

УДК 616-074:543.33:546.73-07.616.15-07

©Коллектив авторов

КОБАЛЬТ-СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ: НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ТЕСТ?

Е.А. Литус, В.Г. Зайцев, В.Е. Веровский, Л.В. Гончарова,
Г.П. Дудченко, О.В. Островский*

Волгоградский государственный медицинский университет,
400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1; тел.: +7 (8442) 38-50-05;
эл. почта: post@volgmed.ru, ealitus@gmail.com

Целью данной работы была оценка референтных границ кобальт-связывающей способности (КСС) сыворотки крови, а также оценка влияния на данный диагностический показатель факторов, не связанных с окислительной модификацией сывороточного альбумина. Исследование проведено на группе условно здоровых добровольцев (n=194), группе пациентов с аутоиммунной патологией (n=44) и группе пациентов с сахарным диабетом 2 типа (n=50). Оно позволило определить региональные референтные пределы КСС сыворотки крови: 0,462-0,744 ммоль Co^{2+} /л сыворотки. У пациентов с аутоиммунной патологией и сахарным диабетом КСС сыворотки крови сильно зависит от белкового спектра сыворотки крови. Следовательно, хотя данный диагностический тест может быть использован для диагностики ишемии, однако другие патологии, сопровождающиеся изменением соотношения белковых фракций крови, будут влиять на уровень КСС сыворотки крови.

Ключевые слова: кобальт-связывающая способность, сахарный диабет 2 типа, аутоиммунные заболевания, белковые фракции крови.

ВВЕДЕНИЕ

Современные требования, которые должны быть учтены при разработке нового лабораторного теста – это: определение механизма появления признака при патологическом процессе; разработка адекватной аналитической технологии; определение референтных границ показателя с учётом применяемого метода анализа; определение диагностических порогов. К этим задачам тесно примыкает ещё одна проблема, которую можно обозначить как “клиническая интерференция”. А именно – появление одного и того же симптома при целом ряде нозологических форм.

В 1999 Var-Or и соавт. предложили новый показатель выявления ишемии – “ишемически-модифицированный альбумин” (ИМА) [1]. Все технологии определения данного показателя базируются на измерении

концентрации комплекса кобальт-дитиотрейтол (Co^{2+} -ДТТ) [2]. То есть, реально измеряемый параметр – это кобальт-связывающая способность сыворотки крови (КСС). В ряде клинических исследований установлено значимое смещение как данного параметра у пациентов с ишемическими нарушениями [3, 4], так и совершенно другого параметра с тем же названием [5]. Предложенный механизм обнаруженных изменений КСС однозначно привязывается к окислительной модификации альбумина [6].

Материалы клинических исследований, посвященные данной проблеме, ссылаются на разные методики определения КСС. Соответственно, возникает ещё одна проблема, связанная с неопределенностью референтных границ показателя, поскольку результаты клинических исследований в определенной степени всегда зависимы от метода. Ранее нами были определены

* - адресат для переписки

условия определения КСС, при которых результаты измерения наиболее устойчивы к вариациям технологических операций [7].

В связи с вышеизложенным, цель данной работы состояла в оценке референтных границ КСС при использовании предлагаемой нами технологии, а также в оценке влияния на данный диагностический показатель факторов, не связанных с окислительной модификацией сывороточного альбумина.

МЕТОДИКА

Определение КСС сыворотки крови проводили по методике описанной нами ранее [7]. Время инкубации Co^{2+} было увеличено до 15 мин, поскольку этот период времени должен обеспечить равновесие в системе Co^{2+} -белок. Рассчитывали также КСС на моль альбумина.

Измерение общего белка проводили биуретовым методом с помощью наборов ЗАО “Диакон-ДС” (Россия). Определение сывороточного альбумина проводили стандартной лабораторной методикой с бромкрезоловым зелёным (“Диакон-ДС”). Под “глобулинами” подразумевали результаты измерения содержания белка методом с *n*-аминобензальдегидом, специфичным для глобулиновой фракции [8].

Группы обследованных

Первая группа здоровых добровольцев состояла из 189 человек, проходивших периодический медосмотр и признанных здоровыми. После первичной обработки данных, из дальнейшего анализа были исключены результаты 16 лиц, у которых содержание белка выходило за пределы 60-85 г/л или содержание альбумина – за пределы 34-54 г/л. Доля таких обследованных составляла 8,5% (доверительный интервал (ДИ) 4,9-13,4%). Вторая группа – из 21 добровольца в возрасте 20-30 лет.

Всего в исследовании уровня КСС сыворотки крови пациентов с аутоиммунной патологией приняло участие 44 пациента (6 мужчин и 38 женщин, в возрасте от 16 до 78 лет) с диагнозом ревматоидный артрит ($n=35$), системная красная волчанка ($n=2$), системная склеродермия ($n=7$), находящихся на стационарном лечении в ревматологическом отделении МУЗ “Городская клиническая больница скорой медицинской помощи №25”, г. Волгоград. Критерием исключения

из группы было несогласие пациента на проведение исследования

Также в исследования была включена группа больных ($n=50$) с сахарным диабетом (СД) 2 типа (диагноз поставлен по критериям ВОЗ), госпитализированные в терапевтическое отделение ФГУЗ “Волгоградский медицинский центр федерального медико-биологического агентства России” в связи с декомпенсацией СД. В группу вошло 15 мужчин и 35 женщин в возрасте от 45 до 85 лет. Длительность течения заболевания от 1 до 12 лет. 74% пациентов имели осложнённую форму СД. Критериями исключения были вирусные гепатиты, ВИЧ, хроническая сердечная недостаточность 4 класса, алкогольный гепатоз, тиреотоксикоз и любые заболевания щитовидной железы, сопровождающиеся изменением гормонального статуса, несогласие пациента. Исследование проведено с информированного согласия пациентов и здоровых добровольцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования кобальт-связывающей способности здоровых людей приведены на рисунке 1 и в таблице 1. При анализе данных, полученных при обследовании группы 1, оказалось, что при накоплении результатов среднее значение стремится к величине 0,59 ммоль Co^{2+} /л сыворотки и остается относительно стабильным, начиная с размера выборки ~100 человек (рис. 1). Значимые зависимости от пола и возраста выявлены не были. Исследование показателя на ограниченной группе, однородной по возрасту (группа 2), привело к близким величинам среднего значения и рассеяния (рис. 1, табл. 1). Поэтому для оценки границ референтного интервала использовали параметры для объединённой группы.

Характер распределения людей по значению показателя был близок к нормальному (по критерию Шапиро-Уилкса). Поэтому параметрические оценки границ ($\bar{X} \pm 2s$) оказались близкими к непараметрическим (2,5 и 97,5 перцентили, табл. 1).

Отсутствие корреляции между измеренным уровнем альбумина и КСС находится в известном противоречии как собственно с предложенной моделью [6], так и с результатами других авторов [9]. Однако, и эти результаты далеко неоднозначны.

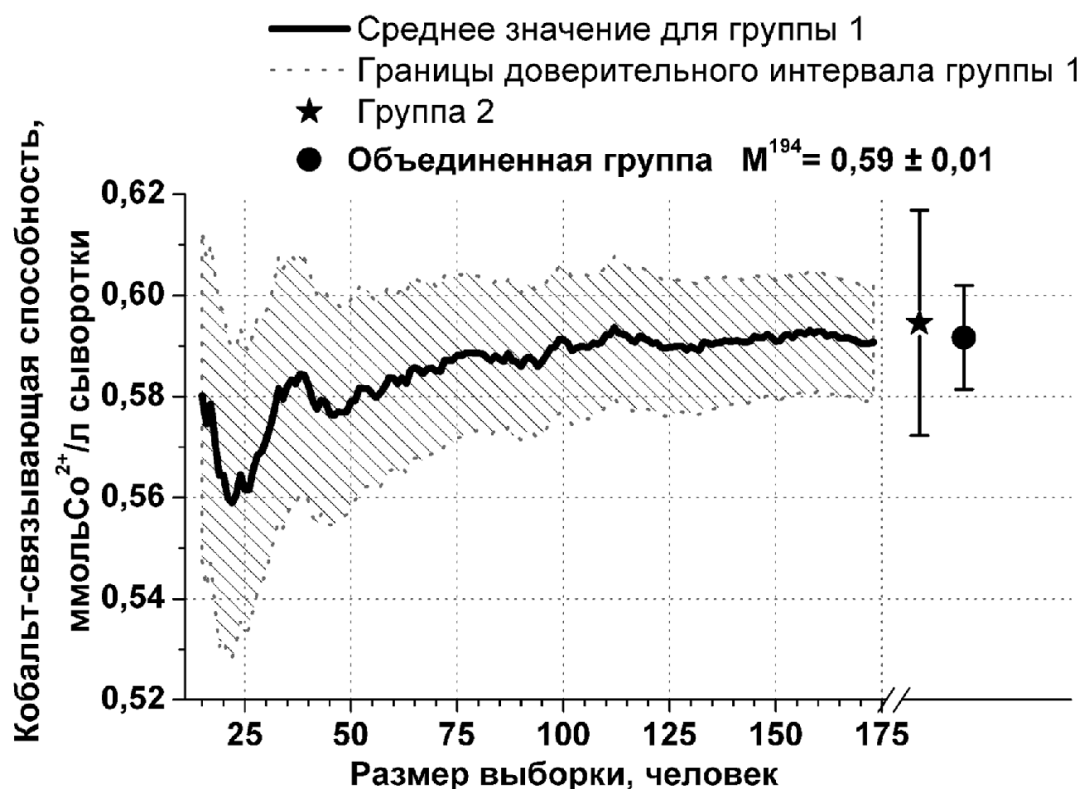


Рисунок 1. Зависимость распределения условно здоровых добровольцев по значениям кобальт-связывающей способности сыворотки крови от размера выборки.

Таблица 1. Параметры распределения обследованных лиц по значению кобальт-связывающей способности сыворотки крови.

	КСС, ммоль Co^{2+} /л сыворотки	КСС/альбумин, ммоль Co^{2+} /г белка	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Глобулины, г/л
Объединённая группа n=194					
X	0,592	0,926	71,431	43,339	18,613
S	0,073	0,163	6,600	4,727	3,634
X-2s	0,445	0,601	58,232	33,886	11,345
X+2s	0,738	1,252	84,630	52,792	25,881
2,5%- персентиль	0,462	0,679	60,656	35,353	13,650
97,5%- персентиль	0,744	1,254	84,081	54,207	26,862

Действительно, привлечение результатов пациентов, исключённых на первой стадии анализа (с завышенным или заниженным содержанием белков), приводило к появлению значимых зависимостей. Тем не менее, мы не сочли возможным включать эти результаты в данное обсуждение, поскольку в этом случае проявляется некоторая сложная зависимость от относительного содержания альбуминов и глобулинов неясной пока

этиологии. Эта неоднозначность вполне объяснима, если учесть следующие обстоятельства. Во-первых, способностью эффективно связывать ионы из сывороточных белков обладает не только альбумин [10]. Во-вторых, кинетика комплексообразования в реакционных смесях “ДТТ- Co^{2+} -белок” достаточно медленная (рис. 2) и, очевидно, различна для разных белков. Поэтому при коротких временах инкубации (как правило,

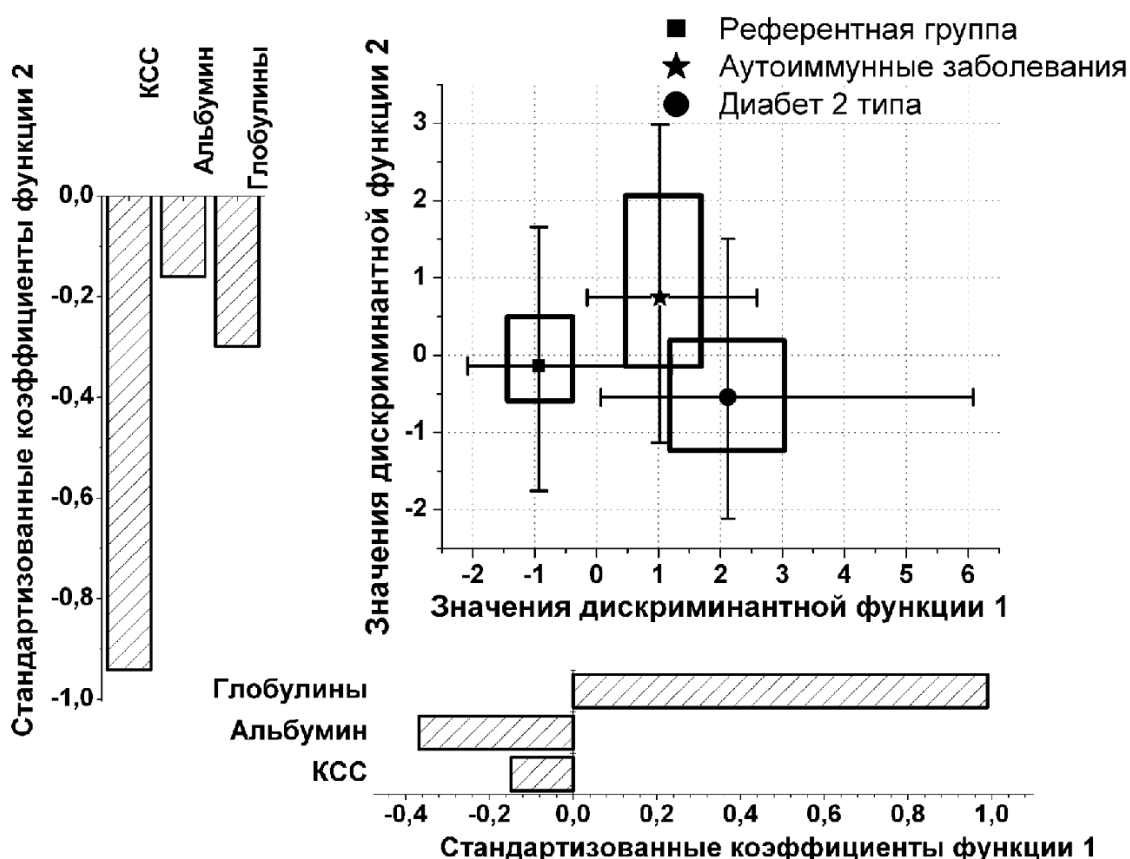


Рисунок 2. Результаты дискриминантного анализа показателей референтной группы и пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями и диабетом.

2 мин без преинкубации) вполне возможно, что различия в коэффициентах корреляции в разных работах отражают именно особенности кинетики распределения кобальта между ДТТ и различными белками при вариациях белкового состава. С этой точки зрения, разработанная нами двустадийная процедура с предварительной 15-минутной инкубацией на стадии смеси “кобальт-сыворотка” выглядит более адекватной. Что касается модели, то о её недостаточности свидетельствуют также

величины КСС в пересчёте на моль альбумина у значительной доли обследованных (табл. 1)

Возможный альтернативный механизм изменений КСС сыворотки крови может быть предложен, исходя из результатов, полученных при обследовании пациентов с заболеваниями, механизм которых напрямую не связан с ишемией: СД и аутоиммунными заболеваниями. Результаты этого исследования приведены в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2. Параметры распределения пациентов с диабетом и аутоиммунными заболеваниями по значению кобальт-связывающей способности сыворотки крови.

	КСС, ммоль Co^{2+} /л сыворотки	КСС/альбумин, ммоль Co^{2+} /г белка	Общий белок, г/л	Альбумин, г/л	Глобулины, г/л
Сахарный диабет, 2 типа					
n	50	50	49	50	50
X	0,560	0,916	70,539	41,484	30,924
s	0,081	0,158	9,030	5,796	6,118
Аутоиммунные заболевания					
n	44	44	44	44	44
X	0,488	0,817	67,765	40,407	25,113
S	0,089	0,160	9,570	5,941	4,126

Как в случае группы больных СД, так и в случае аутоиммунных заболеваний, КСС сыворотки крови оказалась пониженной. Более того, если среди больных СД доля пациентов с уровнем КСС ниже референтного предела составляла всего ~8% (ДИ 2,2-19,2%; $p>0,05$), то в группе аутоиммунных заболеваний – ~32% (ДИ 18,6-47,6%; $p<0,05$). Таким образом, понижение КСС невозможно однозначно связать именно с ишемией.

Анализ взаимозависимости показателей пациентов с аутоиммунными заболеваниями показал, что для данной группы пациентов характерно появление значимой ($p<0,05$) корреляции между КСС и уровнем альбумина ($R^2=0,14$), сопоставимый с величинами обнаруженными в других исследованиях [9]. Однако, того же порядка ($R^2=0,15$) оказалась и степень связи с уровнем глобулинов (метод с *n*-диметиламинобензальдегидом).

Дискриминантный анализ трёх исследованных групп в системе показателей “КСС-альбумин-глобулины” (рис. 2) показал, что на самом деле ведущий фактор в различиях этих групп – это соотношение уровней альбумина и “глобулинов” (функция 1, рис. 2).

Полученный результат может свидетельствовать в пользу того, что исследованные группы различаются не собственно КСС, а особенностями белкового спектра. И, соответственно, учитывая различную способность сывороточных белков к связыванию кобальта, регистрируемые смещения КСС могут быть отражением именно этих особенностей, а не изменением свойств только альбумина, как это предполагали Bar-Or и соавт. [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенные наблюдения, можно предположить, что КСС может служить достаточно чувствительным, однако неспецифичным маркером наличия ряда патологий, для которых свойственны

качественные изменения белкового спектра сыворотки крови. В частности, результаты определения КСС могут оказаться весьма ценным дополнительным показателем при подозрении на наличие ишемии, что соответствует предположениям, высказанным в работах [3, 4].

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы “Участник молодёжного научно-инновационного конкурса”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bar-Or D., Lau E., Rao N., Bampas N., Winkler J.V., Curtis C.G. (1999) Ann. Emerg. Med., **34**, S56.
2. Bar-Or D., Lau E., Winkler J.V. (2000) J. Emerg. Med., **19**(4), 311-315.
3. Abadie J.M., Blassingame C.L., Bankson D.D. (2005) Ann. Clin. Lab. Sci. **35**(1), 66-72.
4. Behera S., Mangaraj M., Mohapatra P.Ch. (2012) Asian Pacific J. Tropic. Dis., **2**(1), 62-65.
5. Ustün Y., Engin-Ustün Y., Öztürk O., Alanbay I., Yaman H. (2011) J. Maternal-Fetal Neonatal Med., **24**(3), 418-421.
6. Wu A. (2002) in: International workshop on ischemia. Barcelona, Spain, pp. 18-20.
7. Лопатин Ю.М., Литус Е.А., Зайцев В.Г., Островский О.В., Дронова Е.П., Подворчан М.А., Трифонова А.Н., Костерина Н.С. (2011) Современные проблемы науки и образования, №6, URL: www.science-education.ru/100-5114 (дата обращения: 18.02.2012).
8. Никитенко Е.А., Зайцев В.Г., Островский О.В. (2007) Биомед. химия, **53**, 216-220.
9. Maguire O.C., O'Sullivan J., Cunningham J.R., Cunningham S.K. (2006) Ann. Clin. Biochem., **43**(6), 494-499.
10. Martins S., Karmali A., Andrade J., Serralheiro M.L. (2006) Mol. Biotechnol., **33**(2), 103-114.

Поступила: 13. 04. 2012.

**IS COBALT-BINDING CAPACITY OF SERUM
A NEW PERSPECTIVE DIAGNOSTIC MARKER?**

E.A. Litus, V.G. Zaitsev, V.E. Verovskij, L.V. Goncharova, G.P. Dudchenko, O.V. Ostrovskij

Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov, 1, Volgograd, 400131 Russia;
tel.: +7 (8442) 38-50-05, e-mail: post@volgmed.ru, ealitus@gmail.com

The aim of this study was to determine the reference interval of serum cobalt-binding capacity (CoBC) and to estimate the effect of factors unrelated to oxidative modification of serum albumin on this diagnostic marker. A group of healthy volunteers (n=194), a group of patients with autoimmune diseases (n=44) and a group of patients with diabetes type 2 (n=50) participated in this study. The regional reference interval was found to be 0,462-0,744 mmol Co²⁺/l of serum. The study of serum CoBC in two groups of patients showed that the CoBC level strongly depends on the serum protein profile. Therefore, this diagnostic test may be used for diagnosing ischemia, but other pathologies associated with changes in a ratio of blood protein fractions can also influence the serum CoBC level.

Key words: cobalt-binding capacity, diabetes type 2, autoimmune diseases, blood protein fractions.