

Н. В. Дрягина¹ В. В. Слепышева², А. В. Козлов²,
канд. мед. наук докт. мед. наук

¹ Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова, Санкт-Петербург
² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Проблема количественного определения концентрации белка в биологических жидкостях для клинических целей в настоящее время в целом решена, хотя определенные методические сложности встречаются при определении низких концентраций белка, которые характерны для мочи, спинномозговой, синовиальной, слезной, выпотной и других жидких сред организма [1]. Многие компании выпускают тест-системы, в которых используется реакция между белками в исследуемом материале и красителем пирогаллоловым красным (ПГК) с образованием комплекса с максимумом поглощения при длине волны 600 нм [2]. Аргументы в пользу выбора конкретной тест-системы для решения задач, поставленных перед лабораторией, изложены в ряде обстоятельных обзоров и статей, как отечественных, так и зарубежных [3, 4]. В настоящее время стоит вопрос о широком внедрении в практическую деятельность методов определения концентрации белков с помощью пирогаллолового метода. Важным представляется широкое ознакомление лабораторной общественности с достоинствами данного метода по сравнению с рутинными процедурами. Последнее относится к определению концентрации белка в спинномозговой жидкости [5, 6].

Между тем, точное определение белка в ликворе при кажущейся простоте сопряжено с рядом трудностей: низким содержанием белка в нем; значительными вариациями состава белка ликвора при разных заболеваниях ЦНС, что затрудняет выбор калибровочного материала; невозможностью получения большого объема исследуемого материала.

Цель исследования состояла в сравнении результатов определения концентрации белка в спинномозговой жидкости (СМЖ) биуретовым методом, турбидиметрическим методом, основанным на связывании белка и красителя ПГК в неавтоматизированном исполнении и адаптированном к биохимическому анализатору Hitachi 902. Сравнению подвергли 30 образцов ликвора, полученных у больных (возраст 15–63 года), находившихся на лечении в РНХИ им. проф. А. Л. Поленова.

Аналитические процедуры

1. При турбидиметрическом методе концентрацию белка в СМЖ определяли с использованием сульфосалициловой кислоты и сульфата натрия в соответствии с «Методическими указаниями по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований» [7]. Фотометрию проводили через 10 мин против контроля в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 670 нм, фотометр КФК-3.

2. Биуретовый метод. Поскольку чувствительность биуретового метода, используемого в лабораториях для определения концентрации белка в сыворотке крови, недостаточна для определения белка в СМЖ, использовали модификацию, включающую дополнительный этап — осаждение белка исследуемого образца СМЖ трихлоруксусной кислотой [8]. Определение проводили в два этапа:

1) осаждение белка СМЖ трихлоруксусной кислотой (100 г/л), центрифугирование и растворение осадка в 1,0 мл раствора NaOH (0,4 моль/л);

2) проведение биуретовой реакции после растворения осадка.

Построение калибровочного графика

Калибровочный график строили, используя основной раствор альбумина с концентрацией 10 г/л. Концентрацию белка в исследуемом образце рассчитывали с помощью калибровочного коэффициента, рассчитанного по данным калибровочного графика.

3. Метод, основанный на связывании белка с пирогаллоловым красным (тест-система «КлиниТест-БМ ПГК М», производитель НПЦ «Эко-Сервис»). Концентрацию определяли в соответствии с рекомендациями компании производителя. Соотношение: объем рабочего реактива/образец — 40:1. Фотометрию проводили через 15 мин против холостой пробы в кювете с толщиной поглощающего слоя 0,5 см при длине волны 600 нм, фотометр КФК-3.

4. Метод, основанный на связывании белка с пирогаллоловым красным (тест-система «КлиниТест-БМ ПГК М», адаптация к автоанализатору

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

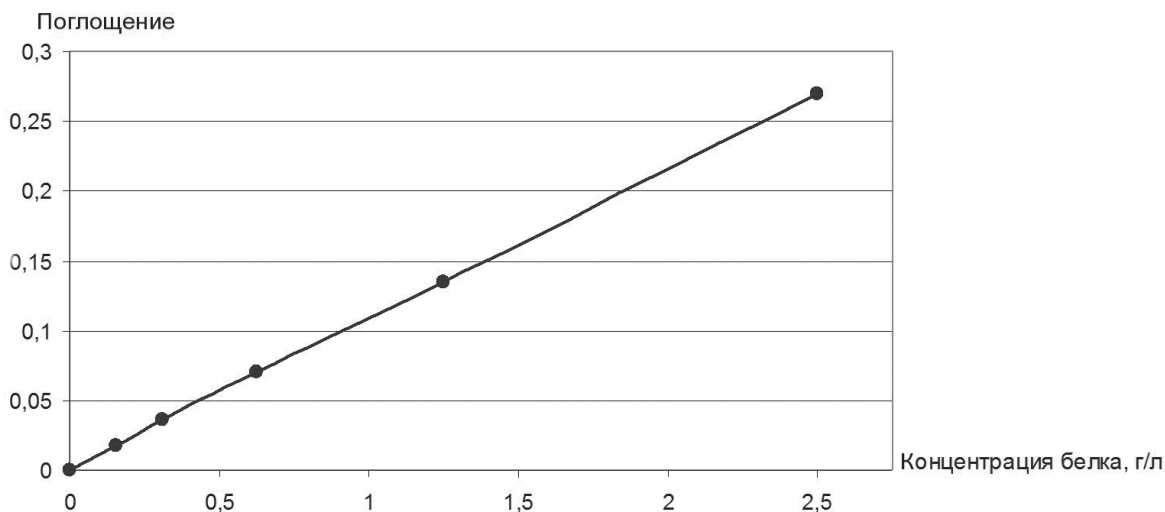


Рис. 1. Калибровочный график для определения концентрации белка в спинномозговой жидкости (турбидиметрический метод)

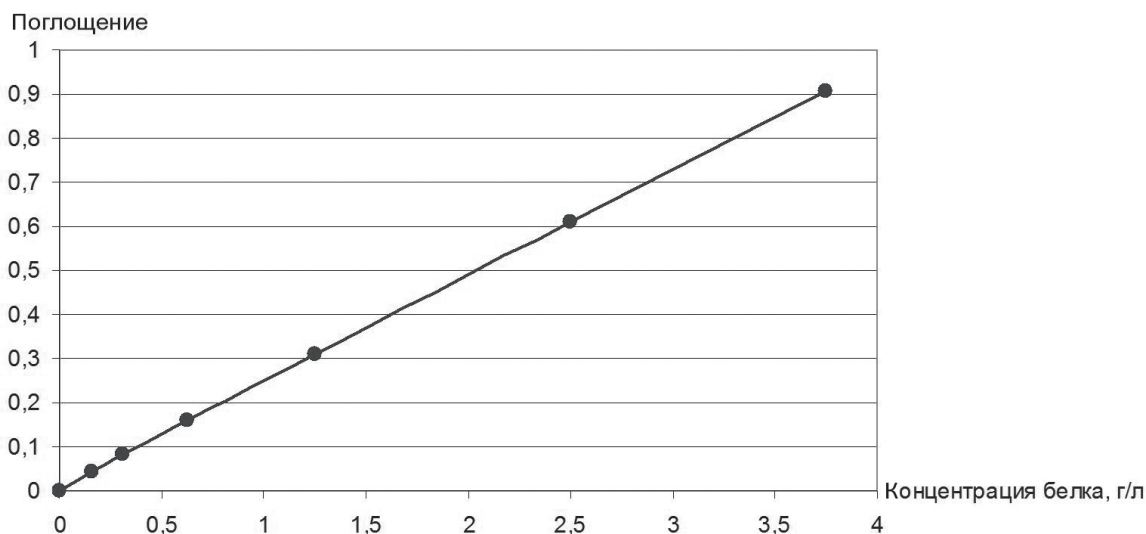


Рис. 2. Калибровочный график для определения концентрации белка в спинномозговой жидкости (биуретовый метод)

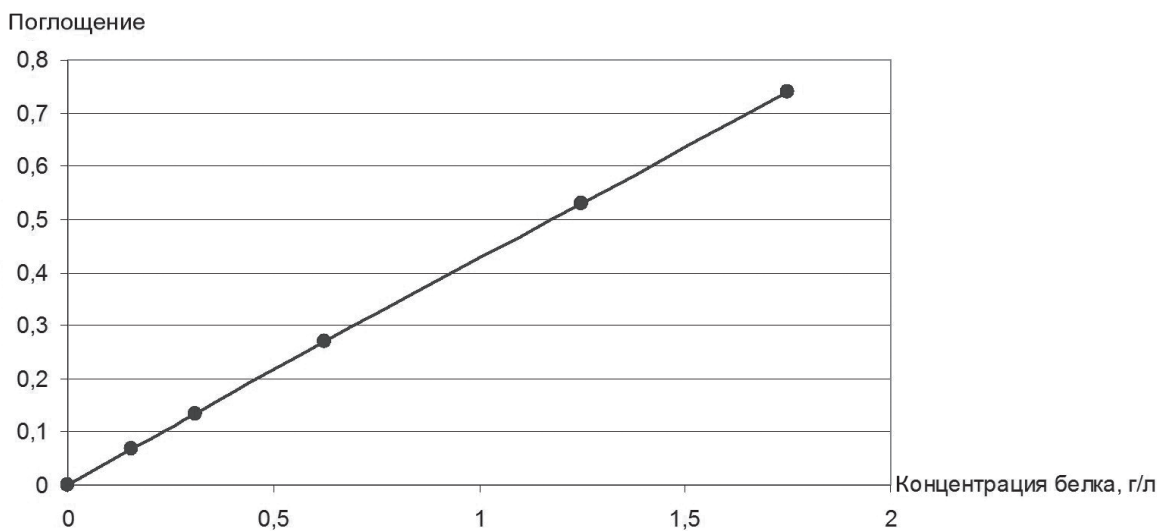


Рис. 3. Калибровочный график для определения концентрации белка в спинномозговой жидкости (пирогалловый метод неавтоматизированный)

Hitachi 902). Объем реактива — 280 мкл, объем образца — 7 мкл, соотношение 40:1. Время реакции — 10 мин. Фотометрия при основной длине волны 600 нм, вспомогательная длина волны — 700 нм, измерение — по двум точкам.

Результаты и обсуждение

Особенности калибровочных графиков

Калибровочные графики представлены на рис. 1, 2, 3.

Как следует из представленных на рис. 1–3 данных, все калибровочные графики отличаются по существенной для любого аналитического метода характеристике — величине линейной зависимости между поглощением и концентрацией. Для турбидиметрического метода она сохраняется до 2,5 г/л, для биуретового метода — до 3,75 г/л, для неавтоматизированного пирогаллолового метода — до 1,75 г/л. Линейная зависимость между результатами автоматизированного пирогаллолового и биуретового метода, использованного в качестве «референтного», сохранялась до 2,0 г/л (рис. 4).

Сравнение графиков указывает на то, что пирогаллоловый метод обладает более высокой чувствительностью. На это указывает и то, что концентрации белка 0,5 г/л в турбидиметрическом методе соответствует величина поглощения 0,056, в биуретовом — 0,136, в методе с ПГК — 0,220.

Как следует из представленных на рис. 5 данных, при определении концентрации белка в СМЖ у нейрохирургических больных использованными нами методами статистической разницы в результатах выявлено не было ($p > 0,05$). Коэффициент корреляции с результатами биуретового метода, использованно-

го в качестве референтного, составляет: $r = 0,995$ — для турбидиметрического метода, $r = 0,994$ — для пирогаллолового неавтоматизированного (ручного) и $r = 0,994$ — для пирогаллолового автоматизированного метода.

Таким образом, полученные нами результаты, а также литературные данные указывают на то, что для корректного определения концентрации белка в СМЖ следует отдавать предпочтение методу, основанному на связывании ПГК. Существенным аргументом в пользу использования пирогаллолового метода является то, что для биуретового метода необходим дополнительный этап — депротеинизация. Это не только усложняет саму процедуру, но и требует большего объема СМЖ.

Проблемы выбора метода. При выборе конкретного метода для количественного определения белка в СМЖ следует руководствоваться следующими соображениями:

- величиной затрат на исследование с учетом стоимости реактивов, оборудования, времени, необходимого для его выполнения, и квалификации персонала лаборатории;
- аналитическими характеристиками метода, включающими чувствительность, специфичность, надежность;
- устойчивостью к воздействию экзогенных и эндогенных соединений, колебаниям белкового состава СМЖ;
- понятно, что в повседневной работе лаборатории даже при небольшом потоке образцов биуретовый метод представляется неудобным из-за большого числа операций; в то же время, он характеризуется высокой

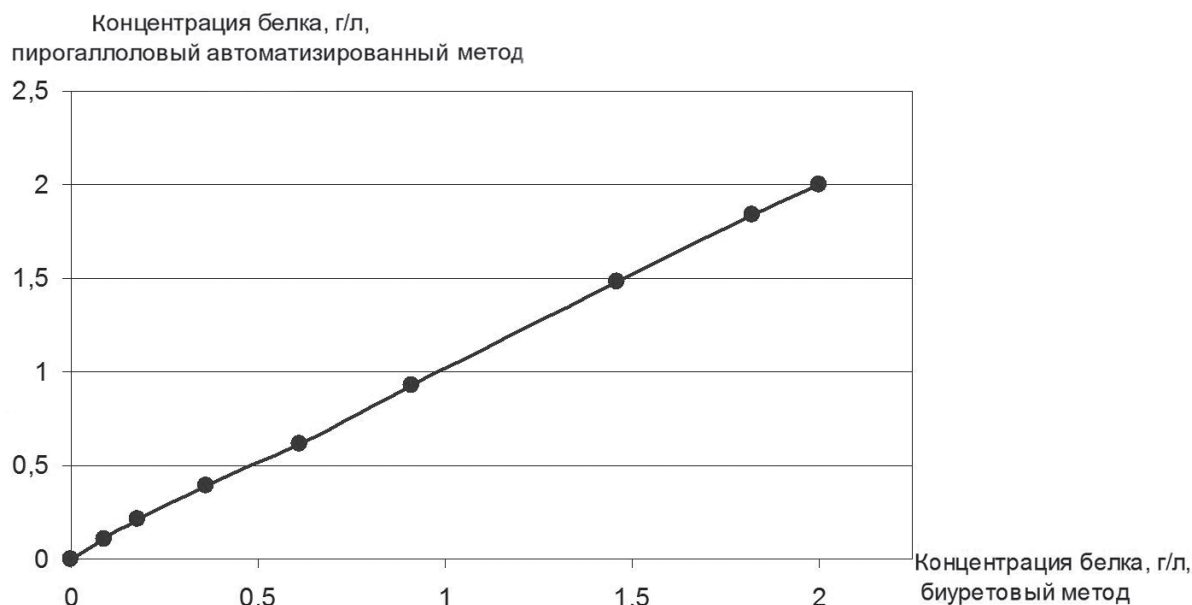


Рис. 4. Сравнение результатов определения концентрации белка в спинномозговой жидкости двумя методами — пирогаллоловым автоматизированным и биуретовым

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Концентрация белка в СМЖ, г/л

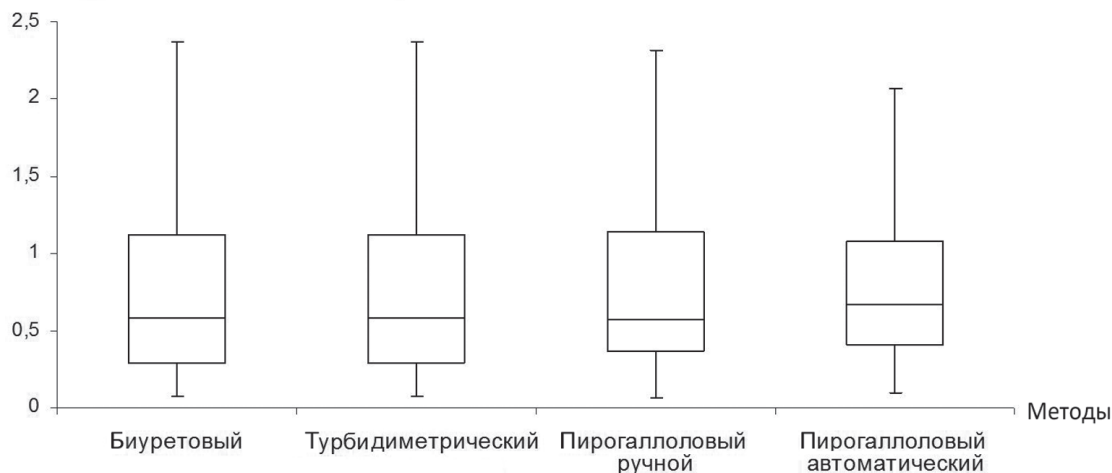


Рис. 5. Концентрация белка в СМЖ у нейрохирургических больных, определенная разными методами

аналитической надежностью, позволяет определять белок в широком диапазоне концентраций;

- судя по данным литературы и собственному опыту, турбидиметрический метод количественного определения белка в СМЖ, несмотря на сохранение линейной зависимости между поглощением и концентрацией до 2,5 г/л, плохо поддается стандартизации, что может приводить к получению ошибочных результатов; тем не менее, данный метод в настоящее время все еще используется в лабораториях из-за невысокой стоимости и доступности реактивов;
- если исключить экономический аспект, методы, основанные на связывании белка с ПГК, выполняются при небольшом количестве операций, не требуют высокой квалификации персонала; достаточная чувствительность, хорошая воспроизводимость и легкость адаптации к автоанализаторам делают их методами выбора для определения концентрации белка в СМЖ.

Выводы

Различий в результатах определения концентрации белка в спинномозговой жидкости использованными в работе методами выявлено не было.

Для турбидиметрического метода основным недостатком является низкая чувствительность.

Метод с использованием ПГК и тест-системы «КлиниТест-БМ ПГК М» компании «Эко-Сервис» прост в исполнении и легко поддается адаптации к биохимическому анализатору.

Линейная зависимость между величиной поглощения и концентрацией белка сохраняется до 2,0 г/л при использовании адаптированного к анализатору метода по сравнению с 1,75 г/л в «ручном» исполнении.

Результаты, полученные неавтоматизированным методом с использованием ПГК, хорошо коррелируют с результатами «референтного» биуретового метода. Метод прост в исполнении, недорогой (около 3 рублей одно определение).

Литература

1. Koller A. Total urinary protein // In: Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation. L. A. Kaplan, A. S. Pesce (eds.), 1984. P. 1319–1325.
2. Watanabe N., Kamel S., Ohkubo A. et al. Urinary protein as measured with a Pyrogallol-Red-Molybdate complex manually and in a Hitachi 726 automated analyzer // Clin. Chem. 1986. Vol. 32. P. 1551–1554.
3. Пушкова В. И., Прасолова Л. М. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости: Информ.-метод. пособие. ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ». Кольцово, 2005.
4. A manual of laboratory & diagnostic tests / Fischbach F., Dunning M. (eds.), 7th ed. Philadelphia, 2004.
5. Макаров А. Ю. Клиническая ликворология. Л.: Медицина, 1984.
6. Pesce M. A., Strande C. S. A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine // Clin. Chem. 1973. Vol. 19. № 11. P. 1265–1273.
7. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / Под ред. В.В. Меньшикова. М., 1973.
8. Козлов А. В. Протеинурия. Методы ее выявления. Тверь: Триада, 2008.