

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ГЕМОГЛОБИН В КАЧЕСТВЕ КАНЦЕРОЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА

Кривенцев Ю.А.¹, Бисалиева Р.А.¹, Гудинская Н.И.¹, Кривенцева М.Ю.¹, Носков А.И.¹, Онищенко М.С.²

¹ ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru;

² ГБУЗ АО «Патологоанатомическое бюро», Астрахань, e-mail: cpab@mail.ru

Смоделирована моновалентная иммунохимическая тест-система на эмбриональный гемоглобин человека. Разработан и оптимизирован оригинальный диагностический иммунохимический тест на эмбриональный гемоглобин. Новый тест прошел успешную клиническую апробацию на 251 пациенте с миелопролиферативными заболеваниями. Эмбриональный гемоглобин впервые выявлен у пациентов с эритремией ($4,07 \pm 0,23$ мг/л), сублейкемическим миелозом ($3,89 \pm 0,25$ мг/л), острым ($3,71 \pm 0,20$ мг/л) и хроническим ($3,27 \pm 0,19$ мг/л) миелолейкозами ($p < 0,01$). Доказана высокая диагностическая значимость иммунохимического теста на эмбриональный гемоглобин в оценке данной нозологии по всем критериям. К преимуществам предлагаемого теста относятся: высокая чувствительность (порог чувствительности - $4,24 \pm 0,21$ мг/л), специфичность ($p < 0,01$), точность (погрешность менее 2,5%), а также простота инвазивного забора материала, что позволяет применять его в широком скрининг-обследовании групп риска для раннего выявления миелопролиферативных заболеваний.

Ключевые слова: эмбриональный гемоглобин, диагностика, иммунохимия, миелопролиферативные заболевания.

THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE IMMUNOCHEMICAL TEST FOR EMBRYONIC HEMOGLOBIN AS THE CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN

Kriventsev Y.A.¹, Bisaliev R.A.¹, Gudinskaja N.I., Kriventseva M.Y.¹, Noskov A.I.¹, Onicsenko M.S.²

¹ Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: agma@astranet.ru;

² mortem Bureau Astrachan, e-mail: cpab@mail.ru

Modeled monovalent immunochemical test system on human embryonic hemoglobin. Designed and optimized original immunochemical diagnostic test for embryonic hemoglobin. The new test has been successfully clinically tested on 251 patients with myeloproliferative diseases. Embryonic hemoglobin is first identified in patients with erythema ($4,07 \pm 0,23$ mg / l), subleukemic myelosis ($3,89 \pm 0,25$ mg / l), acute ($3,71 \pm 0,20$ mg / l) and chronic ($3,27 \pm 0,19$ mg / l) myelogenous leukemia ($p < 0,01$). It proves the high diagnostic value of the immunochemical test for embryonic hemoglobin in the assessment of the nosology for all criteria. The advantages of this test are: high sensitivity (detection limit - $4,24 \pm 0,21$ mg / l), specificity ($p < 0,01$), accuracy (better than 2.5%), as well as ease of invasive fence material it can be used in a broad screening examination at risk for early detection of myeloproliferative disorders.

Keywords: embryonic hemoglobin, diagnostics, immunochemistry, myeloproliferative diseases.

Гемоглобин является одним из самых изученных белков человеческого организма, исследования которого ведутся уже около 100 лет. Тем не менее один из изоформ гемоглобина - эмбриональный гемоглобин (HbP) - является одним из самых малоизученных белков человеческого организма. Сведения об этом протеине в научной литературе до сих пор крайне скудны. Такой удивительно низкий интерес к этому белку объясняется, на наш взгляд, двумя причинами: а) прикладной фактор: по мнению многих клиницистов, этот хромопротеин не представляет практической (прогностическо-диагностической) ценности,

т.к. его синтез полностью репрессирован у человека после рождения; б) методологический фактор: получение чистого препарата HbP крайне затруднительно из-за сложностей получения биоматериала (этот белок синтезируется только в раннем эмбриогенезе, с 5 по 18 гестации), экстрагирования и очистки белка [2; 5; 6; 10].

Эмбриональный гемоглобин является тетрамером, с молекулярной массой около 65 кДа. Обладает более высоким, чем гемоглобин взрослого, сродством к кислороду. Синтезируется в раннем эмбриогенезе (с 4 по 12 нед), в желточном мешке. Представлен подтипами Говер I (ϵ_4), Говер II ($\alpha_2\epsilon_2$) и др. HbP, как и фетальный гемоглобин, имеет сходные коэффициент седиментации (4,5 S), спектр поглощения и щелочную резистентность, но меньшую электрофоретическую подвижность [1-3; 10].

В данной работе авторы исходили из предположения, что активация ϵ -гена HbP в постнатальном периоде жизни возможна при патологии, связанной с понижением степени дифференцировки, так называемым «омоложением» клеток миелоидного ростка. К таким состояниям можно отнести некоторые онкологические заболевания тканей красного костного мозга, хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ): эритремию, сублейкемический миелоз, а также некоторые миелолейкозы.

Актуальность исследования по данным нозологическим формам очевидна, т.к. ХМПЗ, по-прежнему остаются неизлечимыми у большинства пациентов.

Цель исследования: моделирование иммунохимического теста на эмбриональный гемоглобин человека и оценка его диагностической значимости при хронических миелопролиферативных заболеваниях.

Материалы и методы исследования

Исследуемым материалом служила гепаринизированная кровь больных миелопролиферативными заболеваниями. Сбор биоматериала проводили в гематологическом отделении 1-й областной больницы г. Астрахань. Всего был обследован 251 образец крови (табл. 1).

Таблица 1

Перечень использованного в работе материала

<i>Исследуемый материал (кровь больных)</i>	<i>Количество проб</i>
Эритремия	37
Сублейкемический миелоз	36
Хронический миелолейкоз	77
Острый миелолейкоз	37
Острый и хронический лимфолейкоз	56
Эритроцитоз	8
ВСЕГО	251

Исходным биоматериалом для выделения и очистки НбР служил абортный материал сроком 7-9 недель (отделение неонатологии больницы № 5 г. Астрахань), получаемый с нотариально заверенного письменного согласия пациенток. В ходе фракционирования использовали методы: центрифугирования при 8000 g, методику щелочной денатурации в авторской модификации [9], гель-фильтрацию на сефадексе G-25, (рабочий буфер – 0,05 М фосфатный буферный раствор pH 7,4) и ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-сефадексе G-50 на 0,01 М трис-хлоридном буфере pH 8,1 в градиенте ионной силы.

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

Очищенный препарат НбР использовали для получения моновалентной антисыворотки путем иммунизации кроликов. Иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда по стандартной методике [7]. Контроль специфичности антисывороток на НбР осуществляли методом иммуноэлектрофореза, сопоставлением с антигенными композитами путем радиальной иммунодиффузии (РИД) по Оухтерлони, специфической окраской на гемоглобин гваяколовым методом и др.

Регистрация НбР в изучаемых пробах осуществлялась с помощью самостоятельно разработанного способа восходящей трехэтапной индикации на основе РИД [9].

Оценку диагностической эффективности иммунохимического теста на НбР проводили с расчетом основных ее критериев: диагностической чувствительности, диагностической специфичности, диагностической эффективности, прогностичности положительного и отрицательного результатов (табл. 2) [4].

Таблица 2

Вычисление операционных характеристик при оценке изучаемого теста [4]

<i>Результат применения изучаемого теста</i>	<i>Результат применения референтного теста</i>		<i>Расчетные показатели</i>
	<i>Больные (+)</i>	<i>Здоровые (-)</i>	
Позитивные (+)	A – истинно положительные	B – ложноположительные	Прогностичность положительного результата $PVP=A/(A+B)$
Негативные (-)	C – ложноотрицательные	D – истинно отрицательные	Прогностичность отрицательного результата $PVN=D/(C+D)$
Расчетные показатели	Чувствительность $Se=A/(A+C)$	Специфичность $Sp=D/(B+D)$	

Примечание: *диагностическая эффективность = $Se + Sp/2$*

Для статистического анализа результатов исследования был использован лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft. Inc.) и Excel-2010 (Microsoft). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), среднюю ошибку средней арифметической (m). С целью определения значимости P различий сопоставляемых величин применялся критерий t Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Т.к. в обследуемый спектр нозологии входили заболевания с редкой встречаемостью (эритремия, сублейкемический миелоз, эритроцитоз), если число вариантов в выборке не превышало 20, применяли алгоритмы статистической обработки для малых групп.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе данной работы очищенные препараты HbP, полученные на основе разработанного нами ранее алгоритма фракционирования этого протеина [8; 9], использовали для получения моноспецифической антисыворотки путем иммунизации кроликов.

В результате проведенной работы создана моновалентная иммунохимическая тест-система на HbP, в которой тест-антигеном являлся экстракт тканей эмбриона (сроком гестации от 6 до 9 недель) в рабочем разведении 1/16. Порог чувствительности (ПЧ) тест-системы оказался равным $4,24 \pm 0,21$ мг/л, ($p < 0,01$).

Для количественного анализа HbP смоделирован и апробирован способ восходящей трехэтапной индикации этого белка, включающий: радиальное иммунодиффузионное тестирование (по Оухтерлони в модификации Храмовой и Абелева) в тест-системе с двойным наполнением лунки антисывороткой (ПЧ - $2,14 \pm 0,18$ мг/л); классическое РИД-тестирование (ПЧ - $4,24 \pm 0,21$ мг/л) и титрование в тест-системе в кратных разведениях антигена. В каждом последующем этапе тестировали только пробы, положительно прореагировавшие на предыдущем этапе.

К преимуществам предлагаемого теста относятся:

- высокая чувствительность (порог чувствительности - $4,24 \pm 0,21$ мг/л);
- специфичность ($p < 0,01$);
- точность (погрешность $< 2,5\%$);
- простота инвазивного забора материала: для проведения анализа по предложенной схеме достаточно 0,1 мл крови из пальца, что позволяет применять тест в скрининг-обследовании групп риска для раннего выявления миелопролиферативных заболеваний.

В результате проведенного иммунохимического анализа исследуемого материала получены следующие результаты (табл. 3).

Результаты иммунохимической индикации НбР

<i>Исследуемый материал</i>	<i>n</i>	<i>Процент положительных результатов на НбР</i>	<i>Ср. концентрация НбР у иммунопозитивных пациентов (мг/л)</i>
Здоровые	36	0,0	0,0
Больные эритремией	12	66,67	4,07±0,23
Больные сублейкемическим миелозом	11	36,36	3,89±0,25
Больные хроническим миелолейкозом	22	4,55	3,27±0,19
Больные острым миелолейкозом	9	22,22	3,71±0,20
Больные острым и хроническим лимфолейкозами	17	0,0	0,0

Как видно из приведенных данных, НбР впервые выявлен в крови больных эритремией, сублейкемическим миелозом, острым и хроническим миелолейкозом.

Не отмечено ни одного случая регистрации НбР в крови здоровых доноров (контрольная группа), а также в крови больных гематологическими онкозаболеваниями немиелоидной природы: острыми и хроническими лимфолейкозами (группа сравнения), что объяснимо исходя из цитологической специфики данных опухолей (клетки лимфоидного ряда не способны продуцировать гемоглобин).

Анализ дисперсии по группам и различия между парными выборками (контрольная группа и пациенты с соответствующей патологией), определяемые по критерию Стьюдента (t), оказались статистически значимыми:

- эритремия: коэффициент дисперсии $F=6,8$, коэффициент Стьюдента $t=5,64$; доверительная вероятность ошибки (p) = 0,0005 (при внутригрупповой степени свободы $v_{вну}=34$);

- сублейкемический миелоз: $F=6,2$; $t=3,93$; $p=0,001$ ($v_{вну}=32$);

- острый миелолейкоз: $F=5,6$; $t=3,35$; $p=0,005$ ($v_{вну}=34$);

- хронический миелолейкоз: $F=5,3$; $t=3,24$; $p=0,001$ ($v_{вну}=74$).

Полученные данные согласуются с предложенной версией авторов об активации гена ϵ -протомера (ген НбР) при ХМПЗ, особенно его эритроидной составляющей (эритремия). Результаты свидетельствуют о возможности экспрессии гена ϵ -протомера при снижении дифференцировки клеток эритроцитарного ростка, сопровождающей онкологические заболевания данной ткани. Нулевая выявляемость НбР в крови гематологических больных с онкопатологией неэритроидного генеза (острый и хронический лимфолейкозы) согласуется с приведенной версией.

Полученные результаты свидетельствуют, что эмбриональный гемоглобин может рассматриваться как канцероэмбриональный антиген, иммунохимическая регистрация которого может повысить качество диагностики миелопролиферативных заболеваний.

При анализе диагностической значимости (ДЗ) разработанного иммунохимического теста на эмбриональный гемоглобин использовали альтернативную (качественную) референтную оценку. При этом изучаемую группу делили на 2 части: больные с изучаемой нозологией и здоровые. При сопоставлении результатов применения изучаемого теста с референтными оценками применяли матрицу решений – четырехпольную таблицу (табл. 2) [4].

Как и ожидалось, иммунохимический тест на HbF оказался наиболее чувствительным при выявлении эритремии – 67,78%. Специфичность и прогностичность положительного результата теста по всем нозологическим формам оказались максимальными (100%). Прогностичность отрицательного результата по разным нозологическим формам - от 74,88 до 93,95%. Диагностическая эффективность – от 61,11 до 83,89%.

При анализе результатов оценки качества теста на эмбриональный гемоглобин очевидна несимметричность показателей ДЗ. При хороших значениях чувствительности и прогностичности отрицательного результата (не менее 65%) иммунохимический тест на HbF имеет абсолютные показатели специфичности и прогностичности положительного результата (100%), что является несомненным преимуществом теста и объясняется отсутствием ложноположительных результатов при его применении.

Заключение

На основе самостоятельно полученной специфической иммунохимической тест-системы на эмбриональный гемоглобин смоделирован новый диагностический тест на этот белок. Клиническая апробация теста на 251 пациенте с миелопролиферативными заболеваниями показала его высокую диагностическую значимость в оценке данной нозологии. Несомненна практическая ценность разработанного теста, т.к. благодаря его преимуществам: высокой чувствительности, специфичности, точности и простоте забора материала, перспективно применение теста в скрининг-обследовании групп риска для раннего выявления миелопролиферативных заболеваний.

Список литературы

1. Бахмутова Л.А. Клиническое значение изучения антенатальных типов гемоглобина для прогноза ранней адаптации у недоношенных новорожденных детей / Л.А. Бахмутова,

Д.М. Никулина, Ю.А. Кривенцев // Вопросы современной педиатрии. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 120-122.

2. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 33-38.

3. Бойко О.В. Биохимические и иммунологические маркеры в диагностике патологических состояний / О.В. Бойко, А.Х. Ахминеева, Н.И. Гудинская, В.И. Бойко, Д.М. Козак, В.А. Бендюг // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9-3. – С. 327-329.

4. Власов В.В. Эффективность диагностических исследований. – М. : Медицина, 1988. – 36 с.

5. Гаранина Е.Н. Качество лабораторного анализа. Факторы, критерии и методы оценки. – М. : Лабинформ, 1997. – С. 16-18.

6. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб. : Элби-СПб, 2000. – 182 с.

7. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник. – СПб., 1998. – Т. 1. – 144 с.

8. Касьянова Т.Р. Диагностическое значение определения фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени / Т.Р. Касьянова, Б.Н. Левитан, Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10-3. – С. 505-508.

9. Кривенцев Ю.А. Новый способ клинической оценки гемоглобинового спектра / Ю.А. Кривенцев, Р.А. Бисалиева, Л.М. Ишмемедова, А.И. Носков, М.В. Рамазанов // Сибирский медицинский журнал [Иркутск]. – 2011. – Т. 102, № 3. – С. 52-54.

10. 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.