

ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ТАНДЕМНОМУ МЕТОДУ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Истомин Д.С., Золотавина М.Л.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru, zolotavina_m@mail.ru,

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается иммунохемилюминесцентный метод, выступающий как надёжная и более экономически выгодная альтернатива более современному методу, такому как ВЭЖХ-масс-спектрометрия. Иммунохемилюминесцентный метод, основанный на комплиментарном специфичном взаимодействии антигена и антител, меченых хемилюминесцентными метками. Такой способ маркировки молекул обеспечивает высокую точность и чувствительность метода, позволяющее обнаруживать очень низкие количества вещества, в которых они присутствуют в живых организмах. Предел обнаружения концентрации соединений является 2 мкг/мл. Это становится возможно благодаря ферментативно усиленной хемилюминесценции, происходящей при образовании 3-аминофталата в результате реакции люминола с супероксидным радикалом и последующим усилением хемилюминесценции благодаря активаторам. Данный метод не отстаёт по аналитическим характеристикам от методов более современных, однако он не имеет многих отрицательных черт, присущих современным методам. Иммунохемилюминесцентный метод является относительно недорогим, а вариабельность анализаторов, использующих этот метод, позволяет применять его как в больших, так и малых медицинских лабораториях. Использование иммунохемилюминесцентного метода в анализаторе «ARCHITECT i2000» для определения вальпроевой кислоты у детей разного возраста показало конкурентоспособность данного метода. Результаты, полученные на анализаторе, отличались высокой точностью, чувствительностью и специфичностью. Показатели вальпроевой кислоты коррелировали с возрастными детьми, у которых были взяты образцы крови.

Ключевые слова: ВЭЖХ-масс-спектрометрия, вальпроевая кислота, иммунохемилюминесцентный метод.

ВВЕДЕНИЕ

Для определения концентрации разных химических соединений в жидкостях организма в современной биохимической физике используют большое количество методов. Такое разнообразие методов и их вариаций обусловлено разными критериями использования метода, такими как точность определения, показывающая качество измерения и отражающее близость результатов к истинному значению, или специфичность метода, показывающая способность метода выявлять определённое вещество из раствора. Сходимость и воспроизводимость метода позволяют оценить надёжность метода в разных и одинаковых условиях его применения.

Особенно важно использовать наиболее точные методы для идентификации соединений в терапевтическом мониторинге лекарственных средств. Это необходимо для правильного распознавания концентрации соединения и последующей корректировке дозы препарата. Такой подход используется для многих препаратов, имеющих накопительную способность, в том числе и вальпроевая кислота.

Одним из наиболее современных методов для обнаружения вальпроевой кислоты считается метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используемый в тандеме с методом масс-спектрометрии (МС). Такое сочетание методов позволяет регистрировать вещества с очень низкой концентрацией и высокой точностью.

В этом методе вальпроевую кислоту и её метаболиты идентифицируют масс-спектрометрически. Детекция количества вальпроевой кислоты происходит в режиме регистрации множественных ионов при отрицательной поляризации. Определение вальпроевой кислоты происходит по значению MRM-переходов. Для этого получают масс-спектры путём прямого ввода образцов в масс-детектор с использованием шприцевого насоса. Растворителем выступает метанол с 0,1 % ацетата аммония. Однако такое определение считали несообразным для вальпроевой кислоты и поэтому для определения вальпроатов в будущем использовали метод ВЭЖХ. Условия такой хроматографии являются универсальными для определения вальпроевой кислоты и её метаболитов, а время проведения метода не превышало 2 минут.

Данная методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии позволяет определить вальпроевую кислоту и её метаболиты в одной пробе. Она отличается малым количеством времени исследования, отсутствием отдельной пробоподготовки каждого анализа, необходимостью небольшого объёма биоматериала – около 200 мкл плазмы крови на один анализ. Аналитический диапазон определения для вальпроевой кислоты составляет 1-200 мкг/мл, а для её метаболитов – 10-500 нг/мл. Однако, такая методика имеет несколько

недостатков для современных лабораторных исследований. Данные методы не автоматизированы и требуют затраты времени на их постановку. Поскольку это требует большого количества времени, это не подойдёт для больших лабораторий с большим потоком исследований. Для маленьких лабораторий такая методика также будет не эффективна, поскольку стоимость реактивов и оборудования для постановки этой методики будут экономически не выгодны. Учитывая недостатки такой методики, можно сделать вывод, что этот метод на данный момент не является достаточно оптимизированным и состоятельным для крупных или малых медицинских лабораторных исследований. Недостатки этой методики удалось решить с использованием иммунохемилюминесцентного метода.

Принцип иммунохемилюминесцентного метода основан на комплиментарном соединении субстрата и антители, вступающих в реакцию. Эта реакция сопровождается хемилюминесценцией, происходящей в присутствии пероксида водорода и катализатора. Для обеспечения высокой хемилюминесцентной активности при выполнении затратных по времени методов исследований и для выполнения аналитических целей используют активаторы (усилители) хемилюминесценции [2].

Активаторами хемилюминесценции выступают соединения, образующие молекулы в возбуждённом электронном состоянии при реакции с активными формами кислорода или свободными радикалами. Переход образованных в этих реакциях продуктов из возбуждённого состояния в основное приводит к высвечиванию электронов и, как следствие, наблюдаемому свечению.

Имунохемилюминесцентный анализ весьма конкурентоспособен и обладает большой чувствительностью, занимает меньше времени на исследование и практически сравним по специфичности и чувствительности с методом ВЭЖХ-масс-спектропии, за счет применения активаторов хемилюминесцентных меток, ускоряющих иммунологическую реакцию. Также он может быть полностью автоматизирован. Данный метод относительно малозатратный и способен применяться как в больших, так и в малых медицинских лабораториях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данные для исследовательской работы были получены на базе ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» г. Краснодара в период с июня по октябрь 2019 года.

Материалом для исследования явилась венозная кровь детей с эпилептическим статусом. Для определения биохимических показателей использовали сыворотку венозной крови пациентов. Забор крови производился из локтевой вены посредством пункции. Объем крови, необходимой для выполнения методики, составлял 4-5 мл для одного исследования. Кровь смешивали в пробирке с противосвёртывающим веществом (гепарин, натрия цитрат). Объём забираемой из вены крови определяли из расчёта 1-2 мл на каждый вид анализа [1].

В работе исследовались сыворотки 152 пациентов в возрасте от 4 месяцев до 18 лет (табл. 1).

Среднее значение показателей и стандартную ошибку определяли с помощью Microsoft Excel 2016.

Измерение концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови проводилось на автоматическом анализаторе «ARCHITECT i2000» с использованием иммунохемилюминесцентного метода. Для постановки метода использовались реагенты «IP35 ARCHITECT iValproic Acid Reagent Kit».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было исследованы образцы плазмы крови 152 детей разного возраста при помощи иммунохемилюминесцентного метода (ИХЛА) на автоматическом анализаторе «ARCHITECT i2000» с использованием реагентов «IP35 ARCHITECT iValproic Acid Reagent Kit». Рекомендуемым терапевтическим диапазоном у детей принята концентрация вальпроевой кислоты в сыворотке крови 50-100 мкг/мл.

Полученные нами данные по определению концентрации вальпроевой кислоты, представлены на таблице 2.

Из данных таблицы 2 видна зависимость повышения концентрации вальпроевой кислоты от повышения возраста ребёнка. Такие показатели могут свидетельствовать о высокой дозе получаемого препарата и необходимости его корректировки. Этот эффект может быть связан с повышением дозы во время роста ребёнка. Нельзя исключать возможности того, что повышенная концентрация вальпроевой кислоты связана с недостаточно верным расчётом дозы препарата, назначаемой лечащим врачом, или с индивидуальной реакцией организма на препарат, примером которой может быть накопление сверхвысокой концентрации препарата в крови у так называемых «медленных метаболитов».

Таблица 1. Контингент пациентов

Группы детей, возраст	1 группа (до 2-х лет)	2 группа (от 3-х до 7 лет)	3 группа (от 8 до 18 лет)
Количество человек в группах (n)	32	64	56

Таблица 2. Концентрация вальпроатов в сыворотке крови пациентов разных групп

Группа детей	1 группа	2 группа	3 группа
Концентрация вальпроатов, мкг/мл	66,05±1,34	93,33±0,45	102,61±0,51
Референтные значения в сыворотке крови: 50-100 мкг/мл			

В иммунохемилюминесцентном методе кроме субстрата и антитела, вступающих в реакцию, присутствуют другие соединения, которые позволяют оценивать концентрацию вальпроевой кислоты и которые приводят к хемолуминесценции. Также для этой цели в методе присутствуют активаторы (усилители) хемолуминесценции.

Активаторами хемилуминесценции выступают соединения, образующие молекулы в возбуждённом электронном состоянии при реакции с активными формами кислорода или свободными радикалами. Переход образованных в этих реакциях продуктов из возбужденного состояния в основное приводит к высвечиванию электронов и, как следствие, наблюдаемому свечению. Наиболее часто используемые активаторы – люминол (3-аминофталевый гидразид) и люцигенин. В качестве окислителя используют радикал гидроксила. Под его воздействием образуется радикал люминола. Люминол реагирует с так называемым супероксидным радикалом и вместе они образуют внутреннюю перекись. После она разлагается с образованием возбужденной молекулы 3-аминофталата. Молекула 3-аминофталата переходит в основное состояние, что вызывает процесс люминесценции. Активатор принимает и конденсирует всю энергию, полученную от молекул. Интенсивность свечения, необходимая для регистратора, определяется квантовым выходом люминесценции активатора, который должен стремиться к единице. От активатора свечение повышается на три-четыре порядка. Таким образом получается хемилуминесценция, усиленная ферментами.

В качестве меток хемилуминесценции в основном используют низкомолекулярные соединения, близкие к люминолу или люциногену. Часто используют изолюминол, сукцинированный люминол, эфиры акридия. Метки присоединяют к антителу, комплементарному искомому антигену. Таким образом, используют иммунологическую реакцию, где в качестве субстрата присоединяют люминофоры. Для регистрации свечения используется люминометр – датчик, фиксирующий уровень свечения. Этот метод используется для определения веществ, как правило, в очень низких концентрациях, в которых они встречаются в организме человека [2].

При использовании иммунохемилюминесцентного анализа берут избыток хемилуминесцентно-меченого антитела, в который добавляют раствор с изучаемым веществом. В результате образуется хемилуминесцентно-меченый иммунный комплекс. Интенсивность хемилуминесценции будет прямо пропорциональна концентрации анализируемого вещества в пробе.

Таким образом, иммунохемилюминесцентный метод является одним из лучших и конкурентоспособных методов определения концентрации вальпроевой кислоты. Он определяет вальпроаты в пробе с высокой чувствительностью и точностью. Анализаторы, работающие с применением этого метода, способны работать в автоматическом режиме и делать до 200 тестов в час. Такие характеристики существенно превосходят аналогичные методы определения вальпроевой кислоты. Аналитический диапазон определения вальпроевой кислоты составляет 2-150 мкг/мл, однако образцы с концентрацией более 150 мкг/мл анализаторы способны автоматически разбавлять и получать точные данные. Иммунохемилюминесцентный метод позволяет обеспечить индивидуальный подход к лечению пациентов с эпилепсией разного генеза.

Список литературы / References:

1. Большая Медицинская Энциклопедия. 3-е издание, онлайн версия. Российская академия медицинских наук, 2014. [*Big Medical Encyclopedia*. 3rd edition, online version. Russian Academy of Medical Sciences, 2014. (In Russ.)].
2. Иммунохемилюминесцентный метод. Современные методы лабораторной диагностики: справочное пособие для врачей. АстроМЕД. 2012. [*Immunochemiluminescent method. Modern methods of laboratory diagnostics: a reference guide for doctors*. AstroMED, 2012. (In Russ.)]. URL: <http://astromed.biz/informacionnie-materiali/spravochnie-posobija/>.

IMMUNOCHEMILUMINESCENT ANALYSIS AS AN ALTERNATIVE TO THE TANDEMIC HPLC-MASS-SPECTROMETRY METHOD FOR THE DETERMINATION OF VALPROIC ACID**Istomin D.S., Zolotavina M.L.**

Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru, zolotavina_m@mail.ru

Abstract. The work considers the immunochemiluminescent method, which acts as a reliable and more cost-effective alternative to a more modern method, such as HPLC-mass-spectrometry. Immunochemiluminescent method based on the complementary specific interaction of antigen and antibodies labeled with chemoluminescent labels. Such a labeling technique provides high accuracy and sensitivity of the method, allowing to detect very low amounts of the substance in which they are present in living organisms. The detection limit for the concentration of compounds is 2 mkg/ml. This becomes possible due to enzymatically enhanced chemiluminescence which occurs during the formation of 3-aminophthalate as a result of the reaction of luminol with a superoxide radical and the subsequent enhancement of chemiluminescence due to activators. This method does not lag behind analytical methods from more modern methods, but it does not have many of the negative features inherent in modern methods. The immunochemiluminescent method is relatively inexpensive, and the variability of analyzers that use this method allows it to be used in both large and small medical laboratories. The use of the immunochemiluminescent method in the ARCHITECT i2000 analyzer for determining valproic acid of children of different age showed the competitiveness of this method. The results obtained on the analyzer were characterized by high accuracy, sensitivity and specificity. Valproic acid values correlated with the age of children whose blood samples were taken.

Key words: *HPLC-mass-spectrometry, valproic acid, immunochemiluminescent method.*