

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.634:577.175.534]-074

Малышева Н.М., Колесникова Г.С., Ильин А.В.

МОДИФИКАЦИИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО КОРТИЗОЛА В МОЧЕ

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ, 117036, Москва, Россия

Определение свободного кортизола в суточной моче – информативный маркер для диагностики состояний гипо- и гиперкортицизма. В неизменном виде и не связанном с белками с мочой выделяется до 1% кортизола, секретируемого корой надпочечников в течение суток. Уровень свободного кортизола в моче не зависит от суточных колебаний гормона в крови и поэтому отражает суммарную секрецию кортизола корой надпочечников. Кроме того, между уровнем свободного кортизола в моче и уровнем биологически активного кортизола в крови, как правило, существует прямая пропорциональная зависимость. Разработчики автоматизированных систем предлагают различные методики для определения кортизола не только в крови, но и в других биологических жидкостях. В нашей лаборатории были апробированы, модифицированы и адаптированы методики выделения и выявления уровня свободного кортизола в суточной моче для анализатора Vitros ECi (Ortho Clinical Diagnostics, Великобритания) и анализатора Cobas 6000 (Hoffmann-La Roche, Швейцария). Проведено сравнение результатов, полученных этими методами ($r = 0,96-1$). Воспроизводимость определения кортизола оценивали путем анализа каждого образца мочи в одной и в различных постановках. Разброс составлял 1,7–3,7% для одной и 5,2–6,7% для разных постановок. Предложены схемы определения уровня свободного кортизола в моче для анализатора Vitros ECi (с предварительной экстракцией диэтиловым эфиром и последующим удалением водной фракции путем замораживания), а также для анализатора Elecsys (с предварительной экстракцией дихлорметаном, последующим разделением фаз центрифугированием и упариванием органической фазы с помощью вакуумного концентратора).

Ключевые слова: свободный кортизол; суточная моча; автоматизированные системы.

Для цитирования: Малышева Н.М., Колесникова Г.С., Ильин А.В. Модификации метода определения свободного кортизола в моче. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (6): 339-342. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-339-342>

Malysheva N.M., Kolesnikova G.S., Iliin A.V.

THE MODIFICATION OF TECHNIQUE OF DETECTION OF FREE CORTIZOL IN URINE

The endocrinology research center of Minzdrav of Russia, 117036 Moscow, Russia

The detection of free cortizol in day urine is an informative marker for diagnosing conditions of hypo- and hypercorticism. Up to 1% of cortizol, in invariable form and with no association with proteins and secreted by adrenal cortex, is excreted with urine during a day. The level of free cortizol in urine has no dependencies from day variation of hormone in blood and hence it reflects total secretion of cortizol by adrenal cortex. Besides, as a rule a direct proportional dependence exists between level of free cortizol in urine and level of biologically active cortizol in blood. The developers of automated systems propose various techniques of detecting cortizol not only in blood but in other biological fluids too. In our laboratory techniques of detection of level of free cortizol in day urine were approved, modified and adapted meant for analyzer Vitros ECi (Ortho Clinical Diagnostics, Great Britain) and analyzer Cobas 6000 (Hoffmann-La Roche, Switzerland). The comparison of results obtained by these techniques was carried out ($r = 0,96-1$). The reproducibility of detection of cortizol was evaluated by force of analysis of every sample of urine in one and various settings. The spread made up to 1,7–3,7% for one setting and 5,2–6,7% for various settings. The schemes were proposed to detect level of free cortizol in urine for analyzer Vitros ECi (with preliminary extraction by diethyl ether and subsequent removal of water fraction by force of freezing), and also for analyzer Elecsys (with preliminary extraction by dichlormethane and subsequent separation of phases by centrifugation and evaporation of organic phase by force of vacuum concentrator).

Key words: free cortizol; day urine; automated systems

For citation. Malysheva N.M., Kolesnikova G.S., Iliin A.V. The modification of technique of detection of free cortizol in urine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (6): 339-342. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-339-342>

For correspondence: Malysheva N.M., candidate of biological sciences, senior researcher of clinical diagnostic laboratory. e-mail: natalya.m@list.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.01.2017
Accepted 15.02.2017

Определение кортизола в образцах плазмы или сыворотки крови, полученных в утренние и вечерние часы, – первичный подход для оценки состояния глюкокортикоидной функции надпочечников в рутинной диагностике. Определение свободного кортизола в су-

точной моче – информативный маркер для диагностики состояний гипо- и гиперкортицизма. В неизменном виде и не связанном с белками с мочой выделяется до 1% кортизола, секретируемого корой надпочечников в течение суток. Уровень свободного кортизола в моче не зависит от суточных колебаний гормона в крови и поэтому отражает суммарную секрецию кортизола корой надпочечников. Кроме того, между уровнем свободного кортизола в моче и биологически-активного кортизола

Для корреспонденции: Малышева Наталья Михайловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. клинико-диагностической лаборатории; e-mail: natalya.m@list.ru

в крови, как правило, существует прямая пропорциональная зависимость [1]. В распоряжении российских клинико-диагностических лабораторий имеются различные автоматизированные системы для определения всевозможных биохимических показателей и маркеров, в частности кортизола. Разработчики автоматизированных систем предлагают методики для определения кортизола не только в крови, но и в других биологических жидкостях (слюна, моча). Определение уровня кортизола в сыворотке крови проводится напрямую в полученном после центрифугирования образце, в то время как определение свободного кортизола в суточной моче требует дополнительной пробоподготовки, включающей выделение аналита с помощью экстракции. Ошибки в процессе выполнения анализа могут произойти на различных его этапах [2]. Цель настоящей работы – апробация, модификация и адаптация методик выделения и определения уровня свободного кортизола в суточной моче автоматическим анализатором Vitros ECi (Ortho Clinical Diagnostics, Великобритания) и анализатором Cobas 6000 (Hoffmann-La Roche, Швейцария) для удобства использования лабораториями в рутинной диагностике.

Материал и методы. Для исследования использованы образцы суточной мочи с низким, средним и высоким содержанием свободного кортизола пациентов, направленных для обследования в лабораторию ЭНЦ Минздрава РФ.

Для определения свободного кортизола в суточной моче очень важным моментом является правильность сбора мочи: 1) сбор строго суточной мочи (со 2-й порции в 1-й день до 1-й порции во 2-й день включительно); 2) измерение точного количества выделенной мочи. Без определения точного диуреза и пересчета на суточный объем мочи можно получить неправильный результат; 3) запрет на прием диуретиков или потребление повышенного содержания жидкости, на что обычно пациенты не обращают внимания; 4) учет возможного нарушения функции почек и печени, что может влиять на изменение нормального метаболизма кортизола и в конечном итоге на количество свободного кортизола.

Для проведения измерений использовали автоматический люминесцентный анализатор Vitros ECi (Ortho Clinical Diagnostics, Великобритания) и электрохемилюминесцентный анализатор Cobas 6000 (Hoffmann-La Roche, Швейцария). Ниже приведены варианты методик, предложенные разработчиками автоматизированных систем [3, 4].

Свободный кортизол в суточной моче (Vitros ECi): 1) 250 мкл мочи перенести в чистую стеклянную пробирку, добавить 1,25 мл охлажденного дихлорметана, тщательно перемешать на вихревом смесителе в течение 20 с; 2) поместить пробирку в ледяную баню не менее чем на 5 мин для разделения фаз; 3) удалить верхний слой; 4) перенести 750 мкл нижнего органического слоя в чистую стеклянную пробирку; 5) выпарить растворитель путем пропускания воздуха или азота над жидкостью; 6) растворить сухой остаток в 150 мкл раствора для разведения образцов (High Sample Diluent B); 7) перенести весь объем в емкость для микрообразцов и анализировать образцы так же, как и образцы крови. Чтобы получить количество выделенного кортизола за сутки, полученный на анализаторе результат следует умножить на объем суточной мочи (в литрах).

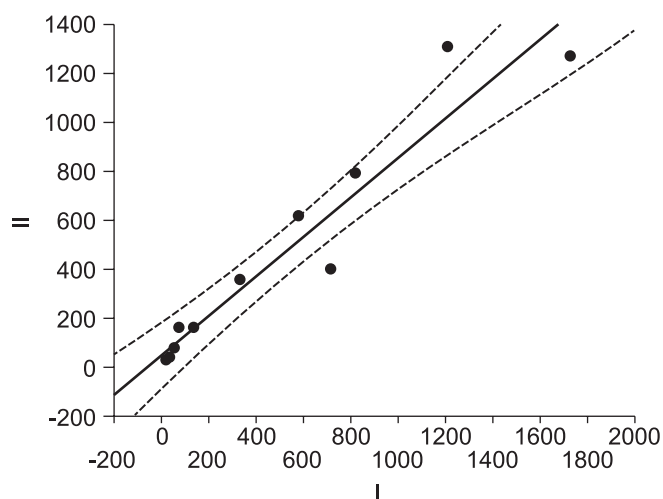


Рис. 1. Сравнение результатов определения свободного кортизола в моче методами I и II, нмоль/сут.

По оси абсцисс – метод I, предложенный лабораторией ЭНЦ для аппарата Vitros ECi (экстракция диэтиловым эфиром); по оси ординат – метод II, предложенный разработчиками для аппарата Cobas 6000.

Здесь и на рис. 2–3 – сплошная линия – линия регрессии, пунктирная – доверительный интервал 5–95%.

Свободный кортизол в суточной моче (Cobas 6000):

1) 600 мкл мочи и 3 мл дихлорметана тщательно перемешать в закрытой стеклянной пробирке на вихревом смесителе в течение 7 мин; 2) для разделения фаз центрифугировать при 2500 g в течение 5 мин; 3) с помощью аспиратора удалить и отбросить водную фазу и возможный осадок на границе фаз; 4) перенести 1,5 мл дихлорметановой фазы в чистую стеклянную пробирку и полностью удалить дихлорметан в медленном потоке азота до получения сухого остатка; 5) растворить сухой остаток в 300 мкл универсального раствора для разведения образцов (Elecsys Diluent Universal) и инкубировать при температуре 15–25°C в течение 30 мин при перемешивании; 6) анализировать полученные образцы так же,

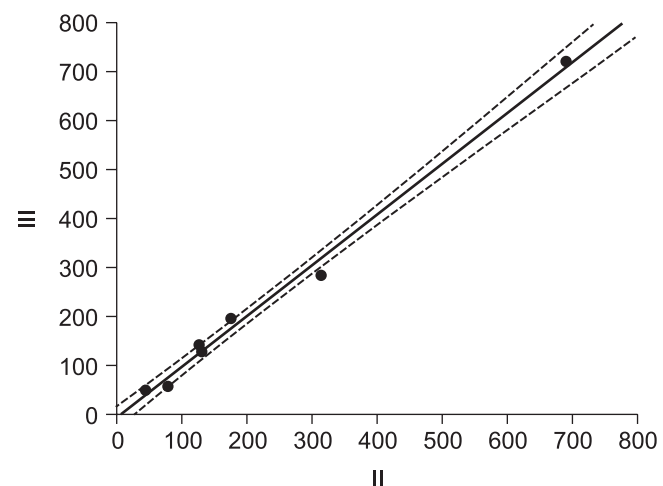


Рис. 2. Сравнение результатов определения свободного кортизола в моче методами II и III, нмоль/сут.

По оси абсцисс – метод II, предложенный разработчиками для аппарата Cobas 6000; по оси ординат – метод III, предложенный лабораторией ЭНЦ для аппарата Cobas 6000.

Таблица 1

Сравнение результатов определения свободного кортизола в суточной моче (в нмоль/сутки), полученных разными методами. Данные представлены в виде Mediana±SD (5–95%-интервалы)

Метод	Показатель	Коэффициент корреляции	<i>p</i>
I	341±560,5 (25–1732)	0,96	< 0,001
II	348±475,9 (23–1308)		
II	176±194,5 (42–691)	1	< 0,001
III	194±203,2 (48–728)		
I	117±351,5 (36–1023)	0,99	< 0,001
III	97±417,7 (48–1248)		

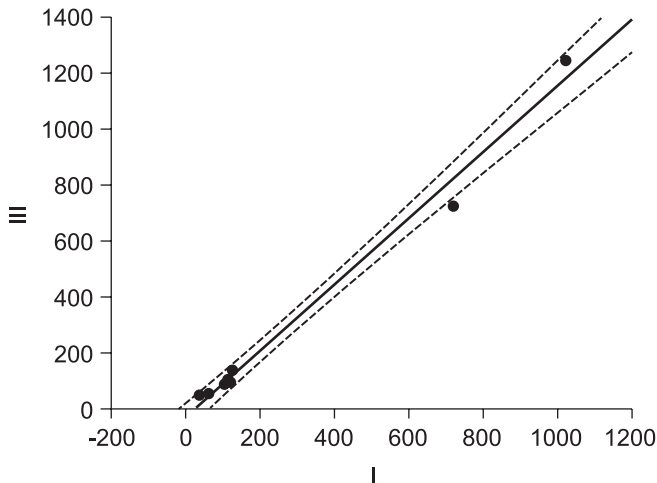


Рис. 3. Сравнение результатов определения свободного кортизола в моче методами I и III, нмоль/сут.

По оси абсцисс – метод I, предложенный лабораторией ЭНЦ для аппарата Vitros Eci (экстракция диэтиловым эфиром); по оси ординат – метод III, предложенный лабораторией ЭНЦ для аппарата Cobas 6000.

как и образцы сыворотки и плазмы. Чтобы получить количество выделенного кортизола за сутки, полученный на анализаторе результат следует умножить на объем суточной мочи (в литрах).

Как видно из приведенных методик, различия в них касаются количества анализируемого образца мочи, способа разделения экстракта и водной фазы, а также удаления органической фракции.

В нашей лаборатории (ЭНЦ Минздрава РФ) были апробированы следующие модификации методик выделения свободного кортизола из суточной мочи.

Для аппарата Cobas 6000 было сокращено время экстракции, что не отразилось на эффективности, но существенно снизило временные затраты на проведение анализа. Вместо выпаривания экстракта мочи в токе азота мы использовали вакуумную центрифугу, что технически значительно упрощает данный этап методики. Таким образом, схема анализа может быть представлена следующим образом: 1) 600 мкл мочи и 3 мл дихлорметана тщательно перемешать в закрытой стеклянной пробирке на вихревом смесителе в течение 2 мин; 2) для разделения фаз центрифугировать при 2500 g в течение 5 мин; 3) с помощью аспиратора удалить и отбросить водную фазу и возможный осадок на границе фаз; 4) перенести 1,5 мл дихлорметановой фазы в полипропиленовую пробирку Eppendorf и центрифугировать на вакуумной центрифуге 30–40 мин при 1500 g и температуре 30°C до полного испарения растворителя; 5) растворить сухой остаток в 300 мкл универсального раствора для разведения образцов (ElecSysDiluentUniversal) и инкубировать при температуре 15–25°C в течение 30 мин при перемешивании; 6) анализировать полученные образцы так же, как и образцы сыворотки и плазмы. Чтобы получить количество выделенного кортизола за сутки, полученный на анализаторе результат следует умножить на объем суточной мочи (в литрах).

Для аппарата Vitros Eci экстракцию проводили диэтиловым эфиром, упаривали органиче-

скую фракцию на водяной бане, сухой остаток растворяли физиологическим раствором. Схема анализа представлена следующим образом: 1) 200 мкл мочи и 2 мл диэтилового эфира тщательно перемешать в стеклянной пробирке на вихревом смесителе в течение 1 мин; 2) водную фазу отделить замораживанием на ледяной бане; 3) полностью перенести диэтиловую фазу в чистую стеклянную пробирку и упарить на водяной бане при 37°C; 4) растворить сухой остаток в 200 мкл физиологического раствора и инкубировать при температуре 60°C в течение 5 мин, перемешать; 5) анализировать полученные образцы так же, как образцы сыворотки.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерной программы Statistica 7 (StatSoft, Inc USA). Данные представлены в виде медианы интерпроцентильного размаха между 5 и 95% процентилями. Для оценки сопоставимости выборок использовали коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми принимали различия $p < 0,05$.

Результаты. Ниже приведены результаты сравнительного исследования по определению свободного кортизола (табл. 1, рис. 1–3) для следующих вариантов метода: I – метод, предложенный лабораторией ЭНЦ для анализатора Vitros Eci (экстракция диэтиловым эфиром); II – метод, предложенный разработчиками для анализатора Cobas 6000; III – метод, предложенный лабораторией ЭНЦ для анализатора Cobas 6000.

Воспроизводимость метода определения кортизола, предложенного нами для аппарата Cobas 6000, оценивали путем анализа каждого образца мочи в одной постановке и в различных постановках (табл. 2). Для оценки воспроизводимости вычисляли коэффициент вариации (CV) по результатам 10 повторных определений. CV составил 1,7–3,7% для одной поставки и

Таблица 2

Воспроизводимость метода, предложенного лабораторией ЭНЦ для аппарата Cobas 6000 (для каждого образца $n = 10$)

Образцы	Воспроизводимость внутри постановки		Образцы	Воспроизводимость между постановками	
	медиана±SD, нмоль/сут	CV, %		медиана±SD, нмоль/сут	CV, %
Образец 1	42,8±1,5	3,5	Образец 4	148,3±9,3	6,2
Образец 2	312,6±11,7	3,7	Образец 5	732,5±41,9	5,2
Образец 3	1702±30	1,7	Образец 6	1203±69	5,7

5,2–6,7% для разных постановок, что отвечает необходимым требованиям.

Обсуждение. Сравнение результатов определения свободного кортизола в моче, полученных автоматизированными системами Vitros Eci и Cobas 6000, показало хорошую сопоставимость значений между собой (см. табл. 1). Также определена статистически значимая ($p < 0,001$) корреляционная связь между значениями свободного кортизола в моче, полученными на этих системах. Воспроизводимость метода, предложенного лабораторией ЭНЦ для аппарата Cobas 6000, отвечает необходимым требованиям. Каждая из методик может быть использована для определения уровня свободного кортизола в моче.

Заключение. Опыт работы лаборатории ЭНЦ на указанных автоматизированных системах позволяет рекомендовать отработанные методики для исследования уровня свободного кортизола в суточной моче к широкому использованию в российских лабораториях. Выбор методики определяется имеющимися в наличии оборудованием и расходными материалами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Н.П., ред. Кортикостероиды: метаболизм, механизм действия и клиническое применение. М.: АдамантЪ; 2015.
2. Гончаров Н.П., Кация Г.В., Колесникова Г.С. Ключевые гормоны в эндокринологии и методы их определения. М: АдамантЪ; 2014.
3. Инструкция к набору реагентов для количественного определения кортизола VITROS Immunodiagnostic Products REF 1074053.
4. Инструкция к набору реагентов для количественного определения кортизола к анализаторам Elecsys и cobas e. Кат. № 11875116 122.

REFERENCES

1. Goncharov N.P., ed. Corticosteroids: Metabolism, Mechanism of Action and Clinical Application [Kortikosteroidy: metabolism, mechanism deystviya i klinicheskoe primeneniye]. Moscow: Adamant™; 2015. (in Russian)
2. Goncharov N.P., Katsiya G.V., Kolesnikova G.S. Key Hormones in Endocrinology and Methods of their Determination [Kluchevye gormony v endokrinologii i metody ikh opredeleniya]. Moscow: Adamant™; 2014. (in Russian)
3. Kit for the quantitative determination of cortisol VITROS Immunodiagnostic Products (instruction) REF 1074053.
4. Kit for the quantitative determination of cortisol by analyzers Elecsys and cobas e (instruction). Kat. № 11875116 122.

Поступила 20.01.17

Принята к печати 15.02.17

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155.392.11-06:616.9-022]-078.33

Плотникова С.В., Сафуанова Г.Ш., Азнабаева Л.Ф., Рябчикова Н.Р.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПЕРВИЧНЫХ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

Цель исследования – изучение клинико-лабораторных особенностей иммунного реагирования у первичных больных острым лейкозом и их значение в развитии инфекционных осложнений. Исследовали показатели иммунограммы, основные провоспалительные цитокины – ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α , молекулу межклеточной адгезии sICAM-1, а также экспрессию рецепторов к IgG (CD16, CD64) на клетках макрофагально-фагоцитарного звена и внутриклеточное содержание миелопероксидазы (МРО). Установлено, что развитие инфекционных осложнений сопряжено с дисбалансом врожденного иммунитета и характеризуется вовлечением в системное воспаление провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-6, молекулы межклеточной адгезии sICAM-1 и сниженной способностью нейтрофилов к фагоцитозу, обусловленной недостаточностью мембранной экспрессии рецепторов к IgG – CD16, в сочетании с ферментативной недостаточностью (МРО).

Ключевые слова: острый лейкоз; инфекционные осложнения; кластеры дифференцировки; цитокины.

Для цитирования: Плотникова С.В., Сафуанова Г.Ш., Азнабаева Л.Ф., Рябчикова Н.Р. Клинико-лабораторные критерии инфекционных осложнений у первичных больных острым лейкозом. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (6): 342-346. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-342-346>

Plotnikova S.V., Safuanova G.Sh., Aznabaeva L.F., Ryabchikova N.R.

THE CLINICAL LABORATORY CRITERIA OF INFECTIOUS COMPLICATIONS IN PRIMARY PATIENTS WITH ACUTE LEUCOSIS

The Bashkirskii' state medical university of Minzdrav of Russia, 450008 Ufa, Russia

Для корреспонденции: Плотникова Светлана Владимировна аспирант каф. терапии и ОВП с курсом гериатрии ИДПО БГМУ. 450000, Уфа; e-mail: lana.2005@mail.ru