

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ НА КОЖЕ****О. А. Арестова, Г. П. Дудченко***Кафедра теоретической и клинической биохимии ВолГМУ*

Изучена возможность использования кожного экскрета в качестве биоматериала для определения содержания мочевины. Экспериментально подобраны оптимальные условия забора экскрета кожи способом аппликации.

*Ключевые слова:* мочевина, кожный экскрет, аппликация, преаналитический этап.

**OPTIMIZATION OF PREANALYTICAL STAGE OF QUANTIFICATION  
OF UREA CONTENT IN SKIN****O. A. Arestova, G. P. Dudchenko**

The paper studies the possibility of using skin excretion as biomaterial for quantification of urea content. The study experimentally selected optimum conditions for skin excretion sampling by way of application.

*Key words:* urea, skin excretion, application, preanalytical stage.

В последние годы все больше внимания со стороны исследователей различных профилей уделяется новым, неинвазивным способам отбора материала для биохимического анализа. Преимущества их использования по сравнению с инвазивными состоят в том, что полностью исключается возможность инфицирования человека и снижается до минимума стрессовое воздействие при взятии проб. Точность любого метода определения напрямую зависит от способа отбора проб биологического материала, и поэтому большое внимание должно уделяться стандартизации условий проведения преаналитического этапа отбора образцов неинвазивным способом.

Определение концентрации мочевины является важным диагностическим параметром при целом ряде заболеваний, особенно при заболевании почек и выделительной системы [1].

По причине хорошей растворимости в воде мочевина легко переносится кровью и выводится с мочой, а при недостаточной активности функции почек роль выделительного органа частично берет на себя кожа и другие биологические жидкости [4].

Общепринятым диагностическим объектом для определения мочевины является плазма (сыворотка) крови и моча [2], однако этот метаболит можно исследовать и в некоторых других биологических образцах (например, в слюне или кожном экскрете) [3].

Определение мочевины в моче связано с рядом неудобств, во-первых, эстетических (забор образцов), во-вторых, анализ предполагает работу с суточной мочой, что не всегда устраивало испытателя по некоторым параметрам (например, необходимость отбора биологической жидкости после кратковременной физической нагрузки). Определение мочевины в слюне требует активной позиции испытуемого в вопросе забора образца, что не всегда осуществи-

мо при работе с группой больных людей. Кроме того, саливация тесно связана с проблемой трофики и имеет многофакторную зависимость (исходное гигиеническое состояние, заболевания полости рта, ритм питания) [4].

В связи с вышесказанным в качестве альтернативного крови образца представляется удобным объектом исследования кожный экскрет.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Подбор оптимальных условий проведения преаналитического этапа определения мочевины в кожном экскрете.

**МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве вариантов забора кожного экскрета рассматривались смыв и адсорбция аппликатором из фильтровальной бумаги. Первый способ отбора проб для получения надежных и воспроизводимых результатов требует оценки площади поверхности смыва и его эффективности, определения потерь аналитической жидкости при переносе в пробирки, анализа исходного гигиенического состояния кожи. Таким образом, мы остановились на отборе проб кожного экскрета вторым способом.

Оптимальный размер аппликатора для взятия проб с кожи подбирали экспериментально. Основными критериями удовлетворительного размера аппликатора для предполагаемого исследования являлись:

- аналитически определяемое количество мочевины, экстрагируемое данным размером аппликатора с поверхности кожи;
- оптимальное соотношение реактив/аппликатор (так как определение мочевины с кожи проводили без предварительной ее экстракции в раствор);

- аналитический резерв (диапазон линейности), позволяющий определять предположительно повышенное содержание мочевины на коже больных с почечной недостаточностью по сравнению со здоровыми людьми, без изменения размера аппликатора.

На первом этапе были исследованы 4 варианта размеров квадратных аппликаторов с длиной стороны от 0,5 до 2 см.

На втором этапе исследования готовили квадратные аппликаторы из разных типов фильтровальной бумаги с целью изучения адсорбтивно-десорбтивных свойств бумаги (для решения этой задачи использовали продукцию фирмы FILTRAK: 1-й тип — хроматографическая бумага FN1, 2-й тип — беззольная фильтровальная бумага сорт 391 «синяя лента», 3-й тип — беззольная фильтровальная бумага сорт 388 «черная лента»).

Десорбтивные свойства трех типов бумаги исследовали, сравнивая заведомо известное количество мочевины, нанесенное на аппликатор в виде калибровочных растворов мочевины в диапазоне концентраций 0,9—20 ммоль/л, с определяемым количеством мочевины при внесении растворов той же калибровочной линейки исследуемого вещества непосредственно в пробирку (стандартной калибровкой). Для определения концентрации исследуемого вещества использовали коммерческий набор фирмы «АГАТ-Мед», предназначенный для определения мочевины в крови, основанный на взаимодействии карбамида с диацетилмонооксимом в сильнокислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа с образованием красного комплекса, интенсивность которого пропорциональна концентрации мочевины в пробе.

Адсорбтивные свойства бумаги исследовали, сравнивая заведомо известное количество мочевины, нанесенное на кожу в виде калибровочных растворов мочевины в диапазоне концентраций 0,9—20 ммоль/л и снятое с нее аппликатором с пробирочной калибровкой. Предварительно кожа была тщательно обработана, что исключало присутствие в биопробах содержания дополнительного количества мочевины.

На внутреннюю поверхность кожи запястья руки (где отсутствует волосяной покров) наносились 20 мкл калибровочного раствора мочевины и адсорбировались аппликатором из фильтровальной бумаги размером 1×1 см до полного высыхания. Анализируемые пробы переносили в пробирки с рабочим реактивом и проводили стандартную процедуру определения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вариации размера аппликатора приведены в табл.

### Вариации размера аппликатора

| Номер исследуемого аппликатора | Сторона аппликатора, см | Площадь аппликатора, см <sup>2</sup> | Оптимальный объем воды для смачивания, мкл | Объем рабочего реактива, мл |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|
| 1                              | 0,5                     | 0,25                                 | 7,5  | 2                           |
| 2                              | 1                       | 1                                    | 20   | 2                           |
| 3                              | 1,5                     | 2,25                                 | 40   | 2                           |
| 4                              | 2                       | 4                                    | 60   | 2                           |

Для полного смачивания аппликатора № 1 требовалось 7,5 мкл воды. Такой объем для аналитических определений оказался недостаточным (при внесении образца предложенным объемом в пробирку часть раствора оставалась в наконечнике, а при нанесении того же объема на аппликатор весь раствор адсорбировался на бумаге).

Для смачивания аппликаторов № 3 и 4 потребовалось 40 и 60 мкл воды соответственно, что существенно увеличило время до полного высыхания (10—15 минут). Кроме того, большая площадь аппликаторов (2,25 и 4 см<sup>2</sup>) существенно сократила возможность отбора кожного экскрета для повторных определений в рамках одной серии (на поверхности запястья помещалось ограниченное число аппликаторов, что не отвечало запросам испытателя). Кроме того, переносить такие аппликаторы в пробирки стандартного размера крайне неудобно, приходилось сворачивать их, как минимум, пополам, что затруднило бы десорбцию вещества с аппликатора в аналитический раствор. Большой размер аппликатора потребовал большего расхода рабочего реактива (2 мл рабочего реактива оказалось недостаточным для аналитического определения).

Оптимальным для забора кожного экскрета оказался аппликатор № 2 (1×1 см). Для полного смачивания аппликатора требуется 20 мкл дистиллированной воды, что обеспечивает адсорбцию мочевины с поверхности кожи 1 см<sup>2</sup>.

Результаты по исследованию десорбтивных свойств разных типов бумаги приведены на рис. 1.

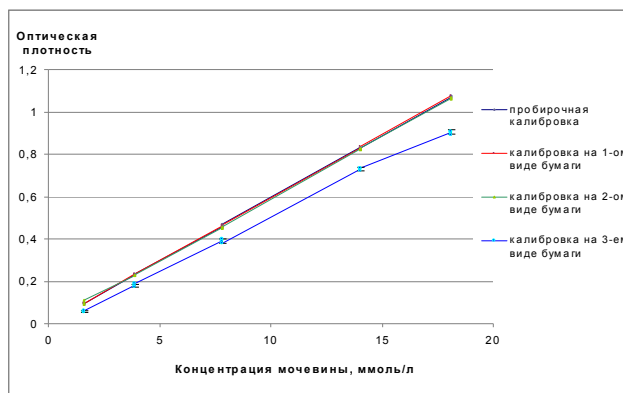


Рис. 1. Калибровочные кривые мочевины при десорбции вещества аппликаторами из различных типов бумаги

Результаты по исследованию адсорбтивных свойств разных типов бумаги приведены на рис. 2.

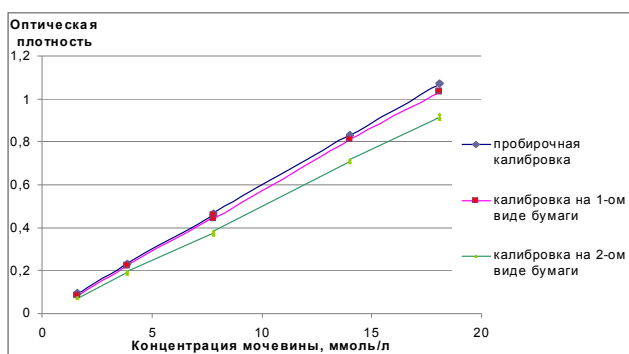


Рис. 2. Калибровочные кривые мочевины при адсорбции вещества аппликаторами из различных типов бумаги

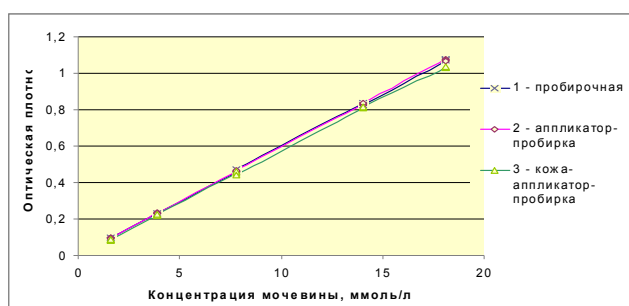


Рис. 3. Калибровочные кривые мочевины при десорбции и адсорбции вещества хроматографической бумагой FN1:

1 (пробирочная) — проба вносилась непосредственно в реакционную смесь; 2 (аппликатор—пробирка) — проба (20 мкл) вносилась на аппликатор, а затем вместе с аппликатором в реакционную смесь; 3 (кожа—аппликатор—пробирка) — проба наносилась на обработанную поверхность кожи, затем адсорбировалась аппликатором и переносилась в реакционную смесь

По результатам сравнения полученных значений калибровочных кривых мы отказались от третьего типа бумаги по причине плохих десорбтивных свойств и от второго типа бумаги по причине плохих адсорбтивных свойств. Хорошие адсорбтивно-десорбтивные свойства показала бумага 1-го типа, поэто-

му для изготовления аппликаторов для исследования содержания мочевины в кожном экскрете мы выбрали хроматографическую бумагу FN1 фирмы FILTRAK.

Отсутствие достоверных различий между тремя графиками отображенных зависимостей свидетельствуют о том, что данный тип бумаги обладает хорошими адсорбтивными и десорбтивными свойствами и обеспечивает полный перенос мочевины с поверхности кожи в аналитический раствор в исследованном диапазоне концентраций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы был экспериментально подобран размер аппликатора, позволяющий отобрать экскрет с поверхности кожи площадью 1 см<sup>2</sup> и имеющий аналитический резерв определения для оценки предположительно высоких значений мочевины на коже больных с хронической почечной недостаточностью, также был определен тип бумаги с хорошими адсорбтивно-десорбтивными свойствами для изготовления аппликаторов, отвечающий задачам исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Вандер А.* Физиология почек. Пер. с англ. — СПб.: Питер, 2000. — 256 с.
2. *Данилова Л. А.* Анализы крови и мочи. — СПб.: Салит-Мед. книга, 2000. — 128 с.
3. *Комарова Л. Г., Алексеева О. П.* Саливалогиа. — Нижний Новгород: издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. — 108 с.
4. *Храмов В. А., Гурина Е. Ю.* // Химия в школе — М.: РАО, изд-во «Центрхимпресс», 2005. — № 10. — С.63.

## Контактная информация

**Арестова Ольга Алексеевна** — аспирант кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: olgaarestova@mail.ru