

УДК 616.155.16:616.155.16-053.31

## НОВЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Кривенцев Ю.А., <sup>2</sup>Доценко Ю.И., <sup>1</sup>Гудинская Н.И., <sup>3</sup>Кривенцева М.Ю.

<sup>1</sup>ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России», Астрахань, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);

<sup>2</sup>Российская академия народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ, Астраханский филиал, Астрахань, e-mail: [aup@afvags.ru](mailto:aup@afvags.ru);

<sup>3</sup>ГБУЗ АО «Патологоанатомическое бюро», Астрахань, e-mail: [cpab@mail.ru](mailto:cpab@mail.ru)

Разработан новый оригинальный способ выделения и очистки стадиоспецифического протеина – эмбрионального гемоглобина человека. Способ представляет алгоритм последовательного поэтапного фракционирования эмбрионального гемоглобина и включает следующие этапы: гомогенизация и экстрагирование abortивного материала сроком гестации 5-11 недель, щелочное осаждение 1,2 М раствором NaOH с последующим центрифугированием и обессоливанием гель-фильтрацией на sephadex G-10, ионообменную хроматографию на DEAE sephadex A-50 с 0,01 М трис-хлоридным буфером pH 8,1 в восходящем градиенте ионной силы, ионообменную хроматографию на QAE sephadex A-50 с 0,05М трис-HCl буфером pH 6,5 в однократном подъеме ионной силы буфера до 0,5 Моль/л. Разработанный способ позволяет получить препарат высокой степени очистки с массовой долей эмбрионального гемоглобина – 88,98%.

**Ключевые слова:** эмбриональный гемоглобин, фракционирование, алгоритм выделения, очистка, чистота препарата

## NEW METHOD OF ISOLATION AND PURIFICATION OF HUMAN FETAL HEMOGLOBIN

<sup>1</sup>Kriventsev Y.A., <sup>2</sup>Docenko Y.I., <sup>1</sup>Gudinskaja N.I., <sup>3</sup>Kriventseva M.Y.

<sup>1</sup>Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);

<sup>2</sup>Russian Academy of National Economy and Public Administration under the President of Russian Federation, Astrakhan branch, Astrachan, e-mail: [aup@afvags.ru](mailto:aup@afvags.ru);

<sup>3</sup>Mortem Bureau, Astrachan, e-mail: [cpab@mail.ru](mailto:cpab@mail.ru)

A new original method of isolation and purification stage-protein – human embryonic hemoglobin was suggested. The method is consistent algorithm stepwise fractionation of fetal hemoglobin, and includes the steps of: homogenizing and extracting abortive material gestational weeks 5-11, alkaline precipitation of a 1.2 M NaOH solution followed by centrifugation and desalting by gel filtration on sephadex G-10, ion exchange chromatography DEAE sephadex a-50 with 0.01 M tris-chloride buffer, pH 8.1 in the upward gradient of ionic strength, ion-exchange chromatography on QAE sephadex a-50 with 0.05M tris-HCl buffer pH 6.5 in a single lifting ionic strength buffer to 0.5 mol/l. The developed method makes it possible to obtain a preparation of high purity with a mass fraction of fetal hemoglobin – 88.98%.

**Keywords:** embryonic hemoglobin, fractionation, allocation algorithm, purification, the purity of the drug

Гетерогенная система гемоглобина является классической системой изо-протеинов, исследование которых ведется уже около века. Однако, эмбриональный гемоглобин (HbF), являющийся одним из канонических стадиоспецифических типов гемоглобина человека, является, пожалуй, одним из самых малоизученных изоформ системы гемоглобина. Крайне скудны сведения о динамике его синтеза в процессе онтогенеза, физико-химических свойствах, клинико-диагностическом значении, а данные о методах оптимального выделения HbF в доступной литературе просто не отражены. Существует, на наш взгляд, две причины такого парадоксального низкого интереса к этому хромопротеину: во-первых, продукция эмбрионального гемоглобина полно-

стью репрессирована у детей и взрослых, что делает этот белок непривлекательным для клиницистов, в плане его прогностическо-диагностической ценности; во-вторых, выделение и очистка HbF (с целью дальнейшего его изучения) очень затруднительна из-за его низкой концентрации в эмбриональных тканях и сложностей забора биоматериала [3, 5, 6, 7].

HbF имеет тетрамерное строение, молекулярная масса – около 65000 Да. По физико-химическим свойствам он сходен с фетальным гемоглобином: они оба имеют более высокое, чем гемоглобин взрослого, сродство к кислороду, сходные электрофоретическую подвижность, щелочную резистентность, коэффициент седиментации (4,5 S) и спектр поглощения.

Синтез этого протеина, по разным данным, осуществляется в желточном мешке и печени эмбриона в период с 4 по 12 неделю гестации [2, 4, 7, 9].

Немногочисленные работы последних лет опровергают устоявшееся мнение о НбР, как протеине с нулевой прикладной значимостью и свидетельствуют о его значении, как канцероэмбрионального антигена при миелопролиферативных заболеваниях крови [1, 8].

В свете вышесказанного, актуальной задачей является разработка оригинального алгоритма получения чистого препарата эмбрионального гемоглобина, с целью его дальнейшего фундаментального изучения.

**Цель исследования:** разработка оптимального способа выделения и очистки эмбрионального гемоглобина человека.

#### Материалы и методы исследования

Исходным материалом для фракционирования белка служил абортивный материал сроком 5-11 недель, который получали только с письменного согласия пациенток, в ходе плановых абортов, без сопутствующей патологии, проводимым с целью прерывания незапланированной беременности. Всего получено 387 г абортивного материала от 49 пациенток с беременностью вышеуказанных сроков.

Сортировку абортивного материала (отделение эмбриональных тканей от материнских и оболочечных тканей) осуществляли при участии квалифицированных гистологов.

Гомогенизацию эмбриональных тканей проводили механически-термическим способом. Экстрагирование цитозольных белков проводили добавлением 0,85% раствора хлорида натрия в объемном соотношении 1:1. Для удаления клеточных элементов взвесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 25 мин, после чего осадок отбрасывали.

В работе использовали методы комбинированной щелочной денатурации (позапанная обработка гемолизата раствором сульфата аммония 50% насыщенности и 1,2 М раствором едкого натра с последующей седиментацией при 8000 об/мин), путем гель-фильтрации на sephadex G-10 и ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-sephadex A-50 и на QAE-sephadex A-50.

Эффективность выделения НбР оценивали по стандартным характеристикам очистки: абсолютным количеством искомого белка в препарате, относитель-

ной массовой доле искомого белка, степени очистки и выходу продукта.

Для математического анализа результатов исследования был использован лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2010 (Microsoft) и Statistica 6.0 (StatSoft. Inc.). Для каждой выборки результатов очистки вычисляли средние величины ( $M$ ) и среднюю ошибку средней арифметической ( $m$ ). С целью определения значимости степени разброса применялся однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия  $F$  Фишера.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы разработан оригинальный алгоритм выделения и очистки эмбрионального гемоглобина, включающий последовательные этапы:

1. *Гомогенизация и экстрагирование биоматериала.* После двукратного замораживания (при  $-18^{\circ}\text{C}$ ) и оттаивания эмбриональная ткань измельчалась и подвергалась механической гомогенизации с использованием в качестве абразива мелкодисперсной стеклянной крошки.

Экстрагирование цитозольных белков проводили добавлением 0,85% NaCl в объемном соотношении ткань-раствор: 1 к 1. После центрифугирования при 5000 об/мин в течение 25 мин осадок отбрасывали.

2. *Щелочное осаждение.* Предлагаемая щелочная денатурация позволяет быстро и эффективно избавиться от большинства примесных белковых компонентов, лабильных к воздействию щелочей.

В 2 мл раствора, содержащего НбР, добавляли 0,2 мл 1,2 М раствора NaOH, и через 40 секунд добавляли 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония (до 50%-й насыщенности). При этих условиях щелочлабильные внутриэритроцитарные белки денатурируют и седиментируют. После центрифугирования при 8000 об/мин в течение 25 мин осадок отделяли. Полученный белковый препарат подвергали обессоливанию путем гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-10, рабочий буфер – 0,05 М фосфатный буферный раствор pH 7,4.

#### Анализ качества выделения НбР

Основные этапы выделения	Общий белок, мг/л	Кол-во продукта, мг/л	Целевой продукт, %	Степень очистки НбР
Экстракт эмбриональных тканей	859	32	3,73	1
Щелочное осаждение	112 ± 4,4	24 ± 2,1	21,43 ± 1,9	5,75 ± 0,6
Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-sephadex A-50	17 ± 1,0	5,5 ± 0,6	32,35 ± 2,8	8,67 ± 0,9
Ионообменная хроматография на QAE-sephadex A-50	1098 ± 63,2	977 ± 52,9	88,98 ± 4,3	23,86 ± 1,8

Примечание. Суммарный коэффициент дисперсии  $F = 5,6$ .

3. *Ионообменная хроматография на DEAE-sephadex A-50.* Тонкую очистку проводили путем ионообменной хроматографии на DEAE-sephadex A-50. В качестве рабочего буфера использовали 0,01 М трис-хлоридный буфер pH 8,1.

Полученный на предыдущем этапе очищенный препарат предварительно забуферивали диализом в течение ночи против 3 л 0,01 М трис-хлоридного буфера pH 8,1. Затем 15-20 мл адаптированного препарата вносили в колонку, проводили 30-минутную остановку-экспозицию для фиксации HbP на катионных группировках геля и начинали процесс хроматографии. Элюцию проводили в градиенте ионной силы с повышением осмолярности буферного раствора путем ступенчатого добавления хлорида натрия.

4. *Ионообменная хроматография на QAE-sephadex A-50* – ключевой этап, позволяющий не только очищать, но и значительно концентрировать HbP, полученный на предыдущем этапе.

Главной проблемой при очистке HbP, после третьего этапа, было крайнее разведение белка до очень низких концентраций. QAE-sephadex был выбран в качестве сорбента в силу его чрезвычайно высокой емкости, что позволяет не только очищать, но и концентрировать препарат в десятки раз. В качестве рабочего буфера был выбран 0,05М трис-HCl буфер, pH 6,5.

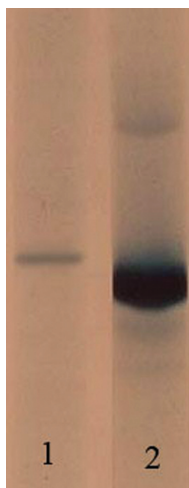


Рис. Анализ чистоты полученного препарата HbP методом электрофореза в ПААГ. 1 – Очищенный препарат HbP; 2 – гемолизат крови взрослого человека

Материал, предназначенный для хроматографии предварительно доводили до pH 6,5 путем диализа против рабочего буфера в течении 3 часов.

Белковый раствор вносили в колонку из расчета: 15 мл раствора на 1 мл геля. Элю-

цию фиксированного на геле белка проводили резким однократным подъемом ионной силы буфера до 0,5 Моль/л (добавлением NaCl). В таких условиях весь фиксированный на геле белок быстро элюировался в малом объеме (эффект концентрирования).

Контроль качества очистки проверяли электрофорезом полученных белковых препаратов в полиакриламидном геле (рисунок).

Эффективность разработанного способа получения эмбрионального гемоглобина оценивали по основным характеристикам очистки: абсолютным количеством искомого белка в препарате, относительной массовой доле искомого белка, выходу целевого продукта и степени очистки (таблица).

### Заключение

Разработанный способ выделения и очистки эмбрионального гемоглобина имеет следующие преимущества:

1. Скорость – все этапы процесса занимают не более суток;
2. Получение препарата HbP высокой степени очистки;
3. Многократность использования ионообменного сорбента позволяет применение поточного подхода;
4. Концентрирование материала – заключительный этап реализует сразу две задачи: тонкая очистка белка и параллельное эффективное его концентрирование в 150-200 раз (!).

### Список литературы

1. Бахмутова Л.А. Выявление эмбрионального гемоглобина в крови новорожденных с внутриутробной гипоксией / Л.А. Бахмутова, Ю.А. Кривенцев, Л.А. Огуль // Вопросы практической педиатрии. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 12.
2. Бисалиева Р.А., Кривенцев Ю.А., Бисалиев Р.В., Кальной В.С. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных // Наркология. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 95–97.
3. Бойко В.И. Содержание вредных веществ в воздушной среде центральной заводской лаборатории астраханского газоперерабатывающего завода / В.И. Бойко, Ю.И. Доценко, О.В. Бойко // Гигиена и санитария. – 2011. – № 3. – С. 33–38.
4. Бойко В.И. Острофазовые белки в слюне рабочих на предприятии по переработке природного газа и конденсата с высоким содержанием сероводорода / В.И. Бойко, Ю.И. Доценко, О.В. Бойко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 6. – С. 18–20.
5. Бойко О.В. Методические аспекты использования солянокислых спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры / О.В. Бойко, А.А. Терентьев, А.А. Николаев // Проблемы репродукции. – 2010. – № 3. – С. 77–79.
6. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – С.-Пб. «Элбис-СПб». – 2000. – 324 с.
7. Иржак Л.И. Гемоглобины и их свойства / Л.И. Иржак. – М.: Наука, 1983. – 150 с.
8. 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.
9. Топунов А.Ф. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность / А.Ф. Топунов, Н.Э. Петрова // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 199–228.