунохимического количественного анализа фетального гемоглобина в крови больных алкогольной зависимостью и опийной наркоманией, а также в крови здоровых (контрольная группа). Проведенный анализ показал достоверное повышение уровня фетального гемоглобина в крови больных опийной наркоманией, алкогольной зависимостью по сравнению с группой контроля.

Введение

Значительный рост распространенности наркологических заболеваний, отсутствие эффективных методов и средств их лечения остро ставит вопрос о необходимости разработки методов ранней диагностики, профилактических и лечебных мер, направленных на борьбу с этими расстройствами. В работах отечественных и зарубежных авторов акцентируется внимание на выявлении генетических, нейрофизиологических маркеров предрасположенности к психоактивным веществам (ПАВ). Одновременно недостаточно изученными остаются вопросы нарушения функционирования гомеостатических систем, изменений метаболических и энергетических процессов на молекулярно-биохимическом уровне.

В последние годы активно ведется работа по созданию иммунохимических тест-систем на фетальный гемоглобин [5, 10], поскольку используемые до настоящего времени методы колориметрического определения данного белка не отличались точностью, специфичностью и регистрировали целую группу щелочерезистентных белков. Фетальный гемоглобин (HbF) начинает синтезироваться через две недели после формирования печени плода (с 8-й недели эмбрионального развития), и к 6 мес. замещает примитивный гемоглобин, становясь основным гемоглобином плода [9, 11, 12].

В современной литературе имеются данные о повышении уровня HbF при различной соматической патологии, сопровождающейся тканевой гипоксией. Так, например, повышение концентрации фетального гемоглобина в крови наблюдается у больных с хронической ишемической болезнью сердца и хронической обструктивной болезнью легких. Вместе с тем, работ по иммунохимическому изучению концентрации фетального гемоглобина при наркологических заболеваниях нет.

В настоящей работе авторы исходили из предположения, что метаболические нарушения, возникаю-

щие в результате хронической интоксикации ПАВ, затрагивают процессы аэробного окисления, что неизбежно приводит к развитию гипоксических состояний. Поэтому в качестве биологического маркера соматического состояния наркологических больных нами был выбран фетальный гемоглобин, поскольку периферическое звено эритрона является сверхчувствительной системой, чутко реагирующей на изменения гомеостаза. Кроме того, фетальный гемоглобин имеет большее сродство к кислороду, нежели гемоглобин взрослого [2, 3, 4, 7, 8]. Это позволит совершенствовать основные методологические подходы к проведению клинико-лабораторных обследований, также будет способствовать более обширному и глубокому пониманию основных механизмов развития наркологической патологии.

Цель настоящего исследования — иммунохимическое определение уровня HbF в крови больных алкоголизмом и опийной наркоманией.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась гепаринизированная периферическая кровь наркологических больных. Были обследованы образцы крови от 138 чел., из них: 52 образца от пациентов с алкогольной зависимостью; 44 — от больных опийной наркоманией и 42 пробы от здоровых взрослых (контрольная группа). Сбор клинического материала проводился в наркологическом учебно-научно-лечебном центре Астраханской государственной медицинской академии. Возраст больных составил от 18 до 43 лет. Клинический статус обследуемых соответствовал острому абстинентному синдрому. Психопатологическая симптоматика синдрома отмены была представлена нарушениями сна, кошмарными сновидениями, сновидениями на наркологическую (употребление ПАВ, сцены застолья, приготовление наркотических веществ) тематику, аффективными расстройствами (тревож-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ность, раздражительность, депрессия, гетеро- и аутоагрессия). Соматоневрологическая симптоматика была следующей: тахикардия, повышение артериального давления, тошнота, головная боль, головокружение, ломота в теле, одышка различной степени выраженности. Лечение острого абстинентного синдрома как в группе больных алкоголизмом, так и в группе опиоманов по своим подходам принципиально не различалось. Оно было комплексным, включало назначение антиконвульсантов, обезболивающих средств, психотропных препаратов. Всем больным назначались вегетотропные, гепатотропные средства, витамины.

В силу специфики патологии половой профиль исследуемых групп был несимметричен — 92,7% мужчин. Поэтому в целях получения более объективных и достоверных результатов контрольная группа была составлена с учетом той же половой пропорции: 90,4% мужчин и 9,5% женщин соответственно.

Забор крови у наркологических больных и доноров осуществлялся в условиях физиологического покоя в пластиковые пробирки с ЭДТА (7,2 мг / 5 мл).

Для получения гемолизата использовали методику осмотическо-механического гемолиза с последующим избавлением от клеточных обломков путем центрифугирования раствора при 8000 об/мин.

Для выделения и очистки HbF применяли методы щелочной денатурации, высаливания, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии.

Для получения антисывороток при иммунизации в качестве лабораторных животных использовали кроликов породы шиншилла. Иммунизация кроликов проводилась с полным адьювантом Фрейнда по стандартной схеме [1, 6].

Количественный анализ fetalного гемоглобина в исследуемых образцах проводили методом ракетного электрофореза с додецилсульфатом натрия (приоритетная справка № 2006107774 (008445) от 13.03.2006) [5]. Для построения калибровочных кривых использовали препараты HbF с концентрацией от 0,5 мг/л до 4000 мг/л по исследуемому гемоглобину.

Отбор проб в группу контроля проводили на станции переливания крови Астрахани от доноров в возрастном диапазоне 20—40 лет.

Статистическую и графическую обработку фактического материала проводили с помощью прикладной программы для Windows XP Professional Edition — Microsoft 2003.

Результаты и их обсуждение

В процессе научно-исследовательской работы был разработан оптимальный алгоритм выделения и очистки fetalного гемоглобина из гепаринизированной пуповинной крови. Гемолизат пуповинной крови, полученный по стандартной методике, подвергали щелочной денатурации 1,2 М раствором NaOH в течение одной минуты с последующим осаждением сульфатом аммония 50%-ной насыщенности. Надосадочную жидкость затем подвергали обессоливанию гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25, рабочий буфер — 0,05 М фосфатный раствор pH 7,4. Заключительным этапом выделения HbF являлась ионообменная хроматография на ДЕАЕ-сефадексе А-50 с 0,01 М трис-хлоридным рабочим буфером pH 8,1 в нисходящем градиенте pH.

Анализ чистоты полученного препарата проводился методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Очищенный препарат fetalного гемоглобина использовали для получения специфических антисывороток путем иммунизации кроликов. В результате была получена моновалентная антисыворотка на fetalный гемоглобин, контроль специфичности которой проводили сопоставлением с антигенными композитами методами радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони, иммуноэлектрофореза, специфической окраской на гемоглобин гваяковой кислотой [6].

С использованием полученной антисыворотки и очищенного препарата HbF была смоделирована иммунохимическая тест-система на этот белок и разработан способ количественного анализа HbF в исследуемых жидкостях методом ракетного электрофореза с додецилсульфатом натрия, с помощью которого в дальнейшем был проведен развернутый количественный иммунохимический анализ HbF в крови пациентов исследуемых групп (табл.).

Таблица

Результаты количественного определения HbF в крови наркологических больных и здоровых доноров

Группы	Число обследованных	Концентрация HbF (мг/л)	Процент HbF от общего Hb
Больные алкоголизмом	44	1631±43	3,76
Больные опийной наркоманией	52	1848±56	4,26
Здоровые (контрольная группа)	42	650±29	1,51

Анализ показал достоверное превышение концентрации фетального гемоглобина в крови больных алкогольной зависимостью и опийной наркоманией почти в три раза, по сравнению с уровнем концентрации HbF в крови доноров контрольной группы ($p \leq 0,05$). Активация синтеза HbF у наркологических больных, возможно, объясняется появлением измененного клона эритроидных элементов, способных при определенных условиях к увеличенному синтезу HbF среди популяции зрелых эритроцитов, вследствие ранней усиленной гемоглобинизации эритробластов. Принимая во внимание положение о ведущей роли эритрона в механизмах дыхания, можно предположить, что главным фактором, регулирующим эритропоэз, должно быть отношение между снабжением тканей кислородом и их потребностью в O_2 . Вероятно, метаболические изменения, касающиеся процессов аэробного окисления у наркологических больных, создают то микроокружение эритроидных клеток, которое влияет на их программирование с преимущественным образованием фетального гемоглобина. С другой стороны, возможно, в результате хронического употребления ПАВ в некоторых гемопоэтических стволовых клетках возникает трансформация генетических структур, ведущая к изменению интенсивности синтеза фетального гемоглобина.

Таким образом, выявленные изменения концентрации фетального гемоглобина в крови больных алкоголизмом и опийной наркоманией в состоянии острого абстинентного синдрома свидетельствуют о глубокой перестройке окислительно-восстановительных процессов и отражают изменение метаболизма эритроидных клеток, обусловленное функциональными преобразованиями кроветворной системы в ответ на токсическое воздействие психоактивных веществ.

Выводы

1. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина показал его достоверное превышение в крови

больных с наркологической патологией по сравнению с группой контроля.

2. Повышенный уровень фетального гемоглобина в крови больных алкоголизмом и опийной наркоманией может свидетельствовать о развитии гипоксических состояний.

3. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови может применяться в качестве метода ранней диагностики гипоксических состояний у наркологических больных.

Список литературы

1. Валкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. М. Медицина. — 1980.
2. Даштаянц Г.А. — Клиническая гематология // Киев: Здоровье, — 1973. — С.45—72.
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. — Основы патохимии // С.-Пб: Элби-СПб, 2000.
4. Иржак Л.И. Гемоглобины и их свойства. — М.: Наука, 1983. — 150 с.
5. Кривенцев Ю.А., Бисалиева Р.А., Никулина Д.М., Носков А.И. Моделирование нового способа количественного анализа плодового гемоглобина человека // Фундаментальные исследования. — 2007. — № 4. — С.76—78.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. проф. В.В.Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 108—111.
7. Руководство по гематологии / Под ред. А.И.Воробьева, Ю.И. Лорие. — М., 1979.
8. Стародуб Н.Ф., Токарев Ю.Н. Гетерогенная система гемоглобина. Синтез гемоглобина отдельных типов в онтогенезе и при патологии организма // Успехи современной биологии. — 1986. — Т. 101. Вып. 3. — С. 374—389.
9. Тодоров И. — Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София: Медицина и физкультура, 1968. — С. 278—310.
10. Токарев Ю.Н., Ахундова А.Н., Андреева А.П., Левина А.А., Цибульская М.М., Ширинова Э.А. — Иммунохимический метод ряда гемоглобинопатий: Метод. рекомендации ЦНИИ гематологии и переливания крови, Азерб. НИИ гематологии и переливания крови. — Баку: Новая книжная типография, 1982. — 9 с.
11. Топунов, А.Ф., Петрова, Н.Э. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность // Успехи биологической химии. — 2001. — Т. 41. — С. 199—228.
12. Торубарова Н.А. Эмбриональный и фетальный гемопоэз: актуальные вопросы // Гематология и трансфузиология. — 1991. — № 5. — С. 20—24.

BISALIEVA R.A.
KRIVENTSEV Y.A.
BISALIEV R.V.
KALNOI V.S.

assistant of chair biochemistry Astrakhan state medical academy (ASMA)

cand.med.sci., associate professor of chair biochemistry, ASMA

cand.med.sci., deputy of narcological educational, scientific medical the center of the ASMA

the head on scientific work narcological educational, scientific and medical the center of the ASMA

The Article informs on development of the new way immunochemicals quantitative analisys fetal of the haemoglobin in shelters of the person. Happen to the results of such analysis in shelters sick drug addiction, alcoholic dependency and in shelters sound (the checking group). The Organized analysis has shown reliable increasing a level fetal of the haemoglobin in shelters sick drug addiction, alcoholic dependency in contrast with group of the checking.