

На правах рукописи

Рамазанов Магомед Валединович

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ БИОХИМИЧЕСКОЕ И
ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТКАНЕВЫХ И
СЫВОРОТОЧНЫХ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ**

03.01.04 - биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Казань 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития (ГБОУ ВПО АГМА Минздравсоцразвития России)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Никулина Дина Максимовна

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор Сентюрова Людмила Георгиевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Ерлыкина Елена Ивановна, зав. кафедрой ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России;

доктор медицинских наук, профессор Мустафин Ильшат Ганиевич, зав. кафедрой ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ (ГБОУ ВПО «СамГМУ» Минздравсоцразвития России)

Защита состоится « 15» ноября 2012 г. в 13.00 ч на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации (420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18. тел.: (843)233-78-67), Факс: (843) 238-76-01)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (420008, Казань, ул.Кремлевская, д.35)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Железо, уникальный химический элемент, относится к разряду так называемых «облигатных биометаллов», крайне важных для нормального функционирования практически любых живых систем. Все железо организма находится в связанном состоянии, в комплексе с важнейшими металлопротеинами, и обеспечивает функционирование более сотни белков с различными функциями (А.А. Булганов и совт., 1991; И.П. Лубянова, 2010; J.Halliday, 1984; T. Goswami, 2002; M.W. Hentze, 2004).

К настоящему времени накоплена объемная информация о свойствах и метаболизме железа и, в меньшей степени, о железосодержащих белках в организме человека. Интересным фактом является описание их как острофазовых белков (БОФ), тем более что широко применяемые в современной медицинской практике тесты на БОФ не всегда полно отражают характер и течение воспалительного процесса из-за ограниченности перечня коммерческих наборов на БОФ и недостаточной изученности их поведения при многих нозологических формах, особенно при хирургических заболеваниях (Г.А.Трубников и др., 1975-1991; Д.М. Никулина и совт., 1980-2009; А.А. Николаев и соавт., 1985-2009; В.А. Алешкин и соавт., 1988; Сухарев А.Е., 1991; П.Г. Назаров, 2000; Э. А. Кчибеков Э. А., 2006-2011 и др.).

Изменение продукции лактоферрина (Лф) и ферритина (Ф), а также обмена железа как реакции организма на острые и хронические воспалительные заболевания является одним из ключевых регуляторов защитных функций организма и медиаторов взаимодействия нервной и иммунной систем (А.А. Левина и соавт, 1991; Е.А.Лукина и соавт., 1992; V.W. Beljaars at al., 2001; A. Nozaki at al., 2003; M.Viejo-Diaz, 2004 и др.). По мнению американского исследователя E. Weinberg (1996), удержание железа, Лф и трансферрина (Тф) во внутренней среде организма является одним из ведущих механизмов его защиты от инфекций и опухолевого роста. Вероятно, недостаток легкодоступного Fe в организме носителя угнетает рост микроорганизмов. В клиническом плане наиболее изученным и востребованным

в лабораторной диагностике является термостабильный межорганный белок Ф (Я.И. Мельникова и соавт, 1993; Y. Deugnier at al., 1998; K. Orino at al., 2001; F.M. Torti, S.V.Torti, 2002).

В течение последнего десятилетия интенсивно растет число публикаций об изменениях при воспалении концентраций в крови иммуномодулирующих цитокинов и других биологически активных веществ. Однако количественного определения содержания цитокинов при развитии инфекционных процессов недостаточно для оценки течения воспалительного процесса (Н.М. Бережная, 2000; А.С. Симбирцев, 2010; L. DeVita at al., 2006).

На сегодняшний день не существует полной и окончательной схемы взаимосвязи различных компонентов, влияющих на метаболизм железа и железосодержащих белков. Возможно, провоспалительные цитокины стимулируют синтез ЛФ, который связывает Fe с большей аффинностью, чем Тф. Железо, связанное с ЛФ, поглощается макрофагами и хранится в виде тканевого Ф или передается непосредственно на сывороточный Ф, тем самым снижая доступ Fe к бактериальным клеткам и способствуя этим ограничению их жизнедеятельности (А.М. Белоус, А.Т. Конник, 1991; E. Kemna at al., 2005; N. V. Nguyen at al., 2006).

Таким образом, комплексная оценка продукции ферропротеинов в биологических и патологических жидкостях, анализ их диагностической значимости в сравнении с другими БОФ, разработка и внедрение в клиническую практику диагностических иммунохимических алгоритмов выявления и оценки деструктивно-воспалительных состояний актуально и целесообразно, так как позволит оптимизировать диагностику, мониторинг и оценку качества лечения воспалительных заболеваний, в том числе острых гнойных процессов в хирургии.

Цель исследования: получить дополнительные сведения по распределению и локализации железосодержащих белков в биологических жидкостях и тканях органов человека для повышения их диагностического потенциала при воспалительных и деструктивных процессах.

Задачи исследования:

1. Оптимизировать способы выделения и очистки ферритина и лактоферрина
2. Смоделировать иммунохимические тест-системы на ферритин и лактоферрин
3. Провести количественный анализ ферритина и лактоферрина в биологических жидкостях и тканях человека
4. Определить локализацию ферритина в клетках здоровых и патологически измененных тканях органов человека
5. Изучить клинико-диагностическое значение иммунохимических тест-систем на ферритин и лактоферрин в сравнении с другими БОФ при воспалительных заболеваниях органов брюшной полости

Научная новизна исследования. Разработаны и апробированы алгоритмы выделения и очистки Ф и Лф и сконструированы соответствующие моноспецифические иммунодиффузионные тест-системы.

Методом иммунофлюоресценции с помощью самостоятельно полученной антисыворотки выявлены различия в локализации Ф в структурах клеток тканей (печень, почка).

Количественный иммуноферментный анализ Ф и Лф в биологических жидкостях и тканях здорового человека и пациентов с воспалительными заболеваниями органов брюшной полости показал диагностическую ценность Ф и Лф как маркеров острого деструктивного процесса.

Практическая значимость работы. Разработаны и запатентованы новые способы диагностики и оценки течения острого деструктивного воспалительного процесса по результатам иммунохимической индикации ферропротеинов, отличающиеся достоверным выявлением не только манифестных, но и латентных деструктивных состояний. Предложенные алгоритмы очистки ферропротеинов и конструирования специфических иммунохимических тест-систем позволяют получать при экономии исходного биоматериала и реагентов компоненты для соответствующих тест-систем, как для научного исследования, так и для практического применения.

Основные положения, выносимые на защиту

Разработаны и апробированы оригинальные алгоритмы выделения и очистки Ф и Лф и сконструированы соответствующие специфические иммунодиффузионные тест-системы. При этом выявлена зависимость белкового спектра термостабильных тканевых экстрактов органов человека от температурного режима и органной принадлежности.

С помощью самостоятельно полученных антисывороток проведен методом РИД по Манчини анализ Ф в экстрактах тканей органов человека, показавший незначительные количественные различия, а методом иммунофлюоресценции выявлены различия в локализации Ф в структурах тканей печени и почки.

Показана диагностическая ценность Ф и Лф как маркеров острого деструктивного процесса. Полученные результаты доказывают, что ферропротеины являются надежными маркерами острого воспалительно-деструктивного процесса наряду с другими, в том числе классическими, белками острой фазы.

Предложен новый способ диагностики и оценки течения острого воспалительного-деструктивного процесса на основе оценки результатов иммунохимической индикации ферропротеинов, отличающийся достоверностью в диагностике не только явных, но и латентных деструктивных состояний.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на: международных научно-практических конференциях «Достижение фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины», Астрахань (2008, 2010, 2011); международной научной конференции студентов и молодых ученых ОГМУ, Одесса (2009); 4-й международной Пироговской научной медицинской конференции РГМУ, Москва, 2010; Астраханской областной конференции молодых ученых (на секциях: биология и экология; медицина и фармация), 2010; региональной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых – вклад в инновационное развитие России», 2011; Всероссийской конференции с международным участием «Профилактическая медицина - 2011», СПб. - 2011; Online конференции молодых ученых

«Охрана здоровья населения промышленных территорий», Пермь, 2011.

В законченном виде диссертационная работа обсуждена на межкафедральной конференции ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России 27.01.2012 г.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 17 научных работ общим объемом 24 страницы, в том числе 3 из них в рецензируемых научных изданиях, и 2 патента на изобретение.

Структура и объем работы: Диссертация изложена на 145 страницах, состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы. Иллюстративный материал представлен 21 таблицей, 31 рисунком. Библиография включает в себя 123 отечественных и 118 зарубежных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

В ходе работы для достижения цели были выполнены все поставленные задачи в шесть соответствующих этапов. Каждый последующий этап являлся логическим продолжением предыдущего.

Выполненное исследование содержит экспериментальную и лабораторную часть. В работе был использован биоматериал для выделения и очистки изучаемых белков, лабораторные реагенты и образцы биологических жидкостей больных для клинико-лабораторной части (таб. 1).

Для оптимизации способов выделения и очистки изучаемых белков были использованы методы фракционирования белков, применяемые как в классических вариантах, так и модифицированных в ходе работы. Проведено 1369 исследований с использованием биохимических (центрифугирование, солевое осаждение, диализ, концентрирование, аналитический электрофорез, электрофорез в ПААГ, гель-фильтрация, ИХ и др.), иммунохимических (ИДА по Оухтерлони, РИД по Манчини, иммуноэлектрофорез, ракетный иммуноэлектрофорез, иммунопроявление в ПААГ, реакция иммунофлюоресценции, истощение антисывороток и др.) и гистохимических методов.

Перечень использованного в работе материала

Материал	Число образцов
Ткани	
Желчный пузырь	27
Печень	54
Почка	40
Плацента	40
Женское молоко	12
Сыворотка крови больных:	
острым гангренозным аппендицитом	53
острым флегмонозным аппендицитом	48
перитонитом	77
перфоративной язвой	44
флегмонозным холециститом	30
гангренозным холециститом	36
Экссудаты больных:	
острым гангренозным аппендицитом	52
острым флегмонозным аппендицитом	36
перитонитом	21
перфоративной язвой желудка	44
флегмонозным холециститом	22
гангренозным холециститом	28
Итого	664

Статистический анализ результатов исследования проведен согласно руководствам по медицинской статистике с применением современных методов виртуального математического анализа, а именно, с использованием программ «STATISTICA 6.0 for Windows» фирм «Stat Soft, Inc.» и «Microsoft Office Excel 2003».

Результаты исследования

Для выбора оптимального исходного материала выделения и очистки ферритина экстракты тканей подвергали воздействию температур в пределах 70–95⁰С в экспозиции 15-20 мин (рис. 1).

Окрашивание на негемовое железо показало наличие железосодержащих белков в термостабильных фракциях практически во всех исследованных образцах. Наличие Ф, обладающего электрофоретической подвижностью альфа2-глобулинов, во фракциях определяли ме-

тодом иммунодиффузии в агаре со стандартной тест-системой на Φ , количество Φ во фракциях определяли иммунодиффузионным титрованием в агаре.

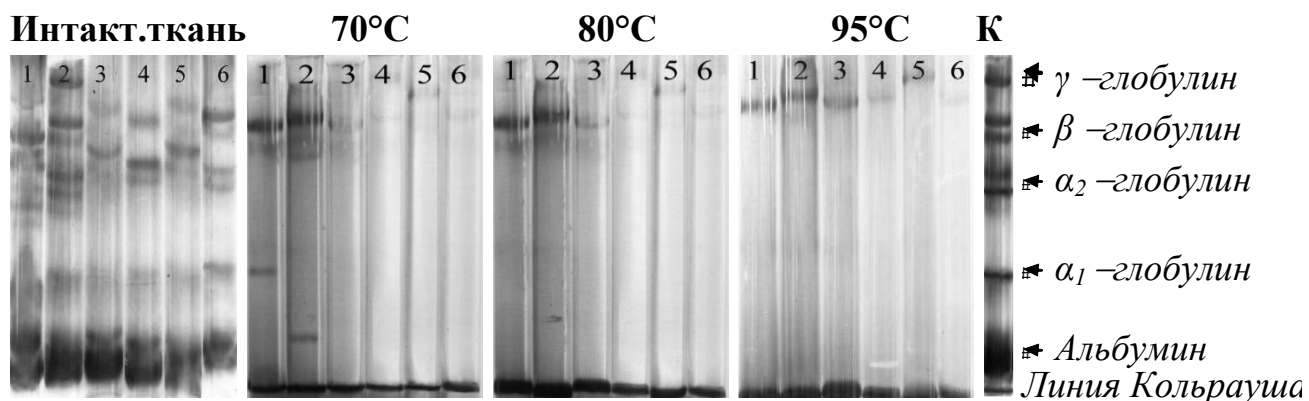


Рис 1. Спектр термостабильных белков в тканях при нагревании в температурном режиме от 70 до 95°C. Контроль – нативные экстракты. 1 Плацента, 2.Печень, 3.Почка, 4.Поджелудочная железа, 5.Селезенка, 6.Мозг. К. сыворотка крови доноров

По результатам эмпирического подбора в качестве исходного биоматериала, для выделения и очистки Φ нами была определена плацента. Преимущества выбора исходного биологического материала являлась доступность, ткань получают не после смерти, а в ходе запланированных родов и эффективность обусловлена высоким удельным содержанием Φ .

При выделении и очистке исследуемых протеинов преследовали цель разработать оптимальный алгоритм получения чистых препаратов на основе известных биохимических способов (табл. 2, 3).

Таблица 2

Качество препаратов на этапах выделения ферритина из плаценты

Основные этапы выделения	Объем, мл	Об.белок, мкг/мл	Кол-во Φ , мкг/мл	Целевой Продукт, %	Степень очистки (раз)	Выход (%)
Гомогенизирование	48000	11700	32,3	0,27	1	100
Терм. обр-ка, 90°C, и центрифуг-е (надосад)	20600	104	60,4	63	233	85
Ионообмен. хромат-я, QAE-sephadex A-50	200	6398	6046	89	328	78

Способ выделения и очистки Φ оказался эффективным по большинству характеристических параметров и по результатам аналитического электрофореза (рис.2).

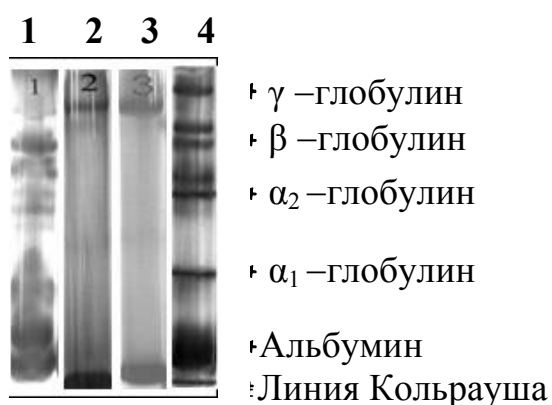


Рис. 2. Анализ чистоты полученного препарата Ф методом электрофореза в ПААГ

1. – Гомогенат плаценты; 2. - Препарат после термической обработки при 90°C в течение 15 мин; 3. - Очищенный препарат ферритина после ионообменной хроматографии на QAE-sephadex A-50; 4.– Сыворотка донора (контроль)

В таблице 3 представлена схема выделения Лф и характеристика полученного очищенного препарата.

Таблица 3

Анализ качества выделения и очистки лактоферрина

Основные этапы выделения	Объем, мл	Об.белок, мкг/мл	Концент-я Лф, мкг/мл	Целевой продукт, %	Степень очистки	Выход (%)
Женское молоко	3000	43600±132	3280±56	7,5	1	100
Осаждение 30% (NH ₄) ₂ SO ₄	150	238545±57	52480±43	22	3	80
Обессоливание	500	47020±640	8934±114	21	2,8	56
Ионообм. хроматография, КМ С 50	400	10092±303	6432±220	64	8,5	47

Результаты электрофоретического анализа (рис. 3) свидетельствуют о неполной очистке Лф, что по сравнению с предыдущим результатом представляется совершенно логичным, так как разделять нативные белки между собой сложнее, нежели отделить денатурированные балластные белки (основная масса) от сохранившего нативные свойства.

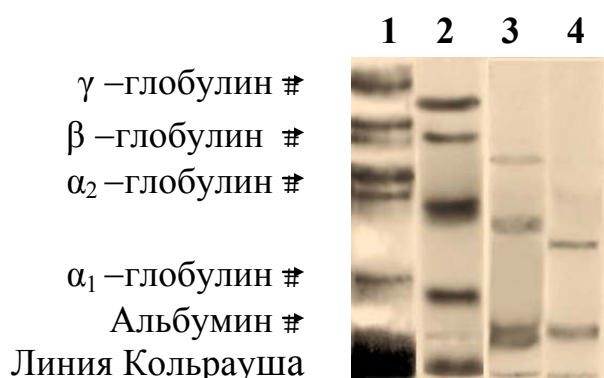


Рис. 3. Анализ чистоты полученного препарата Лф, электрофорез в ПААГ

1. – Сыворотка крови донора (контроль); 2. – Женское грудное молоко; 3. – Препарат после высаливания; 4. – полуочищенный препарат лактоферрина

Статистический анализ результатов серии опытов показал достаточную степень чистоты Ф и Лф (рис. 4) для последующей иммунизации лабораторных животных.

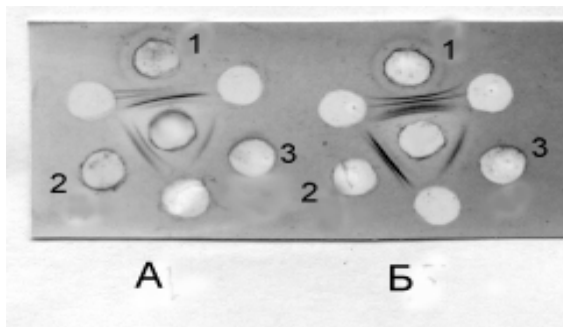


Рис. 4. Контроль чистоты полученных белковых фракций Ф (А) и Лф (Б) методом иммунопреципитации

В центральных лунках - поливалентная антисыворотка на белки сыворотки крови человека; в лунках 1, 2- фракции последовательных этапов выделения, 3 - очищенный Ф (А) и полуочищенный Лф (Б). В остальных лунках – физиологический раствор

На втором этапе с целью получения специфических антисывороток на Ф и Лф подвергали иммунизации кроликов-акселератов весом 3-4 кг. Антигены (хроматографические фракции) с полным адьювантом Фрейнда вводили под кожу и внутримышечно дробными возрастающими дозами (4 до 20 мг белка) в течение месяца. Забор крови производили на 7-9 сутки после заключительной инъекции. После освобождения от форменных элементов крови и фибринового сгустка антисыворотки при необходимости истощали белками лиофилизированной плазмы крови человека (очистка от балластных антител).

Контроль качества полученных антисывороток осуществляли иммунохимическим сопоставлением с исходным материалом и контрольными белками, который показал, что исследуемая антисыворотка на Ф давала линии преципитации только с экстрактом тканей плаценты и очищенным препаратом Ф, а полученные антисыворотки на Лф положительно преципитировали с препаратом ЛФ. В обоих случаях отмечали положительное окрашивание линий преципитации на железо.

В лабораторной медицине для количественного выявления Ф и Лф имеются коммерческие ИФА наборы, что не исключает разработку более простых и дешевых методов для многоцелевых научных исследований.

Наличие препаратов исследуемых белков и антисывороток к ним, как исходных компонентов, позволило нам смоделировать специфические иммунодиффузионные тест-системы на Ф и Лф, послужившие основой для реализации третьего этапа работы: количественного анализа изучаемых белков в биологических жидкостях и тканях человека. Для выявления ферропротеинов в экстрактах тканей в качестве методической основы выбрали радиальную иммунодиффузию по Манчини и соавт. в модификации Фехей и Мак-Келви (рис. 5).

Для формирования алгоритма количественного анализа Ф и Лф по данной методике для каждого из белков были стандартизированы оптимальные параметры методики: рабочая концентрация антисыворотки, рабочие разведения стандартных образцов, специфическое окрашивание препарата. По данным статистической обработки результатов серии экспериментов были построены стандартные калибровочные графики для количественного определения Ф и Лф с порогом чувствительности 3 и 3,6 мкг/мл.

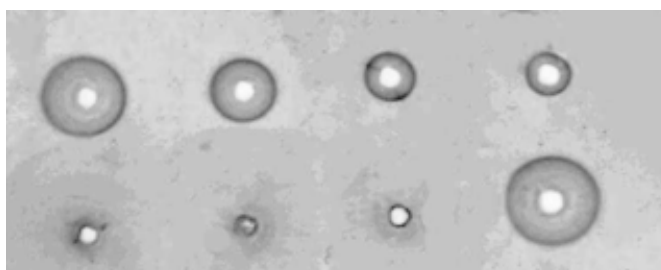


Рис. 5. Радиальная иммунодиффузия по Манчини на Ф

Верхний ряд - титрование стандартного антигена для моделирования калибровочной кривой

Нижний ряд – регистрация искомого антигена в исследуемых пробах

На четвертом этапе, на статистически значимой выборке, проведен клинический анализ содержания Ф, Лф и железа в биологических жидкостях (сыворотка крови и перитонеальный экссудат) при широком перечне нозологических форм: острый и хронический холецистит, осложненный аппендицит, распространенный перитонит, перфоративная язва желудка (табл. 4,5). Главным мотивом в выборе заболеваний являлись острота процесса и деструктивная составляющая.

Для работы с клиническим материалом применяли коммерческие

ИФА тест-системы на Ф и Лф (ИФА анализатор Hoffman La Roche). Кроме того, для сравнительного анализа результатов лабораторного исследования на Ф и Лф проводили определение других БОФ с использованием моновалентных иммунохимических тест-систем на СБАГ и на МГ, разработанных сотрудниками лаборатории кафедры биохимии с курсом КЛД АГМА, и коммерческого набора на С-реактивный белок (СРБ), индикацию которого проводили методом ИДА.

Количественный иммунохимический анализ Ф, Лф, МГ, СБАГ и СРБ по всем названным формам показал идентичную картину их присутствия: уровень железа и ферропротеинов (Ф и Лф) в сыворотке крови при остром холецистите, осложненных аппендицитах, остром распространенном перитоните, перфоративной язве был достоверно повышен относительно группы контроля в разы, а уровень СРБ и СБАГ в некоторых случаях повышен на порядок или в десятки раз.

Как видно по данным, представленным в таблице 4, развитие ХХ сопровождается понижением уровня Ф в сыворотке крови. Так, у больных с пролонгированным течением ХХ исходный уровень Ф в сыворотке был на нижней границе нормы. Отмеченное нами снижение уровня сывороточного железа у больных ХХ согласуется с литературными данными. Низкий уровень сывороточного железа, отмечаемый в условиях воспаления, по-видимому, объясняется эффектами провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6, индуцирующих функциональный железodefицит.

Возможно, что функционально родственные белки (Ф и Лф) выступают в роли индикаторов воспалительного процесса, то есть, относятся к позитивным БОФ. Такая однозначная тенденция доказывает диагностическую ценность изучаемых белков как маркеров острого и хронического воспалительного процесса. Усиление продукции Ф и Лф имело косвенное подтверждение фактом параллельного повышения сывороточного железа.

Определение железа и БОФ в сыворотке больных воспалительно-деструктивными заболеваниями органов брюшной полости

Показатель	ХХ	ОХ	ОГА	ОФА	ПЯ	ОРП	Контр.
n	19	18	22	18	17	19	20
Железо (ммоль/л)	7.7±3	68±13*	84±3,6*	78±7,6*	58±4,3*	86±16*	13,5±4
Ф (нг/мл)	59,2±7	296±33*	248±22*	348±34*	277±26*	418,5±70*	120±20
Лф (нг/мл)	2828±308*	1284±149	1246±302	2768±325*	1716±124	2753±414*	1113±98
СРБ (мкг/мл)	–	–	37±4*	37±3,3*	48±5,6*	121±11,4*	2,5±0,5
СБАГ (мкг/мл)	–	–	15±1,6*	12±1,1*	8,5±0,8*	18±3*	1,8±0,3
МГ (мкг/мл)	–	–	287±34*	226±20*	445±16*	287±68*	38±3
ТФ (мкг/мл)	–	–	–	–	–	830±124*	2479±600

Примечание. *- достоверные (начиная с $p < 0,05$) различия с контрольной группой доноров

Одновременно отмечены более высокие концентрации Ф и Лф в экссудатах по сравнению с аналогичными параметрами в сыворотке крови по всем вышеперечисленным нозологиям (табл. 5, рис.6).

Определение БОФ в экссудатах больных с воспалительно-деструктивными заболеваниями органов брюшной полости

Диаг-ноз	n	Ф (нг/мл)	Лф (нг/мл)	СРБ (мкг/мл)	СБАГ (мкг/мл)	МГ (мкг/мл)
ОХ	15	700±215*	10000±600*	-	-	-
ОГА	20	719±42,4*	10335±60,9*	37,8±4,3	14,1±1,7	238±15
ОФА	18	548±79,5*	10809±570*	34,3±4,8	9,9±0,9	313,3±5,5
ПЯ	17	578±4,3*	12280±565*	132±7,6*	9,0±1,5	137,1±15*
ОРП	22	1173±79*	11643±680*	84,7±11,7*	15,6±3,2	110±13,4
Всего	92					

Примечание. *- достоверные (начиная с $p < 0,05$) различия с сывороточным уровнем в аналогичной группе больных

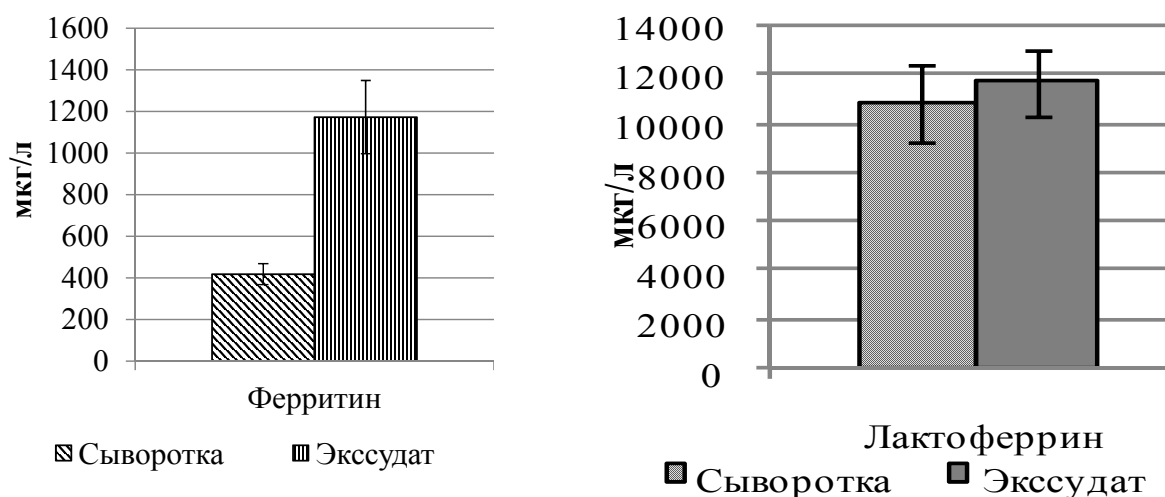


Рис. 6. Соотношение уровня ферритина и лактоферрина в сыворотке крови и эксудате больных при остром распространенном перитоните

Выявлена высокая прямая корреляция между уровнем СФ и Лф ($r=0,92$) и обратная корреляция, между Тф и Ф, Тф и Лф ($r=-0,96$; $r=-0,94$ соответственно) (рис. 7).

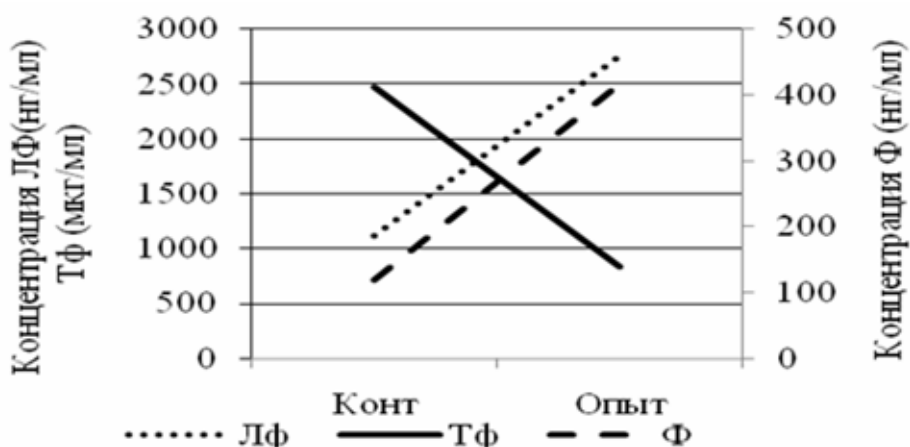


Рис. 7. Корреляция между уровнями ТФ, Ф и Лф при ОРП

По другим, в том числе классическим, БОФ (белки сравнения) картина не столь однозначна: при перфоративной язве желудка наблюдается безусловное превышение уровней эксудативных СРБ и СБАГ над сывороточными, тогда как уровень МГ в сыворотке крови больных был значительно выше, чем в эксудате.

При остром гангренозном, остром флегмонозном аппендиците и остром распространенном перитоните между уровнем СРБ, СБАГ и

МГ в сыворотке крови больных и аналогичными показателями в экссудате достоверных различий обнаружено не было.

Динамика изменения уровня пяти изученных нами БОФ в крови и экссудате больных имеет свои особенности для каждого белка и свидетельствует о специфической роли каждого из них в патогенезе острых воспалительных заболеваний органов брюшной полости. Сравнительный анализ полученных результатов доказывает, что ферропротеины (Ф и Лф) являются не менее надежными маркерами острого деструктивного процесса, чем известные БОФ, например, СРБ. Этот факт позволил завершить заключительный этап предпринятого исследования созданием нового способа диагностики и оценки течения острого деструктивного процесса в хирургической патологии.

На основании установленной достоверной связи уровня тканевого Ф со степенью остроты процесса разработан способ дифференциальной диагностики и оценки течения острого деструктивного процесса в желчном пузыре, составивший суть патента на изобретение.

Статистическая оценка предлагаемых иммунохимических тестов на Ф и Лф показала высокие значения их чувствительности, специфичности, диагностической эффективности, прогностичности положительного и отрицательного результатов (все значения выше 85%) по всем исследуемым референтным диагнозам.

Следует отметить, что оценку диагностической значимости предлагаемых тестов проводили только по значениям сывороточных Ф и Лф. Высокие концентрации этих белков в перитонеальном экссудате еще более подтверждают их принадлежность к БОФ.

Для определения места локализации и предполагаемого синтеза Ф использовали гистологические препараты из тканей здоровых (аутопсийный материал от лиц, погибших в результате случайных причин) и патологически измененных тканей (операционный материал).

Известно, что Ф синтезируется в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Поэтому нами в первую очередь была исследована печень, так как именно клетки Купфера являются звеном ретикулоэндотелиальной системы. Клетки Купфера отчетливо выявляются на гистологических срезах при окраске гематоксилином и эозином (рис.8).

Исследование содержания и распределения Φ в тканях печени в норме, при холецистите и раке печени проведено иммунофлюоресцентным методом с использованием самостоятельно полученной антисыворотки (рис. 9-11).

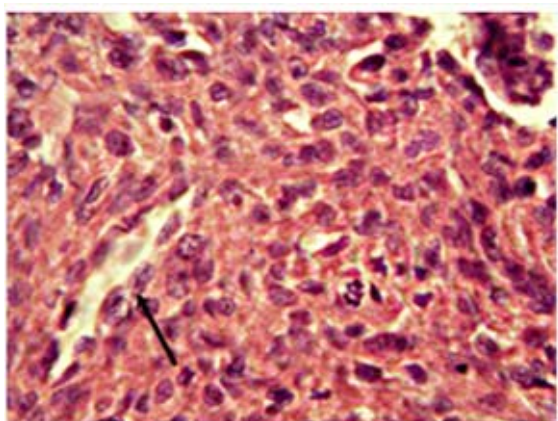


Рис. 8. Срез здоровой печени человека (стандарт). Окраска гематоксином и эозином. Клетка Купфера показана стрелкой 1:700



Рис. 9. Контроль РИФ на ферритин здоровой печени, 1:700

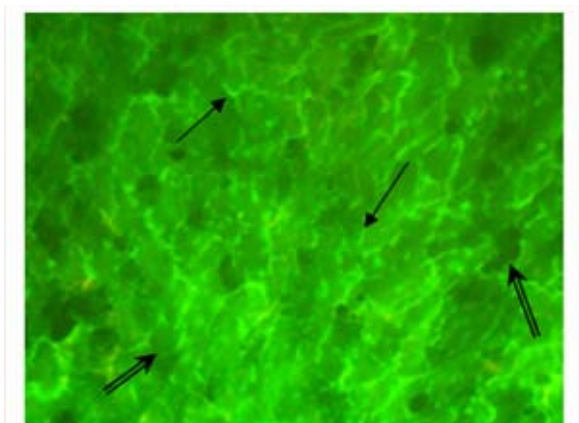


Рис. 10. Срез печени при холецистите. Усиление РИФ на ферритин в межклеточном пространстве. Двойными стрелками указаны клетки Купфера 1:700

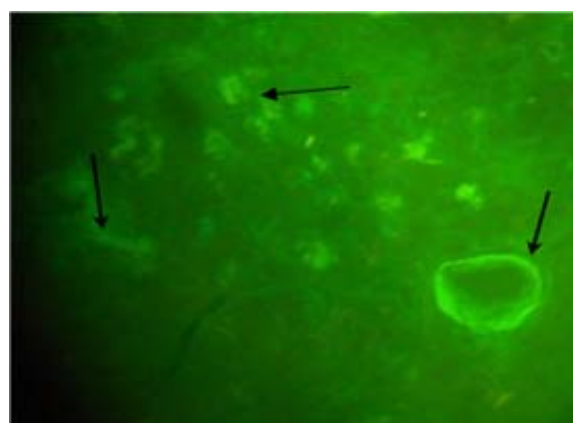


Рис. 11. Срез тканей при раке печени. Реакция РИФ на ферритин в стенке сосудов (вена и синусоидные капилляры), 1:700

Результаты исследования показали, что при возникновении воспалительного процесса в желчеотводящих путях или в желчном пузыре реакция РИФ на Φ усиливается. Изменение структуры клеток при гепатоме приводит к заметному изменению топографии РИФ на ферритин в паренхиме печени. Особенно следует отметить отложение Φ в стенке сосудов (вена и синусоидные капилляры).

Изучение распределения Ф в тканях почки (рис. 13-16) объясняется экскреторной функцией этого органа.

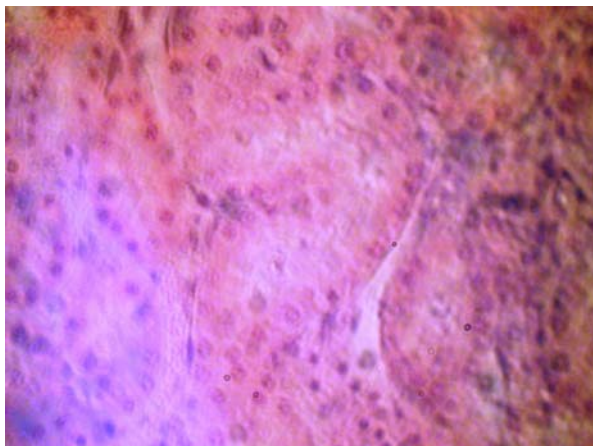


Рис.12. Срез здоровой почки
Окраска гематоксилином и эозином,
:700

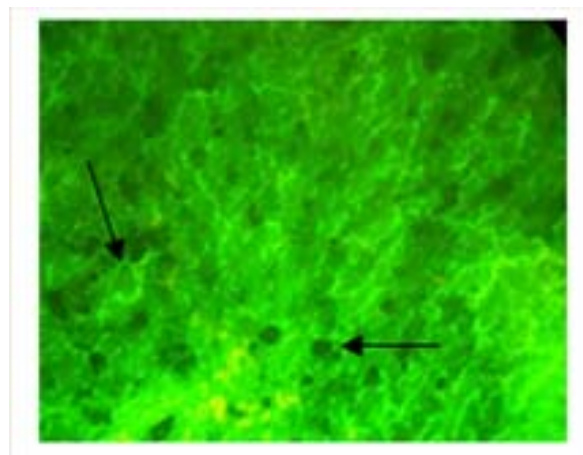


Рис. 13. Срез почки. Кортикальное вещество Стрелками обозначены сосудистые клубочки нефрона, 1:700

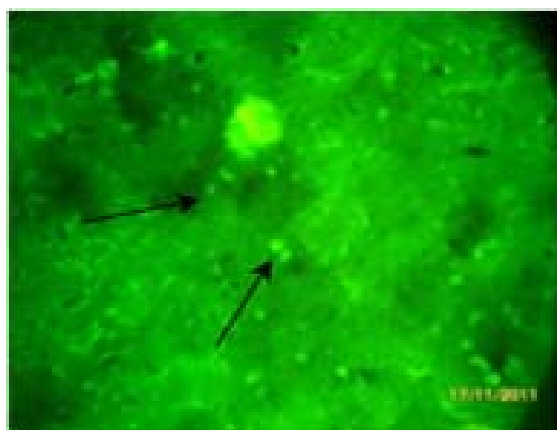


Рис.15. Срез почки. Пиелонефрит
Реакция РИФ на ферритин,
1: 700

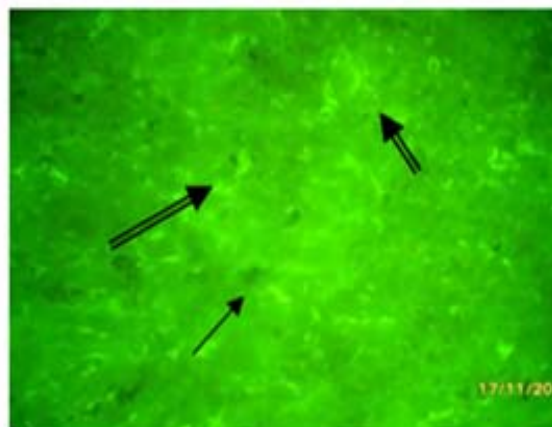


Рис.16. Срез почки при раке
РИФ на Ф в сосудистых клубочках (показано стрелками) и в стенке канальцев нефрона в виде глыбок (показано двойными стрелками) 1:700

Почка вовлекается в общий процесс организма при развитии даже ограниченного очага воспаления вне зависимости от его локализации и испытывающего повышенную нагрузку. Исследование топографии Ф в структурах неизменной почки показало, что методом иммунофлюоресценции ферритин определяется по периметру сосудистых клубочков. Мембраны практически не дают реакции на Ф. При процессе воспаления (пиелонефрит) наблюдается отложение

ферритина в стенках канальцев, что может быть следствием выраженного деструктивного процесса в корковом веществе почки.

Анализ распределения Ф в почке, пораженной онкологическим процессом, выявил изменение его топографии в органе: ферритин обнаружен в сосудистых клубочках и в стенке канальцев нефрона в виде глыбок.

Таким образом, при исследовании ферритина в печени методом реакции иммунофлюоресценции установлено, что при воспалительных процессах РИФ усиливается в межклеточном пространстве, при онкопатологии - в стенках сосудов, в том числе синусоидных капилляров.

В почке методом РИФ в норме этот белок выявляется в виде равномерного свечения сосудистых клубочков. Воспалительный процесс способствует отложению ферритина в стенках канальцев, а онкопроцесс дает специфическую картину свечения: РИФ можно наблюдать в краевой зоне сосудистых клубочков в виде гранулярных образований в стенках извитых канальцев нефрона.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и апробированы способы выделения и очистки ферритина и лактоферрина, позволившие получить препараты с их высоким содержанием в конечном продукте (89% и 64% соответственно), которые могут быть использованы в качестве антигенов для приготовления моноспецифических антисывороток на эти белки.
2. Сконструированы иммунодиффузионные тест-системы на ферритин и лактоферрин с порогом чувствительности $3 \pm 0,34$ (Ф) и $3,6 \pm 0,31$ (Лф) мкг/мл. как технически и финансово доступные методы выявления этих антигенов в различных объектах при научных и клинических исследованиях.
3. Сформированы и успешно апробированы алгоритмы количественного анализа ферритина и лактоферрина в биологических объектах на основе метода радиальной иммунодиффузии по Манчини.

4. Методом иммунофлюоресценции с помощью самостоятельно полученной антисыворотки выявлены различия в локализации ферритина в структурах клеток тканей печени и почки.
5. Доказана диагностическая ценность ферритина и лактоферрина как маркеров острого деструктивного процесса на основании достоверного повышения их уровня в сыворотке крови и экссудатах больных с острым холециститом, осложненным аппендицитом, острым распространенным перитонитом и перфоративной язвой.
6. Показано, что ферропротеины являются надежными маркерами воспалительного процесса наряду с другими, в том числе классическими, белками острой фазы. При этом их выявление отличается достоверностью в диагностике не только явных, но и латентных деструктивных состояний.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При очистке Ф рекомендуется использовать сочетание методов гомогенизации и тепловой денатурации с ИХ на QAEсефадекс А-50 в восходящем градиенте ионной силы. При очистке Лф рекомендуется последовательное двухступенчатое высаливание сульфатом аммония: до 25% и 50% насыщенности. В качестве окончательного этапа очистки Лф рекомендуется ИХ на DEAEсефадекс А-50 в восходящем градиенте ионной силы.
2. При получении антисывороток на Ф и Лф рекомендуется использовать высокоочищенные препараты этих белков с последующим ее истощением лиофилизированной плазмой на Bio-Gel 300.
3. Внедрить в лаборатории хирургических клиник и отделений способ иммунохимического количественного определения Ф и Лф и разработанные балльные критерии оценки как дополнительный показатель острого деструктивного процесса. При применении названных методов определения ферропротеинов пользоваться смоделированными калибровочными графиками.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Рамазанов М.В. Анализ корреляции ферропротеинов при распространённом перитоните / М.В. Рамазанов, Е.В. Бутырина, Э.А. Кчибеков // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – №1 – С.256-258. (перечень ВАК) автора – 0,75 пл.
2. Рамазанов М.В. Ферропротеины при вентральной патологии / М.В. Рамазанов, Э.А. Кчибеков, Д.М. Никулина // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – №2. - С.232–233. (перечень ВАК) автора – 0,5 пл.
3. Рамазанов М.В. Новый способ очистки ферритина / М.В. Рамазанов, Ю.А. Кривенцев, Е.А. Гребнева, А.И.Носков// Астраханский медицинский журнал.- Астрахань –2011. – Т.6, –№3. – С. 245-247. автора – 0,5 пл (перечень ВАК) автора – 0,5 пл.
4. Кривенцев Ю.А. Новый способ клинической оценки гемоглобинового спектра / Ю.А. Кривенцев, Р.А. Бисалиева, **М.В.Рамазанов**, Л.М. Ишмамедова, А.И Носков // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск. – 2011. - №3. – С.52-54.(перечень ВАК) автора – 0,25 пл
5. Кчибеков Э.А. Иммунохимический способ диагностики деструктивных форм острого холецистита / Э.А. Кчибеков, **М.В. Рамазанов** // Труды Астраханской государственной медицинской академии. – Астрахань – 2009. – Т. 40, – С 72–73. автора – 0,5 пл.
6. Кчибеков Э.А. Сравнительная характеристика железосодержащих белков в эктомированных желчных пузырях больных острым холециститом / Э.А. Кчибеков, **М.В. Рамазанов** // Тезисы международной научной конференции студентов и молодых ученых «Молодёжь медицине будущего» . – Одесса. – 2009. – С. 146. автора – 0,25 пл.
7. Кчибеков Э.А. Диагностическая ценность белков острой фазы в оценке степени тяжести состояния больных с прободными гастродуоденальными язвами / Э.А. Кчибеков, Ю.А. Кривенцев, **М.В. Рамазанов**, // Материалы 7-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины». - Астраханский медицинский журнал. – Астрахань. – 2010. – Т.5, - №.1 – С.46-48. автора – 0,25 пл.
8. Рамазанов М.В. Сравнительное иммунохимическое изучение спектра термостабильных тканевых белков человека / М.В. Рамазанов, Р.Р. Абдуллаев // Материалами 4 международной конференции студентов и молодых ученых. Приложение к журналу. Вестник Российского государственного медицинского университета. –М. –2010 –Т.2, – С. 540. - автора – 0,5 пл.

9. Рамазанов М.В. Комплексный анализ ферропротеинов при остром распространенном перитоните / М.В. Рамазанов, Е.В. Бутырина // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Дни биохимии СПбГМУ». – СПб. - 2011. – С.52.
10. Рамазанов М.В. Феррокинетика при остром аппендиците / М.В. Рамазанов, А.В. Безносков // Областная конференция. Секция, биология и экология. – Астрахань. – 2010. автора – 0,75 пл.
11. Рамазанов М.В. Новые диагностические аспекты тестов на железосодержащие белки / М.В. Рамазанов, Э.А. Кчибеков, А.В. Безносков // Областная конференция. Секция, медицина и фармация. – Астрахань. – 2010. автора – 0,75 пл.
12. Рамазанов М.В. Обмен железа и железосодержащих белков при заболеваниях органов брюшной полости / М.В. Рамазанов, Э.А. Кчибеков, Е.В. Бутырина, А.В. Безносков // Конференция молодых ученых // Издательство «Челябинская государственная медицинская академия». – Челябинск, – 2011 – С.207- 209. автора – 0,75 пл
13. Рамазанов М.В. Патологические механизмы и диагностическое значение железа и железосодержащих белков при перфоративной язве желудка / М.В. Рамазанов. // Online -конференция молодых ученых «Охрана здоровья населения промышленных территорий» – Пермь. – 2011. автора – 0,75 пл.
14. Рамазанов М.В. Маркеры воспаления как предикторы деструкции органов брюшной полости / М.В. Рамазанов // IV Международный молодежный медицинский Конгресс “Санкт-Петербургские научные чтения–2011” – СПб. – 2011. – С.24. автора – 0,75 пл
15. Рамазанов М.В. Оптимизация способа очистки ферритина и создание диагностической тест-системы / М.В. Рамазанов, М.Ю. Кривенцева // Материалы Региональной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых – вклад в инновационное развитие России». – Астрахань. – 2011. – С.152-154. автора – 0,5 пл
16. Рамазанов М.В. Металлопротеины как маркеры обострения хронического холецистита / **М.В. Рамазанов**, Д.М. Никулина // Всероссийская конференция с международным участием «Профилактическая медицина - 2011» – СПб. – 2011. – С 261 -263. автора – 0,5 пл
17. Бисалиева Р.А. Продукция эмбрионального и фетального гемоглобинов в эмбриогенезе и постнатальном периоде у недоношенных детей / Р.А. Бисалиева, Д.М. Никулина., Л.А. Бахмутова, Ю.А. Кривенцев., П.В. Краморенко, **М.В. Рамазанов**, Р.П. Сеидов // Материалы 7-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в

решении актуальных проблем медицины». - Астраханский медицинский журнал. – Астрахань. – 2010. – Т.5, №.1. – С.292-295. автора – 0,25 пл.

18. Кривенцев Ю.А. Разработка иммунохимических тестов количественного анализа изоформ гемоглобина А человека / Ю.А. Кривенцев Ю.А., Р.А. Бисалиева, **М.В. Рамазанов**, К.Р.Хусаинова, Р.Р. Абдуллаев // Материалы 7-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины». - Астраханский медицинский журнал. – Астрахань. – 2010. – Т.5, - №.1.– С.43-46. автора – 0,25 пл.
19. Пат. 2423706 Российская Федерация. Способ диагностики острого холецистита / Кчибеков Э.А., **Рамазанов М.В.**; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «АГМА» Росздрава № 2009145842; заявл. 10.12.2009; опубл.10.07.2011г. автора – 0,5 пл.
20. Пат. 2407017 Российская Федерация. Способ диагностики деструктивных форм острого холецистита / Кчибеков Э.А., **Рамазанов М.В.**; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «АГМА» Росздрава № 2009145842; заявл. 16.04.2009; опубл.20.10.2010г. автора – 0,5 пл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОФ	белки острой фазы
ГФ	гель-фильтрация
ИДА	иммунодиффузионный анализ
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХ	ионообменная хроматография
Лф	Лактоферрин
МГ	альфа2-макроглобулин (α_2 МГ)
ОГА	острый гангренозный аппендицит
ОРП	острый разлитой перитонит
ОФА	острый флегмонозный аппендицит
ОХ	острый холецистит
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЯ	перфоративная язва
РИД	радиальная иммунодиффузия
РИФ	реакция иммунофлюоресценция
СБАГ	связанный с беременностью альфа ₂ -гликопротеин
СЖ	сывороточное железо

СРБ	С-реактивный белок
СФ	сывороточный ферритин
ХХ	хронический холецистит
ТФ	Трансферрин
Ф	Ферритин

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ, к.104, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01.