

УДК 616.155.16:576.8.077.3

## АНАЛИЗ ПРОДУКЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И ПЛОДОВОГО ГЕМОГЛОБИНОВ В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Кривенцев Ю.А., <sup>1</sup>Бисалиева Р.А., <sup>1</sup>Гудинская Н.И.,  
<sup>1</sup>Кривенцева М.Ю., <sup>2</sup>Онищенко М.С.

<sup>1</sup>ГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет  
Минздрава России», Астрахань, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);  
<sup>2</sup>ГБУЗ АО «Патологоанатомическое бюро», Астрахань, e-mail: [cpab@mail.ru](mailto:cpab@mail.ru)

В работе проведено исследование продукции эмбрионального и плодового гемоглобинов в раннем эмбриогенезе человека (в диапазоне гестационного возраста от 4 до 12 недель включительно). Показано, что эмбриональный гемоглобин достигает пика своей концентрации на 5-й неделе гестационного возраста, после чего его уровень неуклонно снижается, достигая минимума к 12-й неделе. Приведенные данные по продукции плодового гемоглобина дают ориентировочные сроки начала синтеза этого белка: 4-5-я недели гестации и свидетельствуют о неуклонном экспоненциальном росте темпа его синтеза в раннем эмбриогенезе человека. Сравнительный анализ динамики концентрации эмбрионального и плодового гемоглобинов в указанном диапазоне гестационного возраста показал высокий уровень обратной корреляции продукции этих протеинов по отношению друг к другу.

**Ключевые слова:** эмбриогенез, эмбриональный гемоглобин, плодовой гемоглобин, иммунохимия, тест-система

## ANALYSIS OF EMBRYONIC AND FETAL HEMOGLOBIN PRODUCTION IN EARLY HUMANS EMBRYOGENESIS

<sup>1</sup>Kriventsev Y.A., <sup>1</sup>Bisalieva R.A., <sup>1</sup>Gudinskaja N.I., <sup>1</sup>Kriventseva M.Y., <sup>2</sup>Onicsenko M.S.

<sup>1</sup>Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: [agma@astranet.ru](mailto:agma@astranet.ru);  
<sup>2</sup>Mortem Bureau Astrachan, e-mail: [cpab@mail.ru](mailto:cpab@mail.ru)

Production of embryonic and fetal hemoglobin in early embryogenesis of humans (in the range of gestational age from 4 to 12 weeks, inclusive) is studied. It is shown that fetal hemoglobin concentration reaches its peak in the 5th week of gestation, after which the level has steadily declined, reaching a minimum in the 12th week. The data on fetal hemoglobin production give approximate dates of the beginning of the synthesis of protein: 4-5-th week of gestation and show a steady exponential growth rate of its synthesis in human early embryogenesis. A comparative analysis of the dynamics of the concentration of embryonic and fetal hemoglobin in this gestational age range showed a high inverse correlation of the level of production of these proteins in relation to each other.

**Keywords:** embryogenesis, embryonic hemoglobin, fetal hemoglobin, immunochemistry, test system

Процесс внутриутробного развития человека является предметом многочисленных исследований, проводимых в области гематологии, эмбриологии, акушерства, педиатрии (в т.ч. неонатологии), анатомии, гистологии, возрастной физиологии, трансплантологии. Такой интерес вызван выявлением и изучением факторов, влияющих на процессы развития плода, и условий, необходимых для рождения здорового ребенка. Одним из таких факторов является стадийно-специфическая гетерогенная система гемоглобина, включающая множество изоформ этого белка, спектр которых претерпевает изменения как в онтогенезе, так и при различных патологических состояниях [6, 7].

Особый интерес для изучения представляют антенатальные типы гемоглобина – эмбриональный (HbF) и плодовой (или фетальный – HbF), являющиеся основными типами гемоглобина во внутриутробном онтогенезе. Динамика их продукции на данном этапе развития изучена недостаточно. Одним из свойств этих белков является повы-

шенное сродство к кислороду, что позволяет в условиях относительной внутриутробной гипоксии обеспечивать адекватное снабжение тканей плода кислородом [3, 4, 7, 10].

В последнее десятилетие отмечается повышение интереса к изучению отдельных изоформ гемоглобина и моделированию помощи иммунохимических тест-систем на эти белки [1, 2, 9]. Неоспоримым преимуществом иммунохимических методик индикации белков является их высокая специфичность и чувствительность. Кроме того, эти методы позволяют исследовать сложные биологические смеси без какой-либо предварительной очистки и выделения исследуемого протеина.

На основании вышеизложенного представляется целесообразным иммунохимическое изучение количественного соотношения эмбрионального и плодового гемоглобинов для пополнения фундаментальных сведений по динамике продукции этих белков в антенатальном онтогенезе человека в норме.

**Цель исследования:** иммунохимический анализ продукции эмбрионального и плодового гемоглобинов в раннем эмбриогенезе человека.

### Материалы и методы исследования

Исходным биоматериалом для анализа служил абортный материал сроком 4-12 недель, сбор которого проводили только с письменного согласия пациенток. В целях исключения негативного влияния патологических факторов внутриутробного состояния, потенциально способных исказить картину результатов данного исследования, отбор материала осуществляли только по плановым абортам, без сопутствующей патологии, проводимым с целью прерывания незапланированной беременности. В силу известных ограничений клинических показаний к плановым абортам по срокам, сбор материала со сроками гестации: до 4 недель и после 12 недель не проводился.

Материал сразу по прибытии в лабораторию промывали и подвергали сортировке при участии квалифицированных гистологов и биоморфологов. Суть процесса состояла в тщательном отделении тканей эмбриона от материнских и оболочечных тканей. Оставшиеся части взвешивались и подвергались гомогенизации механически-термическим способом. Полученная каша подвергалась двукратному замораживанию и оттаиванию.

Экстрагирование цитозольных белков проводили добавлением в полученную гомогенную кашу 0,9% раствора NaCl в объемном соотношении 1:2. Для избавления от клеточных обломков взвесь центрифугировали при 8000 g в течение 30 мин, после чего осадок отбрасывали.

В ходе сбора и обработки биоматериала было получено 174 образца эмбриональных тканей, совокупность которых была разделена на 9 групп по срокам эмбриогенеза (в неделях гестационного возраста) (табл. 1).

**Таблица 1**  
Выборка эмбрионального материала по срока гестации

Срок (в неделях)	Число индивидуальных образцов
4	14
5	15
6	18
7	22
8	21
9	26
10	24
11	19
12	15
Всего	174

Для количественной калибровки стандартных проб проводили контроль концентрации HbP и HbF в них следующими способами:

- Полуколичественное определение концентрации эмбрионального гемоглобина в пробе методом

иммунодиффузионного титрования по Оухтерлони, исходя из пороговой чувствительности полученной тест-системы на этот белок ( $4,23 \pm 0,21$  мг/л).

- Оптическое определение количества общего гемоглобина в пробе, определяемое унифицированным гемоглобинцианидным методом при длине волны 540 нм и толщине слоя 1 см против дистиллированной воды на спектрофотометре SPEEKOL-11 (по инструкции, утвержденной руководителем Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ 17.06.2000);

- Оптическое определение количества HbF и HbP в очищенных препаратах этих белков, определяемое аналогично.

Специфика работы с подобным биоматериалом состоит в том, что из тканей эмбрионов (4-12 недель) таких малых размеров невозможно получение их крови в чистом виде. Поэтому расчет концентрации исследуемых белков проводили не на единицу объема (мг/л), а на единицу массы исследуемого субстрата (мг/кг), конвертируемые затем для наглядности в относительные массовые доли (%) от общего гемоглобина. При сравнительном анализе динамики продукции антенатальных гемоглобинов (HbP и HbF) в раннем эмбриогенезе, определение концентрации плодового и эмбрионального гемоглобинов проводили на единицу объема (мг/л).

Для количественного анализа изучаемых белков в биоматериале использовали специфические иммунохимические тест-системы на HbP и HbF, полученные и стандартизированные авторами самостоятельно [1, 8]. Рассчитанный порог чувствительности смоделированной тест-системы на HbP оказался равным  $2,18 \pm 0,32$  мг/л, на HbF –  $1,73 \pm 0,28$  мг/л.

Определение уровня HbP проводили методикой радиальной иммунодиффузии по Манчини в модификации Фехей и Мак-Келви с использованием полученного калибровочного графика.

Количественный анализ плодового гемоглобина проводили самостоятельно разработанным и запатентованным способом ракетного иммуноэлектрофореза с додецилсульфатом натрия [8].

Для оценки статистической значимости результатов исследования использовали лицензионный пакет прикладных программ статистического анализа Excel-2007 (Microsoft) и Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc.). Для каждой выборки вычисляли средние величины (M), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ), средние ошибки средней арифметической (m). С целью определения значимости (p) различий сопоставляемых величин применяли критерий (t) Стьюдента с поправкой Бонферрони и однофакторный дисперсионный анализ с вычислением критерия F Фишера. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для оценки межгрупповой зависимости проводили линейный корреляционный анализ Пирсона (коэффициент корреляции – r). Корреляция считалась высокой при приближении модульной величины r к единице [5].

### Результаты исследования и их обсуждение

Ниже приводятся данные по продукции и динамики концентрации эмбрионального гемоглобина в раннем эмбриогенезе человека.

Экстраполяция полученных результатов иммунохимического определения HbP

показывает (табл. 2), что этот, онтогенетически самый ранний тип гемоглобина, достигает пика своей продукции на 5-й неделе гестационного возраста (ГВ), после чего его уровень неуклонно экспоненциально снижается, достигая минимума к 12-й неделе. Проведенный корреляционный анализ по Пирсону показал высокую обратную зависимость между продукцией эмбрионального гемоглобина и сроком гестации ( $r = -0,879$ ) в диапазоне с 4 по 12 неделю.

Иммунохимический количественный анализ HbF в исследуемых образцах по гестационным группам дал следующие результаты (табл. 3).

Приведенные данные дают ориентировочные сроки начала синтеза плодового гемоглобина: 4-5-я недели гестации и свидетельствуют

о неуклонном экспоненциальном росте темпа продукции этого белка в раннем эмбриогенезе человека. Дисперсионный анализ свидетельствует о высокой сходности результатов. Линейный корреляционный анализ Пирсона показал высокую степень прямой зависимости между продукцией фетального гемоглобина и сроком гестации ( $r = 0,932$ ).

Проведен сравнительный анализ продукции HbF и HbP в раннем эмбриогенезе человека (4-12 недели гестации). Результаты динамики концентрации HbF и HbP в указанном диапазоне ГВ (рисунок) позволили провести анализ корреляции продукции этих протеинов по отношению друг к другу. Линейный анализ Пирсона по данным показателям показал высокий уровень обратной корреляции ( $r = -0,94$ ).

**Таблица 2**

Продукция HbP  
в раннем эмбриогенезе человека

Срок (в неделях)	n	Концентрации HbP (мг/кг)	Стандартное отклонение ( $\sigma$ )
4	13	61 ± 2,4	1,76
5	16	74 ± 3,5	2,2
6	19	41 ± 1,9	1,33
7	21	29 ± 1,4	0,93
8	20	22 ± 1,5	1,92
9	27	18 ± 1,3	0,86
10	22	15 ± 0,9	0,63
11	18	12 ± 0,9	0,65
12	14	9 ± 0,4	0,58

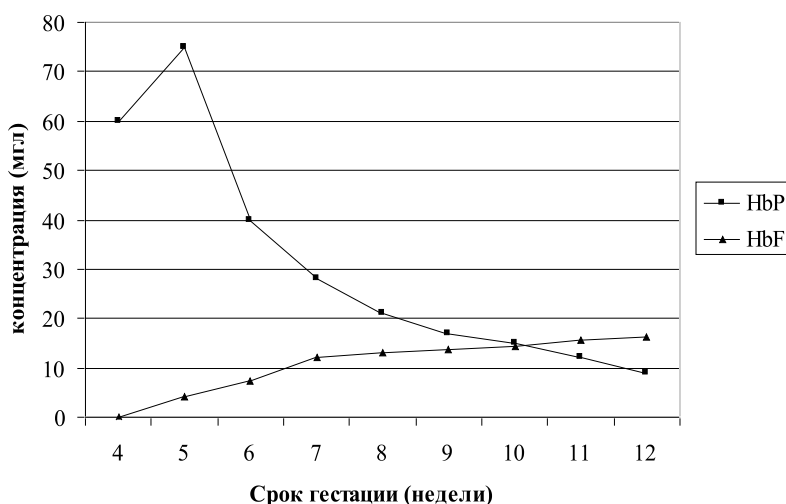
Примечание.  $\sigma$  по генеральной совокупности средних концентраций HbP (мг/кг) 0,55. Коэффициент дисперсии (F) = 5,7.

**Таблица 3**

Динамика продукции фетального гемоглобина в раннем эмбриогенезе человека

Срок (в неделях)	n	Концентрации HbF (мг/кг)	Стандартное отклонение ( $\sigma$ )
4	13	0,0 ± 0,0	0,0
5	16	4,2 ± 0,21	0,15
6	19	7,2 ± 0,53	0,36
7	21	12,1 ± 0,9	0,63
8	20	13,3 ± 1,2	2,1
9	27	13,5 ± 1,7	1,12
10	22	14,4 ± 1,6	1,22
11	18	15,6 ± 1,7	1,26
12	14	16,5 ± 1,8	1,36

Примечание.  $\sigma$  по генеральной совокупности средних концентраций HbF (мг/кг) 0,174, коэффициент дисперсии (F) = 6,4.



Динамика концентраций эмбрионального и плодового типов гемоглобина в раннем эмбриогенезе человека

Результаты параллельного количественного определения HbP и HbF свидетельствуют о том, что в образцах исследуемого материала оба белка выявлялись в 100% случаев, начиная уже с 5-й недели гестации (табл. 2 и 3). На четырехнедельном сроке гестации выявляли лишь HbP в высокой концентрации, хотя пика его значения достигали на 5-й неделе ГВ. Иммунохимически зафиксировано первое появление плодового гемоглобина в эмбриональных тканях на 5-ой неделе гестации. Динамика изменений количественных показателей HbP и HbF носила разнонаправленный характер: уровень HbP плавно снижался по ходу эмбрионального развития, составляя на 8-й неделе ГВ всего 12% от максимального значения, а уровень HbF неуклонно возрастал, превысив к 12 неделям начальные значения в 4 раза (рис. 1). Такое угасание синтеза HbP можно объяснить начинающимися после 5-й недели внутриутробного развития атрофическими процессами в желточном мешке, который является местом синтеза данного белка. Продукция HbF связана с новым этапом в развитии гемопоэза – эмбриональное и фетальное кроветворение стартует с 5-ой недели, продолжаясь до конца гестационного периода и, в отличие от внеэмбрионального, имеет органную локализацию – печень, функционирующую наиболее активно после 12-й недели внутриутробного периода.

### Заключение

Показана высокая достоверная зависимость продукции антенатальных гемоглобинов от сроков гестации в раннем эмбриогенезе человека (4-12 недель гестации): для эмбрионального гемоглобина корреляция является высокой отрицательной ( $r = -0,88$ ); для плодового – высокой положительной ( $r = 0,93$ ). Установлены сроки начала продукции эмбрионального гемоглобина: с 4-й недели гестационного возраста, плодового гемоглобина: с 5-й недели.

### 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. Безрукавникова Н.В. Стероидсвязывающие белки у больных раком молочной железы / Н.В. Безрукавникова, А.В. Коханов, Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Л.М. Берштейн, В.В. Кутуков // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 409-413.
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. 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. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
6. Зайчик А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – С.-Пб. «Элби-СПб». – 2000. – 324 с.
7. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства / Л.И. Иржак. – М.: Наука, 1983. – 150 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. Токарев Ю.Н. Иммунохимический метод ряда гемоглобинопатий: Методические рекомендации / Ю.Н. Токарев, А.Н. Ахундова, А.П. Андреева. – Баку: Новая книжная типография, 1982. – 9 с.
10. Топунов А.Ф. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность / А.Ф. Топунов, Н.Э. Петрова // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 199-228.