

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.04-074:542.426

А.А. Гнеушева, В.Е. Веровский, О.В. Островский

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕДУРЫ ПРЯМОГО ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК

ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 400131, г. Волгоград, Российская Федерация

Прямой флуориметрический анализ внеклеточной свободной ДНК (внДНК) выглядит как перспективный тест для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Нами были оценены основные аналитические параметры этого метода, а также его региональные референтные интервалы, межиндивидуальная и внутрииндивидуальная вариабельность. Было установлено, что предел обнаружения метода равен 42,2 нг/мл, а ответ линеен до 1000 нг/мл ($R^2 > 0,99$). Замораживание/размораживание плазмы не оказывает никакого влияния на результат анализа вплоть до четвертого цикла. Хранение образцов крови перед центрифугированием в течение 8 ч не оказывает существенного влияния на измеряемый уровень внДНК. Хранение образцов плазмы при -20°C в течение месяца также не имеет существенного эффекта. Коэффициенты аналитических внутрисуточных и межсуточных вариаций не превышали 7,2%. Уровень внДНК в плазме у здоровых добровольцев составил $305,7 \pm 39,5$ нг/мл ($M \pm \sigma$), а в сыворотке — $422,7 \pm 86$ нг/мл. Индексы индивидуальности были равны 0,47 и 0,29 (плазма и сыворотка крови соответственно). Таким образом, в нашей работе показано, что прямой флуориметрический метод количественного определения внДНК характеризуется приемлемым для клинических исследований уровнем качества измерений, простотой процедуры, не требующей предварительной экстракции, и может стать перспективным протоколом для применения в рутинной лабораторной практике.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК; референсный интервал; аналитическая, внутрииндивидуальная, межиндивидуальная вариабельность.

Для цитирования: Гнеушева А.А., Веровский В.Е., Островский О.В. Клинико-лабораторная оценка процедуры прямого флуориметрического определения уровня внеклеточной ДНК. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (11): 769-772

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-11-769-772

Gneusheva A.A., Verovskii V.E., Ostrovskii O.V.

THE CLINICAL LABORATORY ANALYSIS ESTIMATE OF PROCEDURE OF DIRECT FLUORIMETRIC DETECTION OF LEVEL OF EXTRACELLULAR DNA

The Volgogradskii state medical university of Minzdrav of Russia, 400131 Volgograd, Russia

The direct fluorimetric analysis of extracellular free DNA looks like a perspective test for diagnostic and monitoring of oncologic diseases. The major analytical parameters of this technique were evaluated and its regional reference intervals and inter-individual and intra-individual variability as well. It was established that the technique limit of detection equals 42.2 ng/ml and response is linear till 1000 ng/ml ($R^2 > 0.99$). The freezing/unfreezing of plasma exerts no influence on result of analysis up to fourth cycle. The storage of blood samples during 8 hours before centrifugation has no significant effect on measuring level of extracellular free DNA. The storage of plasma samples at -20°C during a month also has no significant effect. The coefficients of analytical intra-day and inter-days variations not exceeded 7.2%. The level of extracellular free DNA in plasma of healthy volunteers amounted to 305 ± 39.5 ng/ml and 422.7 ± 86 ng/ml in serum. The indices of individuality made up to 0.47 and 0.29 (plasma and blood serum correspondingly). Therefore, it is demonstrated that direct fluorimetric technique of quantitative detection of extracellular free DNA is characterized by acceptable for clinical studies level of quality of measurements, simplicity of procedure requiring no preliminary extraction. This technique can become perspective protocol for application in routine laboratory practice.

Key words: extracellular free DNA; reference interval; analytical, intra-individual and inter-individual variability

For citation: Gneusheva A.A., Verovskii V.E., Ostrovskii O.V. The clinical laboratory analysis estimate of procedure of direct fluorimetric detection of level of extracellular DNA. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (11): 769-772 (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-11-769-772

For correspondence: Gneusheva A.A., post-graduate student of the chair of theoretical biochemistry and with course of clinical biochemistry. e-mail: alexa-1808@yandex.ru

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 12.04.2016
Accepted 15.05.2016

Анализ содержания внеклеточной ДНК (внДНК) в крови человека показал, что уровень этого маркера у онкологических больных существенно выше, чем в норме [1, 2]. Однако вопрос о перспективах использования данного показателя в клиниче-

Для корреспонденции: Гнеушева Александра Андреевна, аспирант каф. теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, e-mail: alexa-1808@yandex.ru

ской практике остается открытым [3]. Это связано с рядом факторов, таких как многостадийность и разнообразие процедур выделения и количественного определения внДНК, их высокая стоимость, а также отсутствие стандартизованного протокола, удобного для применения в практике обычной лаборатории.

В 2009 г. Н. Гольдштейном и соавт. [4] был разработан прямой флуориметрический метод количественного определения внДНК с использованием красителя SYBR Gold. По

Влияние условий хранения образца на результаты измерений

1. Стабильность образца плазмы при замораживании—оттаивании			
Цикл разморозки ($F = 5,3, p = 0,007$)*	Среднее значение, нг/мл	σ	Смещение, % ($M \pm \sigma$)
Исходная проба	351,0	20,9	
1	340,4	18,9	$-3,0 \pm 5,4$
2	359,5	21,3	$2,4 \pm 6,1$
3	385,0	19,8	$9,7 \pm 6,3$
4	395,3#	25,4	$12,6 \pm 7,2$
Внутридневная вариабельность		18,9	(КВ = 5,2%)
Междневная вариабельность		51,7	
2. Хранение образца крови при комнатной температуре			
Срок, ч ($F = 13,6, p < 0,001$)*	Среднее значение, нг/мл	σ	Смещение, % ($M \pm \sigma$)
0	352,0	24,9	
1	350,0	20,8	$-0,6 \pm 5,9$
2	354,7	20,8	$0,8 \pm 5,9$
4	359,7	21,2	$2,2 \pm 6,0$
8	376,5	20,1	$7,0 \pm 5,7$
24	439,6#	14,4	$24,9 \pm 4,1$
Внутридневная вариабельность		19,0	(КВ = 4,5%)
Междневная вариабельность		77,0	
3. Влияние длительного хранения образца плазмы при -20°C			
Срок, нед ($F = 1,4, p = 0,27$)*	Среднее значение, нг/мл	σ	Смещение, % ($M \pm \sigma$)
0	350,9	20,8	
1	344,9	21,7	$-1,7 \pm 6,2$
2	351,8	6,2	$0,25 \pm 1,76$
3	355,5	19,5	$1,32 \pm 5,56$
4	364,6	11,1	$3,9 \pm 3,15$
Внутридневная вариабельность		16,9	(КВ = 4,8%)
Междневная вариабельность		20,1	

Примечание: * — результаты 2-факторного дисперсионного анализа; # — $p < 0,05$ по критерию Даннета.

мнению ряда авторов, это точная и простая процедура для измерения уровня вДНК в биологических жидкостях, не требующая первичной экстракции ДНК и амплификации [4, 5].

Цель данного исследования состояла в определении характеристик метода, предусмотренных в требованиях к клиническим лабораторным технологиям [6, 7, 8, 9], а именно: определение аналитических параметров, региональных референтных интервалов, оценка внутрииндивидуальной и межиндивидуальной вариабельности данного показателя.

Материал и методы. Содержание вДНК измеряли прямым флуориметрическим методом согласно Czeiger D. et al. [5]. Краситель SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, кат. № S-11494) разводили 1:1000 в диметилсульфоксиде (ПанЭко, кат. № Ф135), а затем — 1:8 в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН = 7,4). Полученный реагент смешивали с пробой в соотношении 4:1. Измерения проводили на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi) при длине волны возбуждения 485 нм (ширина щели = 10 нм) и испускания 535 нм (ширина щели = 20 нм).

Оценку аналитических характеристик метода проводили согласно рекомендациям ICH, ГОСТ Р ИСО 11843-2—2007 [6, 7].

Изучение стабильности образцов сыворотки проводили согласно рекомендации управления по контролю качества продуктов и лекарств [8].

Предел обнаружения метода определяли при разведении стандартного раствора ДНК (Invitrogen, кат. № Q32854) ТЕ буфером (Амплисенс, REF 948) в диапазоне концентраций 0—500 нг/мл ($I = 8, J = 3, K = 2$). Влияние матрицы исследовали при разведении стандартного образца ДНК плазмой крови ($I = 6, J = 3, K = 2$). Для определения параметров стабильности пробы образец с известным уровнем ДНК подвергали трем циклам замораживания и оттаивания с интервалом 24 часа. Для изучения стабильности пробы при воздействии комнатной температуры образец цельной крови оставляли на 1, 2, 4, 8 и 24 ч до момента центрифугирования. Для исследования длительного воздействия температуры аликвоты образца с известной величиной уровня вДНК хранили до анализа при -20°C , после чего снова анализировали содержание вДНК в четырех приготовлениях с интервалом 1 нед в течение месяца.

Оценку сходимости (intra-assay precision) и воспроизводимости (intermediate precision) [6, 7] проводили на основании результатов 10 измерений двух образцов плазмы с разным уровнем содержанием вДНК в течение одного дня и в течение 10 дней соответственно. Для анализа пробы аликвотировали и хранили в замороженном виде.

Оценку индивидуальной вариабельности уровня вДНК плазмы и сыворотки крови проводили на образцах, взятых от 10 условно здоровых добровольцев (из них 2 мужчины и 8 женщин в возрасте от 22 до 31 года) на протяжении 4 нед [9]. Забор периферической крови проводился 1 раз в неделю. Образцы анализировались в дубликатах ($K = 2$).

Для оценки границ референтного интервала группа добровольцев формировалась в динамике путем накопления данных до достижения стабильных показателей среднего значения и стандартного отклонения. Критерии включения в данную группу были следующими: отсутствие острых воспалительных заболеваний, отсутствие аутоиммунной патологии, отсутствие инфаркта миокарда в острой фазе, отсутствие хирургического вмешательства за 10 дней до взятия биологических образцов. В конечном итоге размер группы составил 24 человека в возрасте от 25 до 61 года, из них 11 женщин (46%) и 13 мужчин (54%).

Расчет параметров функции отклика проводили с применением линейного регрессионного анализа. При оценке индивидуальной и групповой вариабельности, как и при анализе влияния условий хранения образца на результаты анализа, использовали многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, с множественными сравнениями по Даннету, при $p < \alpha$, Statistica 6). Критическим уровнем доверительной вероятности считали $\alpha = 0,005$.

Результаты. Аналитические характеристики метода. Зависимость аналитического сигнала от приготовленной концентрации образца (рис. 1) в пределах исследованного диапазона была линейной ($R^2 > 0,99$). Стандартные отклонения при разных уровнях аналита отличались незначительно, поэтому предел обнаружения метода рассчитывали в соответствии с ГОСТом Р ИСО 11843-2—2007. Значение предела обнаружения, полученное при анализе функции отклика при разведении стандартного образца ДНК ТЕ буфером, составило 42,2 нг/мл (см. рис. 1).

При исследовании влияния матрицы (плазмы крови) на параметры функции отклика было установлено, что как коэффициент детерминации (R^2), так и коэффициент чувствительности имеют те же значения, что и при разведении стандартного образца буфером (см. рис. 1). Оценка предела обнаружения в этих условиях оказалась даже более низкой (25,2 нг/мл). Таким образом, матрица не оказывает существенного влияния на результаты определения ДНК данным методом.

¹ ГОСТ Р ИСО 11843-2—2007 Статистические методы. Способность обнаружения. Часть 2. Методология в случае линейной калибровки. М.: Стандартинформ, 2007.

Таблица 2

Внутридневная (сходимость) и междневная (воспроизводимость) вариабельность метода, измеренная согласно рекомендациям ICH [6,7]

Вариабельность	M	σ	КВ%
Внутридневная	386,9	24,1	6,2
Внутридневная	754,8	54,7	7,2
Междневная	384,4	27,5	7,1
Междневная	725,9	39,6	5,4

Таблица 3

Характеристики распределения пациентов контрольной группы по содержанию вДНК в плазме и сыворотке крови, измеренному прямым флуориметрическим методом, нг/мл (n = 24)

Показатели	M	σ	Перцентили				
			5%	25%	Медиана	75%	95%
Плазма	305,7	39,5	249,0	275,9	309,4	325,0	363,6
Сыворотка	422,7	86,0	324,1	381,3	394,4	458,1	601,2

Влияние условий хранения образцов на результаты измерения. Замораживание образцов плазмы (табл. 1, п. 1) приводило к увеличению измеряемого уровня вДНК на $12,6 \pm 7,2\%$ ($p < 0,05$ по критерию Даннета) лишь при четвертом цикле замораживания-оттаивания.

Хранение образца крови до центрифугирования в течение 1—8 ч (табл. 1, п. 2) не оказывает существенного влияния на измеряемый уровень цДНК. При хранении в течение суток происходило повышение измеряемого уровня на $24,9 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$). Это может быть связано с выходом ДНК из оставшихся после центрифугирования клеток крови. Поэтому образцы плазмы должны быть отделены от клеток крови не более чем через 8 ч после венопункции.

Хранение образца плазмы при -20°C в течение месяца (табл. 1, п. 3) не приводит к достоверному изменению уровня внеклеточной ДНК ($p > 0,05$).

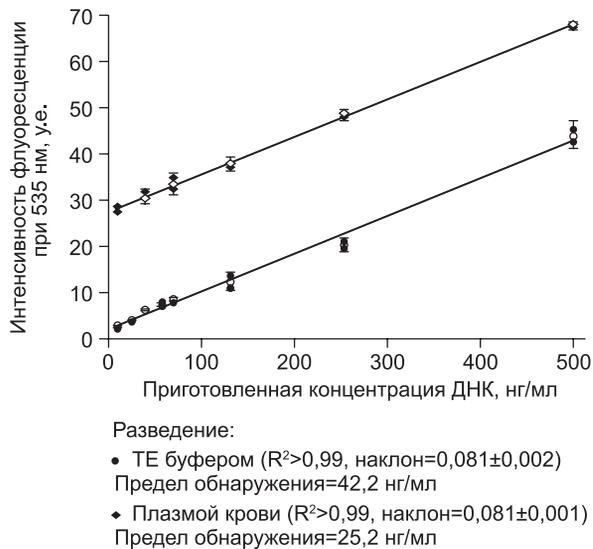


Рис. 1. Функция отклика метода прямого флуориметрического определения ДНК при разведении стандартного образца ДНК ТЕ буфером ($I = 8$, $J = 3$, $K = 2$ [8]) и плазмой крови ($I = 6$, $J = 3$, $K = 2$) (среднее значение \pm 95% доверительный интервал).

Таблица 4

Внутрииндивидуальная, межиндивидуальная, аналитическая вариабельность уровня вДНК в плазме и сыворотке крови

Показатели	CVi	CVg	CVa	II	RCV по С. Фрейзеру[9]
Плазма	16,2	34,2	4,7	0,47	45,7%
Сыворотка	11,2	38,5	3,4	0,29	31,6%

Оценка сходимости и воспроизводимости результатов измерения, проведенная согласно рекомендациям ICH [6, 7], для двух уровней содержания вДНК в плазме (табл. 2) показала, что их значения близки к тем, которые были получены при исследовании влияния условий хранения образца (см. табл. 1). Коэффициент вариации для внутридневной вариации не превышал 7,2%, для междневной был не более 7,1%.

Определение границ референтного интервала. При накоплении результатов определения вДНК у лиц без выявленной патологии оказалось, что параметры распределений мало изменяются после того, как размер выборки достигает 20 человек (рис. 2, 3). Поэтому выборку из 24 человек сочли достаточ-

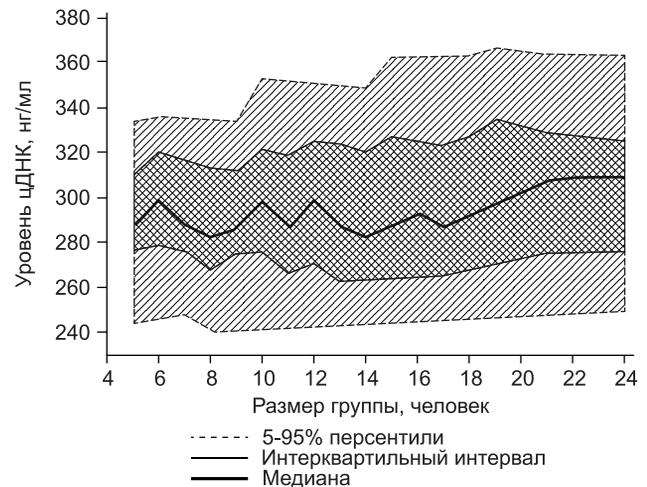


Рис. 2. Зависимость параметров распределения пациентов по уровню цДНК от размера группы при исследовании образцов плазмы.

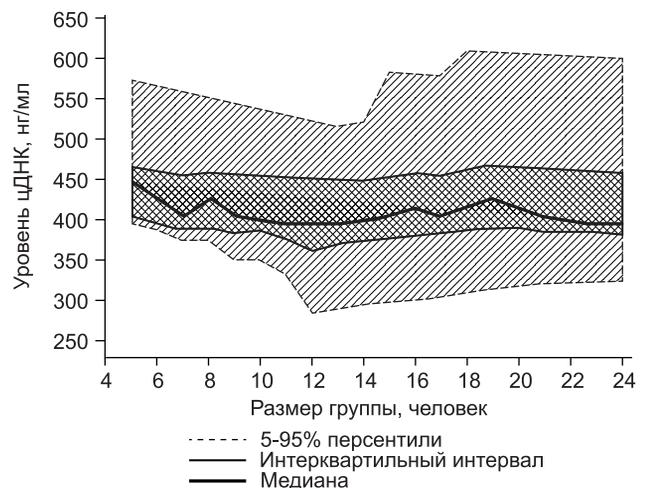


Рис. 3. Зависимость параметров распределения пациентов по уровню цДНК от размера группы при исследовании образцов сыворотки.

ной для предварительной оценки границ референсного интервала. Параметры распределения данной группы пациентов по измеренному прямым флуориметрическим методом уровню вДНК в плазме и сыворотке крови приведены в табл. 3.

Полученные нами данные сопоставимы с уровнем вДНК условно здоровых добровольцев по данным Н. Goldshtein [4] — 471 ± 203 нг/мл и R. Agassi [10] — 395 ± 248 нг/мл.

Результаты оценки внутрииндивидуальной и межиндивидуальной биологической вариабельности уровня вДНК в плазме и сыворотке крови приведены в табл. 4.

Индексы индивидуальности, рассчитанные на основе полученных данных о вариабельности показателя, оказались равными 0,47 и 0,29 (плазма и сыворотка соответственно). Согласно С. Fraser [9], такие значения соответствуют высокому вкладу индивидуальности, что позволяет предполагать необходимость учитывать при интерпретации данных динамики уровня вДНК плазмы и сыворотки крови именно коэффициент критической разницы (RCV).

Суммируя вышеизложенные наблюдения, можно говорить о перспективности исследования прямого флуориметрического метода количественного определения вДНК в связи с приемлемым для клинических исследований уровнем качества измерений, простотой процедуры и хорошей воспроизводимостью.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jin D., Xie S., Mo Z., Liang Y., Guo B., Yu M. Circulating DNA-important biomarker of cancer. *J. Mol. Biomarkers Diagn.* 2012; S2: 009.
2. Schwarzenbach H., Chun F.K., Isbarn H., Huland H., Pantel K. Genomic profiling of cell-free DNA in blood and bone marrow of prostate cancer patients. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 2011; 137: 811—9.
3. Board R.E., Williams V.S., Knight L., Shaw J., Greystoke A., Ranson M. et al. Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1137: 98—107.
4. Goldshtein H., Hausmann M.J., Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann. Clin. Biochem.* 2009; 46: 488—94.
5. Czeiger D., Shaked G., Eini H., Vered I., Belochitski O., Avriel A. et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011; 135: 264—70.
6. ICH Q2A: Validation of analytical methods: definitions and terminology. (CPMP/ICH/381/95); 1994.
7. ICH Q2B: Validation of analytical procedures: Methodology. (CPMP/ICH/381/95); 1996.
8. Nowatzke W., Woolf E. Best practices during bioanalytical method validation for the characterization of assay reagents and the evaluation of analyte stability in assay standards, quality controls, and study samples. *AAPS J.* 2007; 9(2): E117-22.
9. Fraser C.G. Biological Variation: From Principles to Practice. Washington: AACCPress; 2001.
10. Agassi R., Czeiger D., Shaked G., Avriel A., Sheynin J., Lavrenkov K. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015; 143(1): 18—24.

Поступила 12.04.16
Принята к печати 15.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 618.3-06:616.61-002.3-074

Бачева И.В., Умбеталина Н.С., Ахмалтдинова Л.Л.

ВОЗМОЖНОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО ЦИСТАТИНА С В ДИАГНОСТИКЕ ПИЕЛОНЕФРИТА У БЕРЕМЕННЫХ

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Карагандинский государственный медицинский университет» Минздрава Республики Казахстан, 100008, Караганда, Республика Казахстан

Цистатин С считается одним из маркеров функционального состояния почек у беременных. Настоящее исследование проводилось для оценки возможности его применения в качестве биологического маркера пиелонефрита у беременных. В исследовании приняли участие 126 беременных женщин с разными сроками гестации. Участницы были разделены на две группы: 1-я группа — с пиелонефритом (64 человека), 2-я группа — без пиелонефрита (62 человека). Сывороточные значения цистатина С определяли с помощью иммуноферментного анализа. Статистический анализ проводился непараметрическими методами с использованием критерия Краскела—Уоллиса для сравнения 3 независимых групп и критерия Вилкоксона (Манна—Уитни) для апостериорных сравнений.

Сравнительный анализ значений цистатина С у беременных в зависимости от триместра выявил повышение его уровня, начиная со II триместра — 0,815 (0,622; 0,914), и более высокие значения в III триместре — 1,076 (0,917; 1,463) ($p = 0,0007$). Этот тренд повторяется при детальном изучении показателей цистатина С в каждой группе по отдельности. Различия в значениях цистатина С в двух группах в целом и между триместрами не достигали статистически значимых уровней. Однако в группе с пиелонефритом его значения в I и III триместрах были выше, чем в группе без пиелонефрита.

Наиболее высокие значения содержания цистатина С у беременных женщин ($p = 0,0007$) наблюдались в III триместре. Межгрупповые различия сывороточных значений содержания цистатина С не были обнаружены, что не позволяет рекомендовать его в качестве раннего маркера повреждения почек у беременных при пиелонефрите.

Ключевые слова: беременность; цистатин С; пиелонефрит.

Для цитирования: Бачева И.В., Умбеталина Н.С., Ахмалтдинова Л.Л. Возможности сывороточного цистатина С в диагностике пиелонефрита у беременных. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(11): 772-776

DOI: 10.18821/0869-2084-2017-61-11-772-776

Для корреспонденции: Бачева Ирина Викторовна, асс. каф. внутренних болезней № 3, e-mail: irina_bacheva@mail.ru