© Коллектив авторов, 1998
УДК 616.61-074:543.865

Ф.А.Тугушева, И.М.Зубина, А.И.Куликова, В.В.Козлов, И.Б.Бондаренко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ И ЭФФЕКТИВНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬБУМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОЧЕК

F.A.Tugusheva, I.M.Zubina, A.I.Kulikova, V.V.Kozlov, I.B.Bondarenko

THE USE OF THE FLUORESCENT METHOD OF DETERMINATION OF THE TOTAL AND THE EFFECTIVE SERUM ALBUMIN CONCENTRATION IN PATIENTS WITH RENAL DISEASES

Научно-исследовательский институт нефрологии и лаборатория урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им.акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Первой задачей настоящего исследования явилось изучение возможности использования флюориметрического метода для определения общей концентрации альбумина (ОКА) в сыворотке крови. Этот метод позволяет в одной и той же пробе определить не только величину ОКА, но и величину эффективной концентрации альбумина (ЭКА), равную количеству альбумина со свободными центрами связывания лигандов, а также рассчитать резерв связывающей способности альбумина (РСА). В качестве референтных были выбраны унифицированный метод электрофореза на пластинах из полиацетатцеллюлозы и спектрофотометрический метод с красителем бромкрезоловым зеленым. Все три метода дают хорошо совпадающие и высоко коррелирующие между собой результаты. Однако флюориметрический метод дает систематическое занижение по сравнению с результатами, полученными при использовании унифицированных методов (в пределах от 1,8 до 2,4 г/л). Более детальное сравнение референтных методов с флюориметрическим показало, что взаимосвязь между ними носит характер гиперболы, хотя отклонение от линейности находится в пределах стандартной ошибки методов. Вторая задача работы состояла в выяснении информативности величин ОКА, ЭКА, РСА и индекса токсичности (ИТ) у различных групп больных с заболеваниями почек. Выявлено, что у больных с обострением хронического пиелонефрита изученные параметры не отличаются от величин в группе внутрибольничного контроля. В то же время обострение хронического гломерулонефрита приводит к снижению величин ОКА, ЭКА и РСА и увеличению уровня ИТ. Такая же картина наблюдается у больных с нарушением функции почек в стадии II и особенно у пациентов, получающих лечение регулярным гемодиализом. Метод определения ОКА, ЭКА, РСА и ИТ может быть рекомендован в практику лечебно-диагностических подразделений в силу его простоты, быстроты, экономичности и, главное, информативности.

Ключевые слова: альбумин, флюоресцентный метод, заболевания почек.

ABSTRACT

The first aim of the investigation was to reveal the possibility to use the fluorescent method (FM) of determination of the serum albumin concentration (AC) in clinical practice. On the one hand, this method allows not only to evaluate the AC, but also to determine the level of the effective AC (EAC) in the same serum sample. EAC is the concentration of serum albumin with free centres for ligand binding. We can also calculate the value of the reserve of the albumin binding capacity (RABC).The FM was compared with the standard electrophoretic method and the standard spectrophotometric one based on the reaction between albumin and bromcresol green. The results obtained by the three methods are very close to each other and the correlation between them is very high. But the levels of AC determined with the help of the FM are 1.8—2.4 g/l lower than that obtained with the help of the two others. There are nonlinear correlations between the FM and the standard ones. But the degree of deviations is not higher than the standard error of the methods. The second aim of the study was to reveal whether the levels of the AC, EAC, RABC and the toxicity index (TI) can be useful in practice of the nephrological clinic. It was found that in case of chronic pyelonephritis all the indices were equal to those in the control group. The acute phase of chronic glomerulonephritis is characterised by the decrease of AC, EAC, RABC and the increase of IT. The same tendencies are revealed in patients with the second stage of chronic renal insufficiency, and, especially, in patients treated with chronic hemodialysis. The FM of the AC, EAC, RABC and IT determination can be recommended in everyday practice of clinical departments due to its simplicity, quickness, economic effect, and, of course, usefulness in control of patients.

Kye words: albumin, fluorescent method, renal diseases.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что альбумин выполняет в организме две основные функции: поддержание онкотического давления крови и транспортную. Транспортная функция связана в первую очередь с универсальными комплексообразующими свойствами этого белка, который способен избирательно и обратимо фиксировать на своей поверхности вещества различного химического строения [2].

Связывание и транспорт низкомолекулярных метаболитов и токсинов как эндогенного (билирубин, неэтерифицированные жирные кислоты), так и экзогенного (лекарственные препараты) происхождения, является важным фактором регуляции их биологической активности и скорости элиминации из кровеносного русла [1].

Связывающая способность альбумина определена особенностями его структуры. Альбумин сыворотки человека содержит 586 аминокислотных остатков, степень альфа-спирализации молекулы составляет 50—55%, а 34 из 35 остатков цистеина соединены между собой дисульфидными связями, которые сшивают молекулу так, что образуется 9 петель. Более детальное исследование позволило выделить три повторяющиеся сходные структуры — «домены» [9]. В молекуле альбумина идентифицированы целый ряд центров связывания лигандов, каждый из которых характеризуется присущими ему стереохимическими чертами, и специфичностью. Так, установлено, что молекула альбумина имеет один центр связывания билирубина, фиксирующий пигмент наиболее прочно и специфично (петля 4), а также еще несколько вторичных центров с менее высокими константами связывания. Выделены как минимум четыре центра связывания для свободных жирных кислот.

Для них характерны структурная специфичность и недоступность для других органических лигандов. Установлена локализация высокостереоспецифичного центра фиксации L-триптофана. Кроме того, исследователи выделяют два центра связывания лекарственных препаратов, белков и флюоресцентных зондов [9]. Следует отметить, что описать свойства центров достаточно трудно, так как константа связывания одного центра зависит от того, какие лиганды связаны с другими центрами этой же молекулы альбумина (так называемая «кооперативность» связывания лигандов) [1, 7]. Молекула альбумина так чувствительна к слабым влияниям потому, что центры связывания формируются за счет гидрофобных взаимодействий между различными участками полипептидной цепи. В настоящее время для исследования центров связывания альбумина наиболее широко используются флюоресцентные зонды, так как они связываются с молекулой протеина обратимо (т. е. нековалентно), и, кроме того, степень флюоресценции очень сильно зависит от окружения молекулы зонда [1]. Кроме того, флюоресцентные методы просты, их проведение занимает очень мало времени, а чувствительность их в 100 раз и более выше общепринятых. При взаимодействии с альбумином зонды связываются с центрами, предназначенными для реакции с метаболитами, в результате чего флюоресценция зондов возрастает в сотни раз. Наиболее часто способность альбумина связывать метаболиты снижается при развитии почечной и печеночной недостаточности — иногда более чем в 10 раз [1, 4]. Так, например, при изучении хронической уремии было доказано, что причиной уменьшения связывающей способности альбумина является накопление в крови низкомолекулярных соединений, блокирующих центры связывания по конкурентному механизму [5].

Среди отечественных ученых наибольшую популярность получил флюориметрический метод определения связывающей способности альбумина с использованием зонда К-35, синтезированного Б.М.Красовицким, Л.И.Кормиловой и И.Г.Ермоленко (НПО «Монокристаллреактив», г. Харьков, Украина). В зависимости от условий проведения анализа этот зонд позволяет в одной и той же пробе, содержащей минимальное количество анализируемой сыворотки крови, определить величину как общей концентрации альбуминовых центров, которая пропорциональна общей концентрации альбумина (ОКА), так и эффективной концентрации альбумина (ЭКА), пропорциональной количеству альбумина со свободными центрами связывания [1]. Затем, на основании полученных данных, можно рассчитать величину резерва связывания альбумина, которая характеризует долю оставшейся связывающей способности этого белка (%):

$$\text{РСА} = \frac{\text{ЭКА}}{\text{ОКА}} \times 100\%,$$

а также индекс токсичности (ИТ), отражающий долю альбумина, связанного с метаболитами [1]:

$$\text{ИТ} = \frac{\text{ОКА}}{\text{ЭКА}} - 1.$$

Таким образом, простой, быстрый и экономичный флюоресцентный метод может оказаться очень полезным и эффективным в клинической практике.

Однако вначале представляется целесообразным проверить, насколько флюоресцентный метод определения ОКА соответствует общепринятым в лабораторной практике методам анализа.

Целью настоящей работы явилось, во-первых, сравнение трех методов определения ОКА: флюоресцентного с помощью зонда К-35 (Афл), унифицированного метода определения ОКА путем электрофореза на пластинах из полиацетатцеллюлозы (Аэф) и унифицированного спектрофотометрического метода регистрации цветного комплекса альбумина с красителем бромкрезоловым зеленым (Абкз). Второй задачей работы стало выяснение, насколько информативны величины ОКА, ЭКА, РСА и ИТ у различных групп больных с заболеваниями почек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

С целью сравнения трех методов определения ОКА материалом для анализа служила сыворотка крови 65 больных, находящихся на лечении в терапевтических и нефрологических отделениях клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Определение величин Аэф и Абкз проводили в соответствии с общепринятыми нормами [3]. Величину Афл определяли на анализаторе АКЛ-1 с помощью набора реактивов «ЗОНД-АЛЬБУМИН», разработанного в НИИ физико-химической медицины Минздравмедпрома РФ и выпущенного государственным малым предприятием НИМВЦ ЗОНД. Исследования проводили точно по описанной методике [1]. Для решения второй поставленной задачи исследования величины ОКА, ЭКА, РСА и ИТ определены в сыворотке крови следующих групп больных: группа внутрибольничного контроля, в которую вошли 12 пациентов преимущественно с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью и без какой-либо патологии почек (больные обследованы перед выпиской из стационара); 8 больных с хроническим пиелонефритом в стадии обострения; 18 пациентов, страдающих хроническим гломерулонефритом (ХГН) и поступивших в стационар в стадии обострения (у 7 из них зафиксирован нефротический синдром, у всех больных этой группы функция почек сохранена); больные с ХГН в стадии хронической почечной недостаточности (ХПН): в стадии I — 6 человек, в стадии ХПН II — 7 пациентов; больные в терминальной стадии ХПН, получающие лечение регулярным бикарбонатным гемодиализом, — 29 человек.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенной на первом этапе работы получены следующие значения ОКА, определенные тремя независимыми методами: Аэф = 37,29±1,12, Абкз = 36,73±1,23, Афл = 34,86±0,91 г/л ($\bar{X}$±m; n = 65). Как видно из приведенных в табл. 1 данных, все три метода дают хорошо совпадающие между собой результаты. Наилучшее совпадение получено между электрофоретическим и спектрофотометрическим методами, о чем говорят самые высокие величины коэффициентов линейной корреляции и ранговой корреляции Спирмена, а также отсутствие систематического расхождения данных между собой. Проведенный множественный регрессионный анализ показал, что между величинами Аэф и Абкз имеется надежная линейная связь, описываемая уравнением:

Таблица 1

Степень совпадения различных методов определения уровня альбумина (ОКА), оцениваемая по величинам коэффициентов линейной корреляции (r), ранговой корреляции Спирмена (Rs) и по величинам абсолютных отклонений (x–y)

Методы определения ОКА		r	Rs	x–y	td
x	y				
Абкз	Аэф	0,833 (p=0,001)	0,717 (p=0,001)	–0,570	–0,830 (p=0,410)
Абкз	Афл	0,692 (p=0,001)	0,579 (p=0,001)	1,865	2,099 (p=0,040)
Аэф	Афл	0,612 (p=0,001)	0,515 (p=0,001)	2,435	2,702 (p=0,009)

$$Абкз = 2{,}59+0{,}915 \times Аэф;$$
$$R^2 = 0{,}69;\ F = 142{,}68;\ p<0{,}0001.$$

Флюориметрический метод определения ОКА также хорошо коррелирует с общепринятыми унифицированными методами. Однако обращает на себя внимание, что между величинами Афл по сравнению со значениями Аэф и Абкз имеется систематическое абсолютное отклонение небольшой величины: в среднем 2,435±0,901 и 1,87±0,889 г/л ($\bar{X}$±m), соответственно, в сторону занижения данных, определенных флюориметрически. Более детальный анализ выявил, что отклонение данных друг от друга зависит от диапазона концентрации альбумина: когда ОКА ниже нормальных значений, то величина Афл несколько выше величин Аэф и Абкз; и наоборот — при нормальных значениях ОКА уровень Афл чуть ниже значений Аэф и Абкз. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что между величинами Афл и Аэф, а также величинами Афл и Абкз существует взаимосвязь, отличающаяся от линейной. Проведенный впоследствии множественный регрессионный анализ подтвердил это утверждение. Кроме линейных моделей, описывающих взаимосвязь между данными флюоресцентного и обоих референтных методов, имеется целый ряд нелинейных, степень надежности и достоверности которых намного выше. Из

множества полученных уравнений нелинейной регрессии наиболее точными оказались два. Так, зависимость между величинами Афл и Аэф выражается уравнением:

$$Аэф = 62{,}96 - \frac{851{,}87}{Афл};$$

$$R^2 = 0{,}46;\ F = 55{,}18;\ p<0{,}0001.$$

В качестве иллюстрации отношений величин Афл и Абкз можно привести уравнение:

$$Абкз = 67{,}42 - \frac{1019{,}01}{Афл};$$

$$R^2 = 0{,}55;\ F = 77{,}97;\ p<0{,}0001.$$

Оба эти уравнения (впрочем, как и все другие, полученные в ходе анализа результатов) графически выражаются гиперболой. На рисунке представлены графики зависимости между величинами Абкз и Афл, а также между значениями Аэф и Афл. При этом следует еще раз отметить, что все три метода дают достоверно совпадающие между собой результаты, а абсолютные отклонения данных, полученных разными способами, не выходят за пределы стандартной ошибки методов.

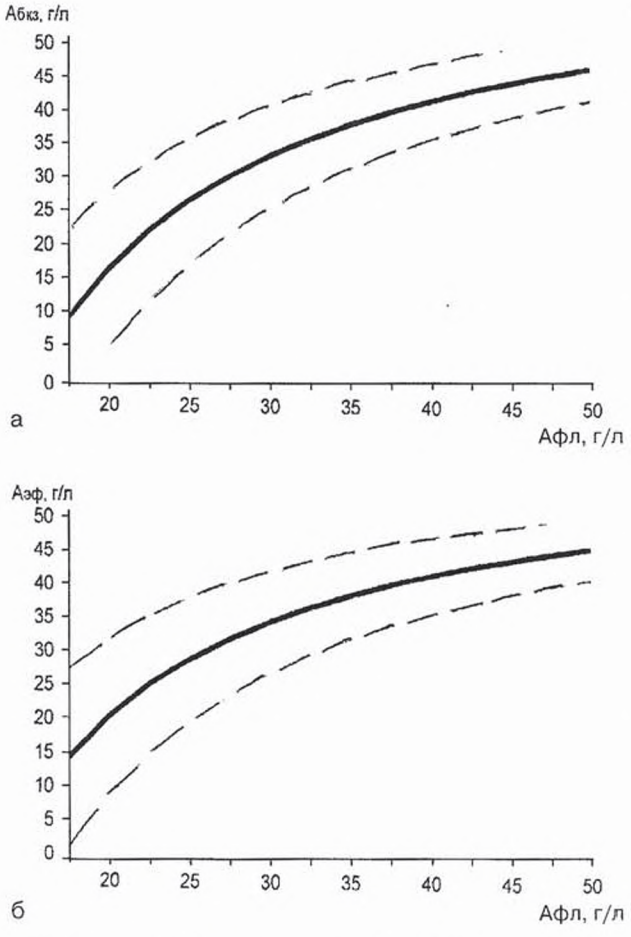

График зависимости между величинами МКА, полученными флюоресцентным методом и спектрофотометрическим методом с бромкрезоловым зеленым (а), а также методом электрофореза на пластинах из полиацетатцеллюлозы (б).

Пунктирной линией обозначена граница 95% доверительного интервала для регрессионной кривой.

Результаты проведенной работы, полученные на втором этапе исследований, представлены в табл. 2. Как видно из приведенных данных, величины ОКА, ЭКА, РСА и ИТ у больных с хроническим пиелонефритом в стадии обострения достоверно не отличаются от данных, полученных при анализе сыворотки крови больных-реконвалесцентов, не страдающих какой-либо почечной патологией. Однако у больных с ХГН в стадии обострения происходит достоверное падение ОКА, ЭКА (приблизительно на треть) и РСА, а величина ИТ, наоборот, возрастает в 2 раза. Сходные нарушения наблюдаются в крови больных с ХГН, сочетающимся с нефротическим синдромом. Причем, у пациентов с нефротическим синдромом выявлены самые низкие уровни ОКА и ЭКА. Однако значения РСА практически такие же, что и у больных с ХГН в стадии обострения, но без нефротического синдрома. Данные пациентов с начальной стадией ХПН ничем не отличаются от данных больных из группы внутрибольничного контроля. Однако при нарастании степени нарушения функции почек до ХПН II сохранный уровень ОКА сочетается со значительным падением величин ЭКА и, соответственно, РСА. Величина ИТ при этом возрастает в 2,8 раза. У больных на регулярном гемодиализе наблюдается достоверное, хотя и небольшое, уменьшение ОКА, выраженное падение величины ЭКА и, соответствеено, самое значительное снижение величины РСА и повышение ИТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенная работа свидетельствует, что метод флюориметрического определения ОКА с помощью зонда К-35 дает результаты, практически совпадающие с данными унифицированных методов анализа. Хотя величина Афл дает систематическое абсолютное отклонение от величин Аэф и Абкз, тем не менее это отклонение, составляя величину 1,9—2,5 г/л, не вносит существенной ошибки в определение. Проведенные нами затем более детальные исследования взаимосвязи между обсуждаемыми тремя методами определения ОКА позволили выявить, что данные, полученные флюориметрическим методом, находятся в нелинейной связи с величинами Аэф и Абкз. Эти данные несколько отличаются от результатов других авторов [1, 6]. Возможно, что для простоты восприятия исследователи приводят только уравнения линейной взаимосвязи между данными, полу-

ченными флюоресцентным и референтными методами. Однако при рассмотрении как простых линейных, так и сложных нелинейных моделей максимальная величина абсолютного отклонения составляет, в среднем, не более 4 г/л, т. е. не превышает величины стандартного отклонения.

Как уже указывалось выше, самым большим преимуществом флюориметрического метода определения ОКА с помощью зонда К-35 является то, что в одной и той же пробе возможно определить также и величину ЭКА. Последняя дает возможность рассчитать значение РСА и другие величины, которые говорят о степени функциональной полноценности альбумина. Насколько информативны и интересны эти параметры, мы попытались выяснить на втором этапе наших исследований. Проведенная работа выявила, что различные группы пациентов достоверно отличаются друг от друга по величинам ОКА, ЭКА, РСА и ИТ, причем каждый вариант патологии или клинического течения имеет свои отличительные особенности. Так, данные больных с хроническим пиелонефритом не отличаются от данных пациентов с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью. В то же время, обострение ХГН (особенно при развитии нефротического синдрома) у больных с сохранной функцией почек приводит к значительному и достоверному изменению всех изученных параметров. Однако резерв связывающей способности альбумина (а следовательно — индекс токсичности) одинаков как у пациентов с нефротическим синдромом, так и без него. Следовательно, резкое снижение величин ОКА и ЭКА связано исключительно с задержкой в организме воды и потерей альбумина с мочой без дополнительного уменьшения резерва связывающей способности альбумина. Очень интересно, что у больных на I стадии ХПН отмечается своего рода «стабилизация» как содержания, так и функциональной активности альбумина. Но уже на стадии ХПН II происходит значительное падение величин РСА и ЭКА и более чем трехкратное повышение ИТ. Возможно это связано с накоплением в крови уремических больных метаболитов ароматических аминокислот или других продуктов азотистого обмена [8]. Дальнейшее усугубление состояния развивается у больных с ХПН III: именно у них выявлено самое неблагоприятное состояние всех изученных нами в настоящем исследовании показателей. Без сомнения, проведенная нами работа требует дальнейшего продолжения и развития, дополнительного набора данных и их анализа. Однако уже на данном этапе можно сказать, что определение величин ОКА, ЭКА, РСА и ИТ может быть полезным в определении степени интоксикации больного, наличия или, наоборот, отсутствия у него обострения и т. д. путем оценки функциональных свойств альбумина. Параметром, который изменяется в самой большой степени, является величина ИТ. Именно этот показатель может в дальнейшем оказаться самым информативным для оперативного наблюдения за больными с почечной патологией. При этом необходимо выяснить, какие метаболиты конкретно занимают центры связывания альбумина, снижая величины ЭКА и РСА. Именно в этом направлении мы предполагаем вести наши дальнейшие исследования.

Таблица 2

Величины общей концентрации альбумина (ОКА), эффективной концентрации альбумина (ЭКА), резерва связывания альбумина (РСА) и индекса токсичности (ИТ) в различных группах обследованных больных ($\bar{X} \pm m$)

Группа обследованных пациентов	Число наблюдений	ОКА, г/л	ЭКА, г/л	РСА, %	ИТ
Внутрибольничный контроль	12	39,3±1,8	32,7±1,7	83±3	0,22±0,04
Больные с пиелонефритом в стадии обострения	8	35,3±1,8	28,8±1,3	83±4	0,24±0,08
Больные с ХГН с сохранной функцией почек	11	33,0±2,4*	23,1±1,7*	70±2*	0,44±0,05*
Больные с ХГН, осложненным нефротическим синдромом	7	25,4±1,5*	18,8±1,1*	75±2*	0,35±0,05*
Больные с ХГН в стадии ХПН I	6	40,2±2,2	31,7±1,8	80±4	0,27±0,06
Больные с ХГН в стадии ХПН II	7	40,6±2,2	25,7±2,3*	64±5*	0,63±0,11*
Больные, получающие лечение регулярным гемодиализом	29	34,3±0,8*	20,8±0,8*	61±2*	0,70±0,06*

* Данные статистически отличаются от данных больных из группы внутрибольничного контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая хорошее совпадение данных флюориметрического метода с традиционными простоту и быстроту исполнения анализа и, главное, его информативность, уже сейчас можно рекомендовать метод для внедрения в практику лечебно-диагностических подразделений и для определения величин ЭКА, РСА и индекса токсичности у больных с печеночной и почечной недостаточностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова.—М.: Ириус, 1994.— 228 с.

2. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов.— М.: Медицина, 1984.—224 с.

3. Лабораторные методы исследования в клинике:Справочни / Под ред. проф. В.В.Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 176—179.

4. Миллер Ю.И. Связывание ксенобиотиков альбумином сыворотки крови // Клин. и лаб. диагностика.—1993.— № 1.—С. 34—40.

5. Миллер Ю.И., Добрецов Г.Е. Молекулярные основы флюоресцентного метода определения связывающей емкости альбумина сыворотки крови // Клин. и лаб. диагностика.—1994.—№ 5.— С. 20—23.

6. Моин В.М., Мисионжник З.И., Кузнецова З.И. и др. Некоторые характеристики метода и реактивов для флюоресцентного определения эффективной и общей концентрации сывороточного альбумина // Клин. и лаб. диагностика.— 1994.—№ 5.—С. 33—35.

7. Пентюк А.Л., Мусин Р.А., Марченко Г.П. Изучение новых функциональных свойств альбумина // Вопр. мед. химии.—1995.—№ 3.—С. 11—13.

8. Lichtenwalner D.M., Suh B., Lorber B., Rudnick M.R. Correction of drug binding defects in uremia in vitro by anion exchange resin treatment//Biochemical Pharmacology.— 1982.—Vol. 31, № 21.—P. 3483—3487.

9. Sudlow G. The specificity of binding sites on serum albumin // In: Advances in pharmacology and therapeutics. Proceedings of the 7th International Congress of Pharmacology.— Paris, 1978.— P. 113—123.

Поступила в редакцию 25.06.98 г.