

**САВЕЛЬЕВ
Леонид
Иосифович**

*Доцент кафедры лабораторной
диагностики ФУВ УГМА, заведующий
биохимической лабораторией ОДКБ,
кандидат медицинских наук, доцент*

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТОТРЕКСАТА В КРОВИ МЕТОДОМ ГОМОГЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ

Эта работа не претендует на теоретические высоты экспериментальной медицины. Но она дорога автору в первую очередь как конкретный результат научной подготовки, полученной им под руководством академика Ястребова Анатолия Петровича. Только пройдя такую научную школу, можно решать те непростые задачи, что ставит перед нами клиническая практика по обеспечению лабораторного мониторинга при проведении современных интенсивных лечебных технологий.

Метотрексат — противоопухолевый препарат, включенный в протоколы лечения больных с острым лимфобластным лейкозом, остеогенной саркомой, опухолью яичка, мелкоклеточным раком легкого. Противоопухолевый эффект связан со способностью метотрексата ингибировать дегидрофолат редуктазу и снижать образование тетрагидрофолиевой кислоты, необходимой для синтеза ДНК и РНК в клетках. К сожалению, эти изменения под влиянием метотрексата происходят не только в опухолевых клетках, но и в нормальных клетках организма, что приводит к серьезным цитотоксическим эффектам, проявляющимся выраженной миелодепрессией, развитием токсического гепатита и поражением слизистой кишечника. Такие нежелательные побочные эффекты наиболее выражены при использовании препарата в высоких дозах (5–12 г на кг массы тела), когда наблюдается длительное присутствие

Оптимизация определения концентрации метотрексата в крови методом гомогенного иммуноферментного анализа на биохимическом анализаторе

метотрексата в высокой концентрации в крови. Эти обстоятельства требуют постоянного контроля за уровнем препарата в крови для прогнозирования осложнений и их предотвращения с помощью лейковорина — аналога фолиевой кислоты, превращающегося в тетрагидрофолиевую кислоту без участия дегидрофолат редуктазы [2].

Для определения метотрексата в клинической практике наиболее часто используют гомогенные иммунохимические методы — иммуноферментный и иммунофлюоресцентный. При этом, для проведения гомогенного иммуноферментного анализа не требуется специальное оборудование, а используется фотометрическая техника, применяющаяся при проведении рутинных биохимических исследований. Однако стоимость даже этого, наиболее доступного для отечественных лабораторий метода достаточно высока — только затраты на реактивы составляют минимально 3 — 4 доллара на один тест.

Целью нашего исследования и была разработка экономически выгодной и аналитически приемлемой схемы гомогенного иммуноферментного анализа для определения концентрации метотрексата в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения метотрексата использовали наборы Emit Methotrexat assay (Syva Company, USA). Тест основан на конкуренции меченого ферментом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой метотрексата и метотрексата, присутствующего в сыворотке пациента за связь с антителами. При связывании с антителом меченого метотрексата снижается активность фермента. Таким образом, по изменению активности Г-6-ФДГ можно определить концентрацию эндогенного метотрексата. Активность Г-6-ФДГ измеряется кинетически по скорости окисления НАД в НАДН. Набор скомпонован из следующих реагентов: реагент А — антитела к метотрексату и глюкозо-6-фосфат; реагент В — метотрексат меченый Г-6-ФДГ; концентрат буфера и набор калибраторов с содержанием метотрексата 0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мкмоль/л.

Все определения проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Mira Plus (Roche, Швейцария).

Для контроля правильности определений использовали контрольные сыворотки фирмы Abbott Laboratories со средними значениями метотрексата 0,4 и 5,0 ммоль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предлагаемая фирмой схема определения метотрексата на анализаторе Cobas Miga Plus предусматривает расход на одно определение по 17 и 18,8 мкл соответственно реагентов А и В. Нетрудно рассчитать, что из одного набора реагентов можно выполнить не более 159 исследований. Технические возможности биохимических анализаторов позволяют достаточно аккуратно дозировать меньшие объемы реагентов. Однако пропорциональное уменьшение объема добавляемых растворов антител (реагент А) и меченого метотрексата (реагент В) до 5 мкл приводит к очень быстрому, уже к концентрации метотрексата 0,2 мкмоль/л, выходу калибровочного графика на плато (рис. 1, Б). Теоретический анализ показал, что подобная ситуация описана при изучении радиоиммунологических методов, где снижение количества антител и меченого лиганда в конкурентных схемах сопровождается резким увеличением чувствительности [1]. В классических тестах гомогенного иммуноферментного анализа Еmit условия взаимодействия эндогенного и меченого лигандов не равны, так как сначала обеспечивается взаимодействие эндогенного лиганда с антителами и только затем добавляется меченый лиганд [3]. Такая схема проведения анализа также обеспечивает высокую чувствительность теста. Изменение порядка добавления реагентов (проба — меченый лиганд — антитела) может привести к снижению чувствительности и увеличению рабочего диапазона [1], что и необходимо в наших условиях. Экспериментальная проверка подтвердила такую возможность (рис. 1, В). Действительно, «раннее» прибавление к исследуемой пробе меченого лиганда и создание одинаковых возможностей взаимодействия эндогенного и экзогенного лигандов с антителами (антитела добавлялись через 25 с после смешивания пробы и меченого метотрексата) приводит к смещению выхода калибровочного графика на плато в область более высоких концентраций. Однако рабочий диапазон по-прежнему остается недостаточным — корректное определение возможно только до концентрации 0,6 мкмоль/л. Такое положение удастся пре-

*Оптимизация определения концентрации метотрексата в крови методом
гомогенного иммуноферментного анализа на биохимическом анализаторе*

Measurement mode	absorb
Reaction Mode	R-S- SR1 — SR2
Calibration Mode	logit log 4
Reagent blank	No blank
Wavelength	340 nm
Unit	μmol l
Sample cycle	1
volume	3 μl
Diluent name	H2O
volume	17 μl
Reagent cycle	1
volume	100 μl
Start R1 cycle	2
volume	5 μl
Diluent name	H2O
volume	15 μl
Start R2 cycle	3
volume	7 μl
Diluent name	H2O
volume	16 μl

C A L C U L A T I O N

Number of step	1
Calc. step A	kinetic
Reading first 4	last 6
Reaction limit	No
Calibration	On requirement
Standart Pos.	11
1 — 0,00 2 — 0,20 3 — 0,5 4 — 1,0 5 — 1,5	
Replicate — Single	

Схема. Определение метотрексата на биохимическом анализаторе Cobas Mira Plus реагентами Emit Methotrexat Assay (Reagent — буфер, SR1 — реагент B, SR2 — реагент A)

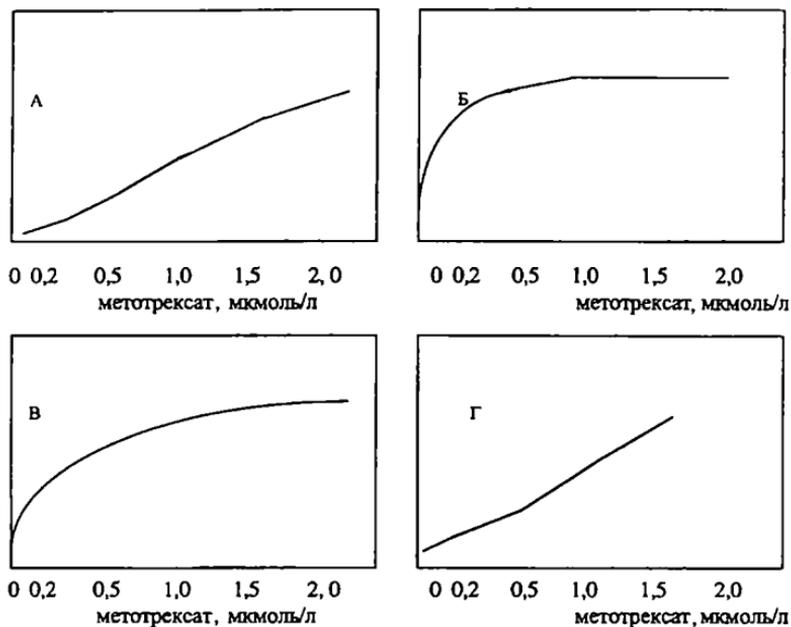


Рис. 1. Калибровочные графики различных вариантов адаптации определения концентрации метотрексата наборами реагентов Emit Methotrexat assay на анализаторе Cobas Mira Plus: 1А — адаптация, предлагаемая фирмой; 1Б — снижение объемов меченого лиганда и антител до 5 мкл; 1В — изменение порядка добавления реагентов — проба — меченый лиганд (реагент В) — антитела (реагент А) при объеме 5 мкл; 1Г — увеличение объема добавляемого меченого лиганда до 7 мкл при измененном порядке введения реагентов

Оптимизация определения концентрации метотрексата в крови методом гомогенного иммуноферментного анализа на биохимическом анализаторе

одолеть, незначительно увеличив объем добавляемого меченого лиганда до 7 мкл (рис. 1, Г). Окончательная схема определения метотрексата в нашей адаптации представлена на схеме.

В соответствии с предложенной адаптацией удалось увеличить число возможных определений метотрексата из одного набора реагентов до 425 и, соответственно, снизить стоимость одного теста до 0,8 доллара.

Исследование контрольных сывороток показало приемлемую воспроизводимость метода — коэффициент вариации для сыворотки с концентрацией метотрексата 0,40 мкмоль/л составил 8,1%, а для 5,0 мкмоль/л — 6,5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ткачева Г.А., Балаболкин М.И., Ларичева И.П. Радиохимические методы исследования. — М.: Медицина, 1983 г. — 192 с.
2. Crom W.R., Taylor R.H., Pratt C.B. Methotrexat: Therapeutic use and serum concentration monitoring. / Individualizing drug Therapy: Practical Applications of drug monitoring. — New-York, Gross, Townsend, Frank, Inc, 1981. — P.149–173.
3. Oellerich M. Enzyme immunoassays in clinical chemistry: present status and trends. // J. Clin Chem Clin Biochem. — 1980. — V.18. — P. 197–208.