

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА

Э.И. Клепиков, Н.П. Жиронкина

В результате проведенных исследований в последнее время накоплены данные о клинической значимости определения содержания миоглобина в крови.

Миоглобин – сложный белок красного цвета, относящийся к хромопротеидам, содержится в красных мышцах животных различных классов и видов. Основной функцией миоглобина является накопление кислорода, поступающего в процессе дыхания в мышцы из крови и отдача кислорода по мере необходимости в нем.

В крови и моче миоглобин в норме отсутствует. Поэтому его появление в этих биологических жидкостях является признаком заболеваний, сопряженных с деструкцией тканей (инфаркт миокарда, травматические повреждения мышц, генетически обусловленная прогрессирующая мышечная дистрофия и т.д.). Определение уровня миоглобина в плазме крови может служить критерием деструкции, динамики процесса и эффективности лечебных мероприятий.

Продолжительность существования миоглобина составляет восемьдесят дней. В процессе эмбриогенеза миоглобин раньше всего появляется в мышце сердца.

Создаваемый с помощью миоглобина резерв кислорода в мышцах прежде всего определяется концентрацией в них пигмента и его способностью подвергаться оксигенации и деоксигенации.

Миоглобин поддерживает постоянный уровень оксигенации во время мышечного сокращения, создавая определенный градиент напряжения кислорода между капиллярами и мышечными клетками, обеспечивая, таким образом, возможность его утилизации при усилении окислительных процессов в работающих мышцах. Благодаря высокому сродству к кислороду полунасыщение им миоглобина происходит менее чем за 0,1 сек. (при $pO_2 = 3,3$ мм рт.ст.). При pO_2 , равном 5 мм рт.ст. (минимальное для деятельности цитохромоксидазы), диссоциирует до 40% оксигемоглобина, повышая таким образом количество кислорода, растворенного в саркоплазме. Миоглобин участвует в молекулярном механизме его транспорта в клетку путем создания градиента и ускорения диффузии. Не исключена возможность непосредственного переноса кислорода миоглобином при поступательном движении молекулы пигмента. Благодаря наличию пероксидантных свойств миоглобин обладает ферментативной активностью. Доказана возможность включения миоглобина в работу фосфорилирующей дыхательной цепи в качестве акцептора электронов от восстановленных коферментов пиридинового типа (НАДН и в меньшей степени НАДФН).

Существуют методы количественной оценки содержания миоглобина – электрофорез и ионообменная хроматография. Спектрофотометрическая регистрация количества миоглобина основана на разнице в светопоглощении карбокси- и цианметсоединений миоглобина в видимой части спектра. Предложены также гистохимические методы определения миоглобина, основанные на бензидин-пероксидазной активности пигмента. Они позволяют с достаточной достоверностью выявлять миоглобин в мышечной ткани и устанавливать закономерности в локализации и распределении миоглобина в норме и при различных патологических состояниях.

В течение последних лет активно развиваются методы иммунохимического анализа, основанные на использовании антигенов и антител, меченных ферментами. Эти методы, получившие название, «иммуноферментный анализ» (ИФА), первоначально были разработаны для гистохимических исследований, а затем для качественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях [1, 3]. Метод отличается высокой чувствительностью, простой регистрацией результатов, возможностью количественного учета результатов реакции, автоматизации исследований, а также высокой стабильностью реагентов. Возможность

визуальной оценки результатов реакции делает метод доступным для лаборатории любого класса, то есть для практического здравоохранения.

Целью данной работы было изучение диагностической ценности иммуноферментного метода у больных с заболеваниями периферической нервной системы (полиневропатиями и неврологическими проявлениями поясничного остеохондроза).

Пробу крови центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 минут, получали сыворотку, в которой иммуноферментным методом определяли содержание миоглобина.

Иммуноферментный метод основан на специфическом взаимодействии миоглобина с антителами к нему. Предварительно на поверхности лунок полистироловых плоскодонных микротитровальных планшет сорбировали очищенные (афинновыделенные) антитела к миоглобину. Затем в лунки вносили исследуемые жидкости или стандартные растворы миоглобина. При этом миоглобин связывался специфически с иммобилизованными антителами. Несвязанный миоглобин удалялся промыванием. На следующей стадии в лунки добавляли раствор конъюгата, представляющего собой антитела к миоглобину, ковалентно связанные с ферментом- пероксидазы хрена. Конъюгат специфически связывается с миоглобином и образуется иммобилизованный тройной комплекс: антителомиоглобин-конъюгат. После промывания и удаления несвязавшегося конъюгата добавляется субстрат пероксидазы H_2O_2 и хромоген О- фенилендиамин, изменяющий окраску в процессе ферментативной реакции. Через определенное время реакцию прерывают, добавляя в лунки 50% серной кислоты. Величина оптической плотности раствора пропорциональна количеству миоглобина в исследуемых образцах или стандартных растворах. Регистрацию осуществляли спектрофотометрически или визуально. При регистрации на спектрофотометре содержание миоглобина в исследуемых образцах вычисляли графически по калибровочной кривой зависимости оптической плотности от концентрации миоглобина стандартных растворов. При визуальной регистрации результатов сравнивалась интенсивность окраски исследуемых и стандартных растворов. По совпадению окраски оценивалось содержание миоглобина в исследуемых образцах.

Чувствительность определения содержания миоглобина 1 - 5 нг/мл. Количество миоглобина в сыворотке крови у здоровых лиц, определяемое иммуноферментным методом, составляло от 6 до 85 нг/мл. Время проведения анализа 1,5 часа. Анализ проводили в планшетах фирмы (США) или отечественного производства (института экспериментальной техники). Оптическую плотность субстратной смеси в каждой лунке планшета измеряли при длине волны 492 нм, используя многоканальный спектрофотометр фирмы (США).

По данным иммуноферментного анализа значительное содержание миоглобина в сыворотке крови к началу обследования обнаружено у 90% больных с полиневропатией на фоне инфаркта миокарда. Уровень миоглобина достигал максимума (1964 ± 364 нг/мл) через 7 часов. Нормализация уровня миоглобина проходила через 24 - 48 часов. Достоверно отмечено, что уровень миоглобина в сыворотке крови находился в прямой зависимости от обширности поражения инфарктом миокарда.

Динамика изменений уровня миоглобина в сыворотке крови больных с полиневропатиями на фоне инфаркта миокарда имеет определенное диагностическое значение. Раннее увеличение уровня миоглобина и быстрая его нормализация позволяют использовать этот тест для диагностики обширности патологического процесса.

Содержание миоглобина в сыворотке крови больных с мышечно-тоническими проявлениями рефлекторных синдромов остеохондроза позвоночника составляло 191 - 360 нг/мл, тогда как у больных с корешковидными синдромами остеохондроза позвоночника – не превышало $65,3 \pm 4,0$ нг/мл, достоверно не отличаясь от нормы ($54,25 \pm 2,20$ нг/мл, $p > 0,05$).

Таким образом, иммуноферментный метод определения миоглобина в сыворотке крови дает возможность предварительно визуально оценивать результаты по интенсивности окраски растворов, не требует сложного оборудования, позволяет работать, используя конъюгат, который сохраняет активность в течение, по крайней мере, полугода.

Благодаря повышению точности диагностики, обеспечивается более высокая эффективность лечения больных с данной патологией. Это достигается путем использования целенаправленной патогенетически обусловленной терапии, как медикаментозной, так и немедикаментозной, что позволяет значительно уменьшить лекарственную нагрузку на больного, сэкономить дорогостоящие препараты, сократить сроки лечения.

Библиографический список

1. А.Ю. Ташматова, И.И. Староверов, Г.А. Ермолин, М.М. Диков, В.Н. Титов, В.П. Масенко, М.Я. Руда. Иммунологические методы определения миоглобина в сыворотке крови для диагностики инфаркта миокарда. // Бюллетень ВКНЦАМН СССР. - №2. - №984. - С.3 7-41.
2. Троицкая О.В. Миоглобин, его химическое строение и функции в организме // Вопр. мед. химии. - Т.17. - Вып. 5. - С. 451, 1971.
3. Клепиков Э.Н., Жиронкина Н.П., Корж Н.А., Рева В.Л. // Патент Российской Федерации № 2068566 ОТ 16 июня 1992 г.

РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Э.Н. Клепиков, Н.П. Жиронкина

Медицинская реабилитация, как новое направление в медицине, преследует своей целью проведение комплексного лечения больных для предупреждения глубокой инвалидизации и более раннего и полноценного возвращения в общество, к социально-полезному труду.

Наиболее эффективная реабилитация больных может быть достигнута в рамках единого специализированного учреждения, имеющего возможность как госпитализировать на необходимый срок, так и продолжать реабилитацию больного в условиях поликлиники, располагающей всеми видами восстановительного лечения.

В реабилитационный комплекс больных с заболеваниями периферической нервной системы широко и постоянно включаются методы немедикаментозной терапии, поскольку «фармакологическая перенасыщенность» стала проблемой медицины. К таким методам относятся: физиобальнеотерапия, лечебная физкультура – наиболее могучий фактор восстановления функций органа, применяемые в комплекс с различными видами рефлексотерапии (классическое иглоукалывание, аурикулотерапия, вакуумтерапия, поверхностное раздражение рецепторов кожи специальным молоточком для рефлексотерапии, электропунктура, электроакупунктура и т.д.).

Выбор того или иного метода проводится строго индивидуально с учетом клиники, психо-эмоциональной и общей реактивности, данных клинического обследования, давности заболевания и возраста пациента (Вогралик В.Г. и соавт., 1978; Иванченко Г.А. и соавт., 1989). На этапе реабилитации методами выбора для больных с заболеваниями периферической нервной системы являются: физиотерапия, электрофорез прозерина, новокаина, диадинамические токи, коротковолновая диатермия, плазмофорез, гипербаротерапия, гипобаротерапия, электрическое воздействие на нервно-мышечные структуры, аутогемотрансфузии ультрафиолетом облученной крови.

Физиотерапевтическое лечение применяют для уменьшения болевого синдрома, ускорения регенеративных процессов, улучшения кровообращения, уменьшения отека в нервном волокне, для профилактики контрактур (Кулик Н.М. и соавт., 1987; Клепиков Э.Н.,