

Н.А. Степанова, Аль Бов Бакер, А.А. Чиркин

Обоснование применения средств «сухой химии» для количественного анализа биохимических показателей сыворотки крови

По мере технического прогресса, наряду с развитием классических лабораторных технологий, разрабатываются и внедряются готовые аналитические формы, включающие все необходимое для аналитического процесса. Они основаны на концепции «all-in-one» [1, 2]. На протяжении последних 25 лет получили развитие аналитические средства, предназначенные для внелабораторного применения – «Point-of-care testing» (сокращенно ПОСТ) [3]. Существует мнение, что ПОСТ – это развитие лабораторной службы путем ее децентрализации (чем быстрее анализ – тем меньше риск) [4]. В США каждый четвертый тест осуществляется в системе ПОСТ. Ожидается, что в будущем до 40% анализов будут осуществляться этими технологиями [5, 6]. По степени аналитической надежности средства АМЛ должны быть сопоставимы со средствами анализа в стационарной лаборатории. В стационарной лаборатории на ошибки преаналитической фазы приходится 68,2%, аналитической фазы – 13,3% и постаналитической фазы – 18,5% [7]. В использовании средств ПОСТ отсутствует преаналитическая фаза, что устраняет большую часть погрешности анализа. Так, например, исследованы средства сухой химии Kodak Ektachem 250 при определении содержания холестерина ферментативным путем (холестеролэстераза – холестеролоксидаза – пероксидаза) в сравнении со средствами жидкой химии. Установлено, что параметр CV составил 1–1,4%, а при многодневном анализе 2,5–3% [8]. Высокая точность, воспроизводимость и чувствительность продемонстрирована для анализатора Рефлотрон Плюс, работающего в рамках системы ПОСТ: параметр CV 3,2–5,5% [9].

Целью работы было научное обоснование применения средств сухой химии для количественного анализа биохимических компонентов сыворотки крови для оценки действия неблагоприятных факторов стрессовой и экологической природы.

На первом этапе работы была проведена сравнительная оценка эффективности существующих методов количественного определения холестерина (ХС) и триацилглицеролов (ТГ) – химического, ферментативного и флуоресцентного методов жидкой и сухой химии и прямых методов определения холестерина ЛПВП и ЛПНП. В работе использованы следующие методы: метод определения содержания общего холестерина (ОХС) по Абелю и ТГ с помощью наборов фирмы «LACHEMA»; методы определения содержания ХС и ТГ ферментативными методами с помощью диагностических полосок «Роше-диагностика» и анализатора Рефлотрон-IV – сухая химия, а также наборов фирмы «Кормей ДиАна» и анализатора Кормэй-Мульти – жидкая химия; метод определения суммы ХС и ТГ флуоресцентным методом (флуоресцентный зонд К-37, прибор «Зонд-3»); метод определения ХС ЛПВП с помощью набора HDL CHOL DL80 и метод определения ХС ЛПНП с помощью наборов LDL

CHOL DL80 фирмы «LACHEMA». Контроль качества ОХС и ТГ производили путем их определения в контрольной человеческой сыворотке «Serodos plus» фирмы «Нитап», а содержания ХС ЛПВП и ХС ЛПНП в прилагаемых к наборам контрольных сыворотках (LYO LIP HUM N 3x5 и LYO LIP HUM P 3x5) фирмы «LACHEMA».

В результате проведенных исследований установлено, что содержание ОХС и ТГ, определенное химическими методами в сыворотке крови пациентов, составило соответственно $5,74 \pm 0,033$ ммоль/л и $2,13 \pm 0,021$ ммоль/л. Содержание ХС, определенное ферментативным методом сухой химии, совпало с аналогичным определением химическим методом – $5,72 \pm 0,029$ ммоль/л, а содержание ТГ при таком определении оказалось на 11,3% ниже ($1,89 \pm 0,023$ ммоль/л).

При исследовании контрольной сыворотки с помощью трех методов оценки содержания ОХС (химической, ферментативный – жидкая химия, ферментативный – сухая химия) получено хорошее совпадение результатов – $6,14 \pm 0,005$ ммоль/л, $6,13 \pm 0,005$ ммоль/л и $6,13 \pm 0,003$ ммоль/л. При аналогичном анализе концентрации ТГ в контрольной сыворотке получено достоверно более высокое содержание в случае использования химического метода ($3,11 \pm 0,007$ ммоль/л) по сравнению с ферментативными методами жидкой ($3,00 \pm 0,006$ ммоль/л) и сухой химии ($3,01 \pm 0,006$ ммоль/л).

Поскольку с помощью флуоресцентного метода определяется суммарное содержание ХС и ТГ, был произведен сравнительный анализ этого метода с расчетной суммой ХС и ТГ, определенных химическими методами и ферментативными методами сухой химии: $366,4 \pm 18,59$ мг/дл (флуоресцентный метод); $400,5 \pm 18,47$ мг/дл (химические методы); $384,5 \pm 18,79$ мг/дл (сухая химия); различия не достоверны. Были вычислены коэффициенты корреляции между показателями суммы холестерина+триглицериды, полученными разными способами: коэффициент корреляции между химическим и ферментативным методом сухой химии составил $r = 0,861$, $P < 0,05$; коэффициент корреляции между флуоресцентным и химическим методами составил $r = 0,868$, $P < 0,05$; коэффициент корреляции между флуоресцентным и ферментативным методом сухой химии составил $r = 0,966$, $P < 0,05$. Таким образом, наилучшее совпадение получено между результатами флуоресцентного и ферментативного метода сухой химии. Оба этих метода предназначены для исследования небольших количеств капиллярной крови (в флуоресцентном методе 200 мкл, а в ферментативном методе сухой химии – 32 мкл). Однако, методы отличаются по времени выполнения и стоимости анализа. В флуориметрическом методе требуется 2 часа, а в методе сухой химии – не более 3 минут.

Для сравнительной оценки эффективности прямых методов определения содержания ХС ЛПВП и ХС ЛПНП по сравнению с другими методами были проведены исследования на 61 образце сыворотки крови. Найдены наименьшие расхождения при сравнении методов сухой химии и методов прямого определения ХС ЛПВП и ХС ЛПНП на 0,01% и 0,28%, соответственно. Итак, в результате проведенных исследований показано, что нет достоверных отличий между результатами определения холестерина липопротеинов сыворотки крови методами сухой и «жидкой» химии и методами прямого определения ХС ЛПВП и ХС ЛПНП.

На втором этапе работы было изучено влияние 15 веществ стероидной природы на специфичность определения ХС, ТГ, мочевой кислоты (МК) и γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) средствами сухой химии (тест-полоски и анализатор «Рефлотрон IV» фирмы «Roche»). Вещества стероидной природы добавляли в сыворотку крови в концентрации 1 мкг в пробе ($31,25$ мкг/мл). Такие концентрации возможны в крови при некоторых физиологических и патологиче-

ческих состояниях организма, например при стресс-реакции. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние веществ стероидной природы (1 мкг/проба, или 31,25 мкг/мл) на специфичность определения холестерина, триацилглицеролов, мочевой кислоты и γ -глутамилтрансферазы средствами сухой химии (%)

Вещество	ХС	ТГ	ГГТ	МК
Таурохолат Na	100,3	99,6	99,6	98,1
Таурохенодезоксихолат	100,8	99,6	99,7	97,6
Гликохенодезоксихолат	100,3	98,7	99,6	97,8
Гликоурсодезоксихолат	100,5	99,6	99,7	96,4
Хенодезоксихолат	100,0	99,6	100,0	96,4
Холат	100,3	100,0	99,7	94,0
Гликохолат	100,5	99,6	99,6	95,7
Тауроурсодезоксихолат	100,8	99,1	99,8	98,8
Урсодезоксихолат	100,5	99,1	99,6	99,8
Эстриол	100,3	99,1	99,4	100,0
Тестостерон	100,8	99,1	99,9	99,8
Кортизон	100,3	99,6	99,9	99,5
Эстрадиол	100,5	99,6	99,6	100,0
Дезоксикортикостерон	100,5	98,7	99,7	99,5
Кортикостерон-ацетат	100,8	99,6	100,0	100,0
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0

Как следует из анализа данных табл. 1, анионы желчных кислот и различные гормоны стероидной природы в дозе 31,25 мкг/мл не оказывают существенного влияния на специфичность количественного определения изучавшихся биохимических показателей сыворотки крови.

На третьем этапе исследования нами было изучено влияние ряда солей на определение количества мочевой кислоты и холестерина средствами сухой химии. Для этого были использованы следующие соли: FeCl_3 , PbCl_2 , $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CoSO_4 , NaNO_2 , NaNO_3 , KNO_3 . Объектом исследования была сливная сыворотка человека, подвергнутая однократному размораживанию, в образцы которой добавляли различные концентрации солей. Исследованные концентрации солей представлены в табл. 2 и 3. Влияние каждой концентрации соли оценивали в 8 независимых определениях. Действие неблагоприятных экологических факторов, избыточное неконтролируемое поступление минеральных пищевых добавок и геохимические особенности места проживания могут создавать условия повышения концентрации элементов в крови. Учитывая возможную роль элементов как проводников жидкости в иммобилизованных слоях, их модулирующее влияние на активность ферментов и систему образования окрашенного продукта, представляется важным оценить влияние ряда элементов (солей) на определение холестерина и мочевой кислоты средствами сухой химии.

Установлено, что процесс количественного определения холестерина и мочевой кислоты закономерно не зависит как от вида иона, так и концентрации соли (табл. 2).

Влияние ионов железа, свинца, кадмия и кобальта на специфичность количественного определения холестерина и мочевой кислоты средствами сухой химии (%)

Концентрация, мкг/дл	Холестерол	Мочевая кислота
Fe³⁺		
Контроль	100,0	100,0
1	75,6 ¹	88,0 ¹
1×10 ¹	108,2	115,1 ¹
1×10 ²	105,8	109,6 ¹
1×10 ³	97,2	106,5 ¹
1×10 ⁴	120,6 ¹	93,8
1×10 ⁵	127,9 ¹	79,8 ¹
Pb²⁺		
Контроль	100,0	100,0
1×10 ²	99,5	97,7
1×10 ³	118,1 ¹	104,2 ¹
1×10 ⁴	120,9 ¹	100,0
1×10 ⁵	123,3 ¹	72,0 ¹
Cd²⁺		
Контроль	100,0	100,0
1×10 ⁻²	116,7 ¹	104,6 ¹
1×10 ⁻¹	104,1 ¹	98,3
1	97,5	100,0
1×10 ¹	103,6 ¹	99,7
1×10 ²	100,7	99,7
1×10 ³	105,0 ¹	99,4
1×10 ⁴	98,4	107,2 ¹
1×10 ⁵	117,4 ¹	105,5 ¹
Co²⁺		
Контроль	100,0	100,0
1×10 ⁻¹	106,6 ¹	98,2
1	108,2 ¹	99,1
1×10 ¹	103,5	101,2
1×10 ²	110,2 ¹	100,9
1×10 ³	100,8	100,6
1×10 ⁴	103,7 ¹	102,7
1×10 ⁵	103,7 ¹	100,3
1×10 ⁵	109,4 ¹	80,1 ¹

Примечание: ¹ – достоверное отличие (P<0,05) по сравнению с контролем.

При проведении статистической обработки полученных данных установлено, что средняя величина определяемого холестерина при действии всех дозировок неорганических веществ (26 концентраций) составляет 107,2%, среднее квадратичное отклонение ±10,70 и ошибка средней ±2,10; средняя величина определяемой мочевой кислоты при действии всех дозировок неорганических веществ (26 концентраций) составляет 98,6%, среднее квадратичное отклонение ±9,44 и ошибка средней ±1,85. При реальных концентрациях железа (65–175 мкг/дл), свинца (<25 мкг/дл), кадмия (0,6–3,9 мкг/дл) и кобальта (0,11–0,45 мкг/дл) в сыворотке крови открываемость холестерина и мочевой

кислоты отличается от контрольных значений не более, чем на 5%. Эти данные укладываются в запрограммированную точность методов сухой химии.

В качестве примера возможного влияния экологических факторов рассмотрено действие нитратов и нитритов на аналитические процедуры средствами сухой химии (табл. 3). В результате проведенных определений не обнаружено закономерного влияния разных концентраций NaNO_2 , NaNO_3 и KNO_3 на специфичность определения холестерина и мочевой кислоты средствами сухой химии. При проведении статистической обработки полученных данных установлено, что средняя величина определяемого холестерина при действии всех дозировок NaNO_2 , NaNO_3 и KNO_3 (18 концентраций) составляет 103,6%, среднее квадратичное отклонение $\pm 5,82$ и ошибка средней $\pm 1,37$; средняя величина определяемой мочевой кислоты при действии этих же дозировок NaNO_2 , NaNO_3 и KNO_3 (18 концентраций) составляет 99,8%, среднее квадратичное отклонение $\pm 6,79$ и ошибка средней $\pm 1,60$.

Таблица 3

Влияние NaNO_2 , NaNO_3 и KNO_3 на специфичность определения холестерина и мочевой кислоты средствами сухой химии (%)

Концентрация, мг/дл	Холестерол	Мочевая кислота
NaNO_2		
Контроль	100,0	100,0
25×10^{-3}	107,4 ¹	105,1 ¹
25×10^{-2}	98,7	105,1 ¹
25×10^{-1}	104,0 ¹	103,6 ¹
25	106,5 ¹	104,2 ¹
25×10^1	108,0 ¹	104,5 ¹
25×10^2	115,4 ¹	109,2 ¹
NaNO_3		
Контроль	100,0	100,0
15×10^{-3}	99,6	97,9
15×10^{-2}	108,8 ¹	100,2
15×10^{-1}	109,4 ¹	100,0
15	100,0	92,0 ¹
15×10^1	101,1	87,1 ¹
15×10^2	95,8 ¹	82,0 ¹
KNO_3		
Контроль	100,0	100,0
15×10^{-3}	105,3 ¹	100,6
15×10^{-2}	92,2 ¹	103,0 ¹
15×10^{-1}	107,3 ¹	100,9
15	105,2 ¹	101,8
15×10^1	104,8 ¹	103,3 ¹
15×10^2	95,6 ¹	96,1 ¹

Примечание: ¹ – достоверное отличие ($P < 0,05$) по сравнению с контролем.

Анализируя влияние неорганических веществ на функционирование ферментативных систем специфичного определения холестерина и мочевой кислоты средствами сухой химии, следует констатировать отсутствие закономерного влияния, связанного с концентрацией того или иного иона. Величины

определяемых показателей в присутствии тех или иных ионов могут отличаться от контрольных проб в пределах ошибки методов сухой химии.

Итак, в результате проведенных исследований не было обнаружено статистически достоверных отличий при сравнении трех методических подходов к определению холестерина липопротеинов сыворотки крови средствами сухой химии, жидкой химии и прямым определением ХС ЛПВП и ХС ЛПНП. Наименьшие расхождения обнаружены при сравнении методов сухой химии и методов прямого определения ХС ЛПВП и ХС ЛПНП. Различные вещества стероидной природы в дозе 31,25 мкг/мл не оказывают влияния на определение холестерина, триацилглицеролов и активности γ -глутамилтрансферазы. Препараты желчных кислот, за исключением урсодезоксихолевой кислоты, незначительно уменьшают количество определяемой мочевой кислоты. Все испытанные гормоны стероидной природы, а также катионы и анионы не оказали закономерного влияния на специфичность определения холестерина и мочевой кислоты в сыворотке крови. На основании вышеизложенного можно считать, что средства сухой химии могут применяться для количественного исследования сыворотки крови в условиях действия неблагоприятных экологических факторов и стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lehtinen P., Menjo L., Makinen M.-L.* All-in-one dry-reagent chemistry concept // CCLM, 1999, vol. 37. – Special Suppl. – S. 408.
2. *Меньшиков В.В.* Современные возможности клинической лабораторной аналитики // Клин. лаб. диагностика, 2000, № 3. – С. 25–38.
3. *Fukuda A., Ishida H., Kubota M., Kojima Y.* Usefulness of POCT in critical care medicine // Rinsho-Byori, 1999, vol. 47, № 12. – P. 1113–1118.
4. *Меньшиков В.В.* Требования к аналитическим средствам лабораторного обеспечения внебольничной медицинской помощи // Клин. лаб. диагностика, 2001, № 9. – С. 5–6.
5. *Price C.P.* Medical (and economic) outcomes in point of care testing // Clin. Chem. Lab. Med., 2001, vol. 39, Sppl. – P. S29.
6. *Ehrmeyer S.S.* POCT: perspective and experience from the USA // Clin. Chem. Lab. Med., 2001, vol. 39, Sppl. – P. S71.
7. *Plebani M.* Errors in laboratory medicine // Clin. Chem. Lab. Med., 2001, vol. 39, Sppl. – P. S77.
8. *Veselinovic S., Jelic-Ivanovic Z., Vucic D.* Kodak EKTACHEM 250 cholesterol assay compared with other routine analytical methods // CCLM, 1999, vol. 37. – Special Suppl. – S. 388.
9. *Genta V.M., Wilson C., Greiber D.M.* Evaluation of Reflotron PlusTM for determining blood cholesterol levels at Point of Care Testing Sites // Clin. Chem., 1997, vol. 43, № 6. – P. S260.

S U M M A R Y

The article compares three methodical approaches to determining the contents of lipoprotein cholesterol of the blood serum by means of dry chemistry, liquid chemistry and the direct determining of HDL and LDL.

Поступила в редакцию 6.03.2006