

Обзор методов определения билирубина в крови и тканях человека

Овчинников И.М.

ЗАО НПП «ТЕХНОМЕДИКА»

Билирубин - эндогенное соединение, которое может быть токсичными при определенных условиях, в особенности, у новорожденных. Тем не менее, недавно было установлена антиоксидантная активность неконъюгированного билирубина и мягкая неконъюгированная гипербилирубинемия может защитить организм от развития сердечно-сосудистых заболеваний и опухолей. Билирубин - основной продукт распада гемоглобина является диагностическим признаком заболеваний печени и крови [16].

Цель - воспроизводимо, точно и специфично определять билирубин и его фракции в сыворотке, до сих пор не достигнута, не смотря, на множество имеющихся в наличие методов измерений. В дополнении к традиционным фотометрическим диазо методам, широко распространены методы: сухая химия и прямое спектрофотометрирование сыворотки и цельной крови. В научных целях для отдельного определения четырех фракций билирубина применяется ВЭЖХ [34]. Вплоть до начала 1950 годов считалось, что существует только две разновидности билирубина. Отличительным признаком для одной из них из них, названной прямой, является быстрое взаимодействие с диазо реагентом. Другая разновидность - непрямой билирубин, взаимодействует с диазо реагентом только после добавления ускорителя. Доля непрямого билирубина реагирующего без ускорителя мала ~ 2 % [16] . Реакционная способность непрямого билирубина в диазореакции уменьшается с понижением pH. Для снижения pH обычно используется добавление в пробу соляной кислоты и инкубирование смеси в течение 5 минут, затем добавляется диазосмесь. После инкубирования производится фотометрирование на длине волны 540 нм. При добавлении щелочного тартрата фотометрирование проводят на длине волны 598 нм. Предварительное инкубирование в кислой среде перед проведением прямой диазореакции минимизирует влияние неконъюгированного билирубина на результат определения прямого. Ценой минимизации служит уменьшенная ре-

акционная способность прямой фракции билирубина. С клинической точки зрения слегка заниженное значение прямого билирубина является более предпочтительным, чем ложно завышенное из-за неконъюгированного билирубина, которое может быть ошибочно интерпретировано как конъюгированная гипербилирубинемия. К сожалению, такое усложнение теста трудно реализовать на автоматических анализаторах.

Определяемый диазореагентом с ускорителем билирубин, состоящий из прямого и непрямого билирубина, называется общим. В качестве референтного метода определения общего билирубина, в настоящее время, CLIA предложен модифицированный Дюма метод Иендрашека [15]. Референтного метода определения прямого билирубина на настоящий момент не существует [10,27]. На точность результата определения билирубина фотометрическими биохимическими методами влияют некоторые компоненты крови. Эти компоненты либо меняют оптические характеристики пробы напрямую (поглощение и рассеяние), либо меняют ход аналитической реакции. К первому типу интерференции можно отнести липимичность пробы, вызывающая мутность. Гемоглобин, попадающий в пробу при лизировании эритроцитов, может влиять на результат как напрямую, из-за поглощения, так и за счет ингибирования аналитической реакции. Лизирование эритроцитов пробы характерны для неонатальной практики [11, 18]. Оптическую часть интерференции можно компенсировать дополнительным измерением контрольной пробы образца или измеряя оптическую плотности пробы на двух длинах волн, частично компенсируя гемолиз и липимичность. Кроме интерференции, реагенты могут значительно отличаться по верхнему диапазону линейности. В неонатальной практике встречаются очень высокий уровень билирубина. Поэтому, желательно выбирать реагенты с диапазоном линейности превышающем 340 мкм/л. Диапазон линейности обычно соответствует 10% отклонению от линейной калибровки. Следует принимать во внимание появления систематической ошибки при измерении пробы с концентрацией билирубина значительно отличающейся от концентрации стандарта.

Для выполнения анализа подходит как сыворотка, так и плазма с антикоагулянтом. При использовании плазмы в качестве пробы, производители реагентов рекомендуют использовать следующие антикоагулянты: гепаринаты лития, натрия и аммония, а также ЭДТА. Не рекомендуется использовать фторид натрия или оксалат калия, из за возможного стимулирования гемолиза. При использовании сыворотки в качестве пробы, следует обращать внимание на полное завершение процесса образования сгустка перед центрифугированием. В особенности, это касается пациентов, получающих антикоагулянтную или тромболитическую терапию. Иначе могут образовываться фибриновые сгустки, приводящие к неверным результатам. Непременным условием получения достоверных результатов определения билирубина является отсутствие пузырьков и пенообразования в реагентах. Для удаления пузырьков следует прогреть реагент до комнатной температуры достаточное время до проведения анализа. Пробы (плазма или сыворотка) могут храниться в темноте при следующих условиях:

Для прямого билирубина		Для общего билирубина	
Температура	Время хранения	Температура	Время хранения
От 20 до 25 С°	2 дня	От 20 до 25 С°	2 дня
От 2 до 8 С°	7 дней	От 2 до 8 С°	7 дней
-20 С°	3 месяца	-20 С°	6 месяцев

Таблица 1.

Кроме диазометодов определения билирубина разработан ряд методов основанных на окислении билирубина до биливердина. Методы используют разность спектров поглощения билирубина и биливердина. Окисление производится ферментативно - билирубин оксидазой [34]. В зависимости от рН реагента можно производить определение либо прямого билирубина, включая дельта билирубин, либо только конъюгированный билирубин, либо все фракции сразу. Некоторые методы основаны на неферментативном окислении билирубина, например, нитритом натрия, феррицианидом или ванадиевой кислотой [30, 31, 35]. Результа-

ты определения билирубина, основанные на окислении билирубина, хорошо коррелируют с диазометодами. Определение билирубина может производиться и в гемолизированной пробе (до 5 г/л гемоглобина).

Наряду с биохимическими методами определения билирубина широко применяются спектрофотометрические методы. В основном, используются бихроматические методики. В состав некоторых спектрофотометрических анализаторов билирубина входят полноценные спектрометры. В этом случае дополнительно появляется возможность определять фракции гемоглобина [3, 4, 19]. Бихроматические методы подходят, в основном, для неонатальной практики, поскольку каратиноиды могут повлиять на результат определения билирубина у взрослых. Однако, как показали наши исследования, применение бихроматического билирубинометра дает хорошие результаты при скрининге общего билирубина и у взрослых [6]. Одной из немаловажных причин популярности спектрофотометрических билирубинометров - малый объем пробы. Как известно, ОЦК доношенного новорожденного составляет около 200 миллилитров. Делать анализы на билирубин надо иногда несколько раз в день. Для измерения билирубина при помощи специализированного билирубинометра используется несколько десятков микролитров крови. Это значительно меньше, чем объем крови необходимый, для проведения измерений на биохимическом анализаторе. Диапазон линейности спектрофотометрических билирубинометров превышает 500 мкм/л. Спектрофотометрические методы работают с цельной кровью, сывороткой и плазмой. Часть спектрометрических методов дополнительно использует простейшие реагенты (кофеиновый реагент, буферные растворы). Все спектрофотометрические методы имеют компенсацию влияние гемолиза (> 5г/л) на результат. За рубежом спектрофотометрическими методами проводят более 2/3 анализа неонатального билирубина [9]. В России фирмой ТЕХНОМЕДИКА выпускается спектрофотометрический анализатор билирубина у новорожденных БИЛИМЕТ К.

Спектрофотометрические методы нашли применение при определении содержания билирубина в амниотической жидкости для прогнозирования развития гемолитической бо-

лезни новорожденных. За рубежом распространен анализ спинномозговой жидкости на наличие билирубина. Определение гемоглобина и билирубина в ликворе позволяет контролировать время возникновения кровотечения в ликворное пространство, Подобная информация особенно важна для анализа состояния жертв геморрагического инсульта [12].

Особое место в клинической лабораторной практике занимает диагностика неонатальной гипербилирубинемии. Неонатальная гипербилирубинемия наблюдается у 60% новорожденных. Поэтому в арсенале неонатологов необходимо иметь безопасный, безболезненный, желателен бескровный и достаточно специфичный метод скрининга гипербилирубинемии. Все упомянутые выше методы определения билирубина требуют забора крови у пациента. Как известно, для оценки уровня билирубина в крови всегда применялись транскутанные методы [26]. Визуальный осмотр кожи, склеры и слизистых оболочек, а так же цефалокаудальное развитие желтухи повсеместно используется для диагностики гипербилирубинемии. Делались более или менее удачные попытки стандартизовать какой-либо объективный метод визуальной оценки желтухи. Примеров такого метода может служить использование иктерометра [21]. В конце семидесятых годов американскими авторами [14] был предложен метод оценки гипербилирубинемии у новорожденных при помощи измерения спектрального состава отраженного от кожи света. Вскоре появился первый японский неинвазивный отражательный билирубинометр, а затем был разработан целый ряд отечественных и американских билирубинометров. В некоторых публикациях приводятся положительные результаты использования неинвазивных билирубинометров для взрослых пациентов [20]. В настоящее время выпускается около десятка оригинальных анализаторов и их китайских аналогов. В России фирма ТЕХНОМЕДИКА производит неинвазивные анализаторы гипербилирубинемии Билитест и Билитест 20000. Некоторые неинвазивные билирубинометры при измерении контактируют с кожей новорожденного, а некоторые фиксируются на заданном расстоянии от кожи (используются одноразовые спэйсеры - калибраторы). Одноразовые спэйсеры - калибраторы позволяют не проводить антисептическую обработку билирубино-

метра перед измерением. Стоимость одного измерения при этом значительно возрастает. Первые транскутанные билирубинометры использовали одноканальный бихроматический режим измерений, компенсирующий влияние капиллярной крови в коже на коэффициент отражения света. На показания транскутанных билирубинометров (ТСВ или ТБИ) влиял цвет кожи новорожденного, зависящий от содержания меланина в эпидермисе кожи. По мере развития теоретических основ биомедицинской оптики устройство неинвазивных билирубинометров усложнилось. Появились дополнительные оптические каналы. Количество спектральных диапазонов выросло. Кроме влияния цвета кожи удалось компенсировать разброс параметров рассеяния и толщины кожи новорожденного. В результате повысилась объективность оценки степени гипербилирубинемии. Ведущие отечественные и зарубежные педиатры не сомневаются в пользе транскутанных билирубинометров. Дискуссии ведутся лишь по поводу оптимальных алгоритмов их использования [1-2,5,8,13,17,22,25,28-29,32-33]. В литературе приводятся результаты сопоставления измерений билирубина неинвазивными анализаторами (ТСВ и ТБИ) и концентрации билирубина в крови (TSB). Эти результаты обрабатывались методами линейной регрессии. Приводимый разными авторами коэффициент корреляции между неинвазивными измерениями и общим билирубином крови варьируется в диапазоне 0.80-0.95. Среднеквадратичное отклонение разности неинвазивного определения билирубина и общего билирубина в крови составляет от 20 до 40 мкм/л.

Множество факторов влияет на перемещение билирубина из крови в кожные покровы и обратно. Проницаемость капилляров для альбумина и связанного с альбумином билирубина очень мала [7]. Жирорастворимые вещества и свободный билирубин легко проникают через стенку капилляра [7]. Количество свободного билирубина, которое может абсорбировать кожа значительно выше, чем количество билирубина, связанного с альбумином [23, 24]. Следовательно, основную роль в обмене между кровью и дермой играет свободный билирубин, концентрация которого, в крови становится заметной только при заполнении билирубином всех свободных связей альбумина (максимально 2 связи на молекулу альбумина). Общее

количество связей, на которых может закрепиться билирубин, определяется количеством альбумина в крови, а так же некоторыми химическими веществами в крови, в частности лекарственными препаратами и другими факторами. Свободный билирубин, в отличие от билирубина, связанного с альбумином, способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и попасть в мозг новорожденного. Величина ТСВ тесно связана с количеством подвижного билирубина, который может переходить из крови в ткани. Некоторые авторы полагают, что измерение ТСВ имеет самостоятельное диагностическое значение и рост ТСВ более важен для оценки тяжести гипербилирубинемии, чем рост TSB [32,8].

Результаты транскутанного определения билирубина используются для назначения фототерапии и заменного переливания крови только после определения содержания билирубина в крови биохимическим или спектрофотометрическим методом. В обзоре [8] отмечается, что введение медицинскую практику скрининговых транскутанных измерений билирубина у новорожденных, позволило снизить повторную госпитализацию с диагнозом гипербилирубинемия более чем в 2 раза. При этом значительно повысилась частота назначений процедуры фототерапии перед выпиской из родильных учреждений. В [8] отмечается что, как и для любого теста, производимого у постели больного, необходим контроль компетентности персонала производящего измерения.

Список литературы:

1. Н.Н.Володин, А.Г.Антонов, Е.В.Аронскинд, Е.Н.Байбарина, Д.Н.Дегтярев, А.В. Дегтярева, О.П. Ковтун, Ф.Г. Мухаметшин, О.В.Паршикова // Протокол диагностики и лечения гипербилирубинемии у новорожденных детей, Российская ассоциация специалистов перинатальной медицины
2. Н.А.Коровина, А.Л. Заплатников, А.Н.Горяйнова, Е.С. Кешищян, М.И. Пыков, И.И. Рюмина. // НЕОНАТАЛЬНЫЕ ЖЕЛТУХИ. Пособие для врачей. Утверждено Председателем секции по педиатрии Ученого Совета МЗ РФ, профессором Балевой Л.С.

Протокол №2 от 23.03.2004

3. Костюков Д.В., Лагутина Н.К., Павлушкина Л.В., Сецко И.В., Терешков В.П.// Лаборатория, №2, 2009, стр. 16-19
4. Лагутина Н. К., Ованесов Е. Н., Овчинников И. М., Павлушкина Л. В // Лаборатория, №4, 2007, стр. 15-16
5. Методические рекомендации. Диагностика и контроль гипербилирубинемии новорожденных с использованием неинвазивного транскутанного фотометрического анализатора "БИЛИТЕСТ" типа АГФ-02. Утверждены Заместителем Министра здравоохранения России Вагановым Н.Н. 19 февраля 1992 года.
6. Милютин И.А., Ованесов Е.Н., Овчинников И.М., Губайдуллин Б.Х.//, Лаборатория, №1, стр.15-19, 2009
7. Физиология человека. Под редакцией Р. Шмидта и Г. Тевса, Москва, Мир, 1996 в 3 томах, т.2, с 522
8. Samar N. El-Beshbishi¹, Karen E. Shattuck, Amin A. Mohammad and John R. Petersen // Clinical Chemistry Vol.55, 1280–1287, (2009)
9. By B. G. Blijenberg, H. A. Roetering and B. Leijnse// J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 25, pp. 177-181, 1987
10. Kwok-Ming Chan,¹ Mitchell G. Scott, Tal-Wing Wu, Ray E. douse, David R. CaMn, John Koenig, Don A. Uchtl, and Jack H. Ladenson// CLIN. CHEM. 31/9, 1560-1563 (1985)
11. RBP-EIA: Collecting, Processing, and Handling Venous, Capillary, and Blood Spot Samples. //www.path.org
12. Anne Cruickshank¹, Peter Auld, Robert Beetham, Gillian Burrows, William Egner, Ian Holbrook, Geoff Keir, Emma Lewis, Dina Patel Ian Watson and Peter White. // Annals of Clinical Biochemistry 2008; 45: 238–244
13. Dalal SS, Mishra S, Agarwal R, Deorari AK, Paul V.// PEDIATRICS Vol. 124, pp. e851-e857, 2009

14. Dewitt, David P. , Hannemann, Robert E. ,Wiechel, John F. // Патент США, 4029085, 1977
15. BT Doumas, PP Kwok-Cheung, BW Perry, B Jendrzeczak, RB McComb, R Schaffer and LL Hause // Clinical Chemistry Vol. 31, pp 1779-1789, 1985
16. J. Fevery Liver International pp 592-605 2008
17. Varvarigou A, Fouzas S, Skylogianni E, Mantagou L, Bougioukou D, Mantagos S.. // Pediatrics. 124pp1052-9, 2009
18. Joseph J. Frank, Edward W. Bernes, Margaret J. Bickel, and Bruce F. Watkins. //CLIN. CHEM. 24/11, 1966-1970 (1978)
19. by Ingrid Fussing Ph.D.// Measuring Bilirubin on Whole Blood //Bulletin RADIOMETER Copenhagen No. 15-2000
20. Harbrecht BG, Rosengart MR, Bukauskas K, Zenati MS, Marsh JW Jr, Geller DA. // J Am Coll Surg. 2008; V. 206(3): pp 1129-36. 2008
21. Gupta PC, Kumari S, Mullick DN, Lal UB. // Indian Pediatr. Vol. 28 pp 473-6, 1991
22. M Kaplan //, Journal of Perinatology (2008) 28, 389–397
23. Chiranjiv L. Kapoor and Coimbatore R. Krishna Murti Prakash C. Bajpai //, Biochem J., Vol. 142, pp 567–573, 1974
24. Chiranjiv L. Kapoor and Coimbatore R. Krishna Murti Prakash C. Bajpai //, Biochem J. Vol. 136, pp. 35–43, 1973
25. Mahajan G, Kaushal RK, Sankhyan N, Sharma RL, Nakra M.. //, INDIAN PEDIATRICS V. 42, pp 41-45 2005
26. L. I. Kramer // Am J Dis Child, Vol. 118, pp 454-458, 1969
27. John A. Loft' and Basil T. Doumas// //CLIN. CHEM. 39/4, 641-647 (1993)
28. Maisels MJ, Kring E. //, PEDIATRICS V. 117 pp 1169-1173, 2006

29. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation.
AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, CLINICAL PRACTICE GUIDELINE, Subcommittee on Hyperbilirubinemia// PEDIATRICS Vol. 114 No. 1 July 2004, pp 297-316
30. Morimoto Y, Ishihara T, Takayama M, Kaito M, Adachi Y. /J Clin Lab Anal, Vol.14:pp 27–31, 2000
31. O'Leary N, Pembroke A, Duggan PF.//Ann Clin Biochem. 1993 Mar;30 (Pt 2):175-9.
32. Rubaltelli FF, Gourley GR, Loskamp N, Modi N, Roth-Kleiner M, Sender A, Vert P. //, PEDIATRICS Vol. 107 pp. 1264-1271, 2001
33. Suwimol Sanpavat и др. //, J Med Assoc Thai Vol. 88 No.9 pp 1187-1193, 2005
34. Markus Thaler¹, Peter B. Lippa, Harald Schlebusch.//, J Lab Med 2008;32(1) pp 1-9
35. Tokuda K. and Tanimoto K. //, Jpn. J. Clin. Chem., 22 (2), 116-122 (1993)