

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ

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

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии*

Разработан протокол определения уровня внеклеточной ДНК в плазме крови, основанный на выделении ДНК сорбционным методом с последующим флуориметрическим определением концентрации. Определены основные аналитические характеристики данной процедуры. Региональный референтный предел уровня циркулирующей ДНК плазмы крови условно здоровых добровольцев составил 14,7—104,7 нг/мл.

Ключевые слова: циркулирующая внеклеточная ДНК.

OPTIMIZATION OF THE PROTOCOL OF DETERMINING THE LEVEL OF CELL-FREE DNA IN PLASMA

A. A. Gneusheva, V. E. Verovskiy, O. V. Ostrovskiy

We adapted the protocol of measuring cell-free DNA (cfDNA) level in plasma for application in clinical practice. This protocol is based on sorption extraction of DNA followed by measuring its concentration with a Qubit fluorometer. We explored the analytical parameters of this procedure. The regional reference limit of the cfDNA level in plasma of healthy volunteers was 14,7 ng/ml to 104,7 ng/ml.

Key words: cell-free DNA.

Использование внеклеточной ДНК как биомаркера в клинической медицине может стать перспективным направлением для мониторинга терапии онкологических заболеваний и прогноза течения процесса [6]. Однако тест на определение уровня циркулирующей ДНК (цДНК) нуждается в стандартизации и решении ряда аналитических проблем.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка унифицированного протокола по оценке уровня внеклеточной ДНК в плазме крови и проведение аналитической валидации разработанного метода.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

ДНК выделяли с помощью набора ДНК-сорб В (Интерлабсервис, Россия) с последующим определением концентрации ДНК на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США), используя набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Образцы венозной крови собирали в пробирки с ЭДТА (Improvacuter, США), клетки крови осаждали центрифугированием при 800 g в течение 15 мин, затем отбирали супернатант и центрифугировали вторично в течение 15 мин при 1600 g. Предел обнаружения (limit of detection) метода рассчитывали в соответствии с ГОСТ Р ИСО 11843-2-2007 [1] и ГОСТ Р ИСО 11843-3-2007 [2]. Оценка влияния матрицы на результаты измерения проводилась в соответствии с рекомендациями CLSI [4]. В качестве эталона был взят раствор стандартной ДНК (Invitrogen, США) с исходным содержанием нуклеиновой кислоты 1000 нг/мл в 5 разведениях (0 нг/мл, 25 нг/мл,

50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл). В качестве матрицы использовали: ТЕ-буфер (Интерлабсервис, Россия), 5%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА, Диа-М, Россия) и плазму от трех добровольцев. Все измерения проводили в дубликатах. Оценку сходимости проводили на основании 20 измерений двух образцов плазмы с разным содержанием внеклеточной ДНК. Для определения параметров стабильности пробы образец с известным уровнем ДНК подвергали трем циклам замораживания и оттаивания с интервалом 24 часа. Для анализа воспроизводимости исследовали 2 образца плазмы с нормальным и повышенным уровнем цДНК. Для этого пробы алиquotировали и хранили в замороженном виде. Каждый образец измеряли в трипликатах. Для изучения стабильности пробы при воздействии комнатной температуры образец цельной крови оставляли на 1, 2, 4, 8 и 24 часа до момента центрифугирования и выделения ДНК. Для исследования длительного воздействия температуры образец с известной величиной уровня цДНК разалиquotировали и заморозили при -20 °С. Далее снова анализировали содержание цДНК в 4 приготовлениях с интервалом от 1 недели до 2 месяцев. Оценку групповой биологической вариабельности и референтного интервала выполняли на образцах плазмы от 54 здоровых добровольцев. Критериями включения в данную группу были следующие: отсутствие острых воспалительных заболеваний, отсутствие аутоиммунной патологии, отсутствие инфаркта миокарда в острой фазе, отсутствие хирургического вмешательства за 10 дней до взятия биологических образцов.

Возраст обследованных был от 19 до 57 лет, женщины составляли 39 %, а мужчины 61 %. Для расчета параметров функции отклика использовали линейный регрессионный анализ. Анализ данных, полученных при изучении стабильности пробы, проводили с привлечением многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими множественными сравнениями по Данниту. Для оценки репрезентативности группы здоровых добровольцев рассчитывали накопленное среднее значение и стандартное отклонение показателя уровня цДНК (для N от 10 до 54).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предел обнаружения метода, рассчитанный в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р ИСО 11843-2-2007, составил 16,9 нг/мл, в соответствии с ГОСТ Р ИСО 11843-3-2007, составил 11,2 нг/мл (рис. 1). Эти величины существенно ниже, чем уровень цДНК, определенный флуориметрическим методом, приведенный в статьях разных авторов [3, 5].

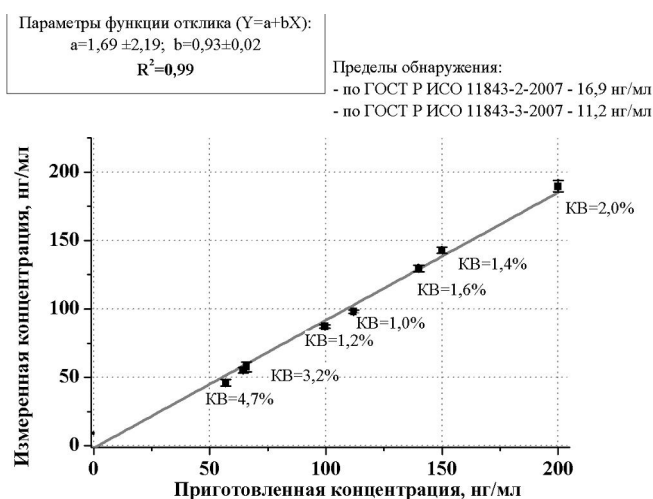


Рис. 1. Зависимость измеренного уровня ДНК от приготовленного разведения ДНК с указанием коэффициента вариации

Результаты оценки влияния матрицы на параметры функции отклика приведены в табл. Вариация значения функции отклика (параметр a , табл.) при разведении плазмой, очевидно, связана с неодинаковым содержанием аналита в разных биологических образцах. Коэффициент чувствительности (b , табл.) и коэффициент детерминации (R^2) при использовании всех тех матриц был близок к 1. Значение параметра b статистически значимо не отличалось при использовании всех трех матриц. Таким образом, существенного влияния матрицы на результаты определения ДНК не выявлено.

Однократное замораживание не влияет на уровень цДНК ($p = 0,67$). При последующих циклах происходит статистически значимое повышение концен-

трации ДНК (рис. 2). Относительная ошибка данных ($\Delta[\text{цДНК}]/[\text{цДНК}]_{\text{свежей}}$, %) увеличивается после второго размораживания образца до 54 %. Это может являться следствием того, что количество ДНК в ядрах клеток значительно превосходит их уровень во внеклеточном пространстве. Поэтому лизис нескольких оставшихся в супернатанте клеток может значительно увеличить уровень цДНК.

Зависимость параметров функции отклика ($Y = a + bX$) от вида матрицы ($M \pm 1,96 \cdot m$)

Параметры	a	b	R2
ТЕ	$6,0 \pm 3,0$	$0,90 \pm 0,03$	0,99
5% БСА	$7,8 \pm 4,5$	$0,89 \pm 0,04$	0,99
Плазма 1	$42,7 \pm 7,4$	$0,93 \pm 0,07^*$	0,99
Плазма 2	$31,4 \pm 5,8$	$0,94 \pm 0,06^*$	0,99
Плазма 3	$48,5 \pm 9,3$	$0,95 \pm 0,09^*$	0,98

* $p > 0,05$ при сравнении с параметром b при использовании ТЕ-буфера.

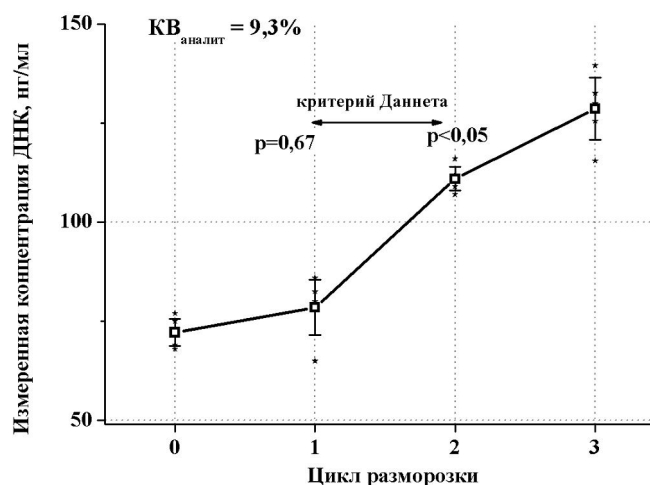


Рис. 2. Стабильность образца плазмы при замораживании-оттаивании, ($M \pm 1,96 \cdot m$)

Хранение образца крови до центрифугирования от 1 часа до 4 не оказывает существенного влияния на уровень цДНК (рис. 3), при хранении образца более 4 часов происходит статистически значимое повышение уровня цДНК на 24 %, что может быть связано с выходом ДНК из клеток крови. Поэтому образцы плазма должны быть отделены от клеток крови не более чем через 4 часа после венепункции.

Хранение образца плазмы при -20°C в течение 2 месяцев не приводит к достоверному изменению уровня внеклеточной ДНК (рис. 4).

При оценке воспроизводимости процедуры анализа уровня цДНК в плазме крови для различных концентраций цДНК — 38,2 нг/мл, 295,7 нг/мл коэффициент вариации составил соответственно 8,1 и 8,3 %. При оценке сходимости результатов

коэффициент вариации при уровне цДНК 54,5 нг/мл составил 5,9 %, при уровне 180,5 нг/мл составил 4,8 %.

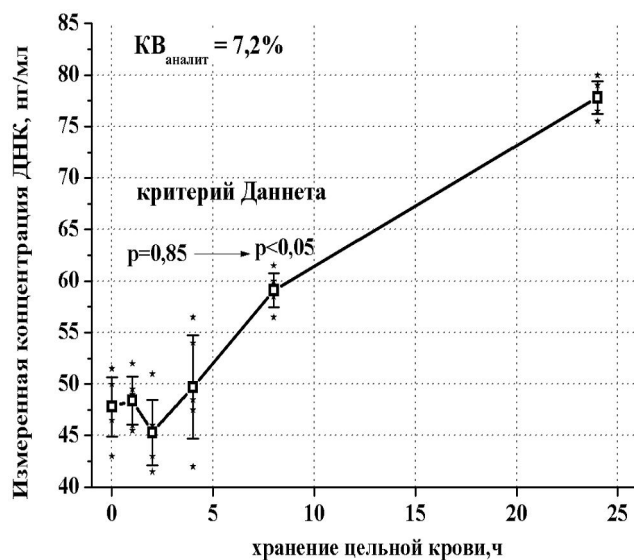


Рис. 3. Влияние хранения образца крови при комнатной температуре до центрифугирования, ($M \pm 1,96 m$)

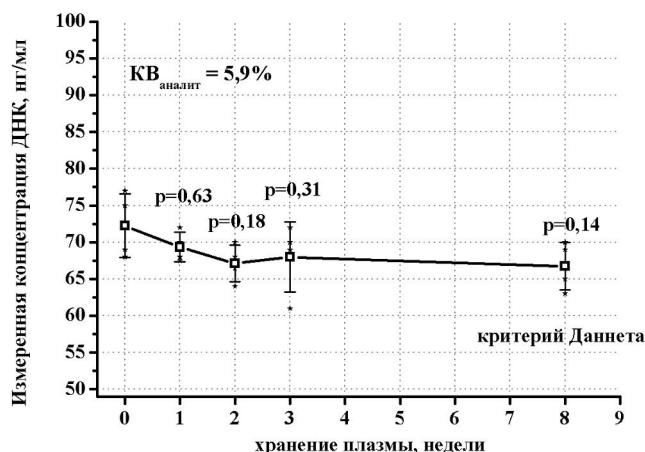


Рис. 4. Влияние длительного хранения образца плазмы при -20°C , ($M \pm 1,96 m$)

Отметим, что ни в одной из серий коэффициент аналитической вариации не превышал 10 %. Таким образом, по аналитическим характеристикам метод соответствует приемлемому для клинических исследований уровню качества измерений.

Распределение результатов измерения уровня цДНК в группе здоровых добровольцев оказалось крайне асимметричным (рис. 5). Несмотря на это, после 47 наблюдений (рис. 6) среднее значение и стандартное отклонение стабилизировались. Поэтому объем выборки 54 человека оказался достаточным для оценки референтного интервала.

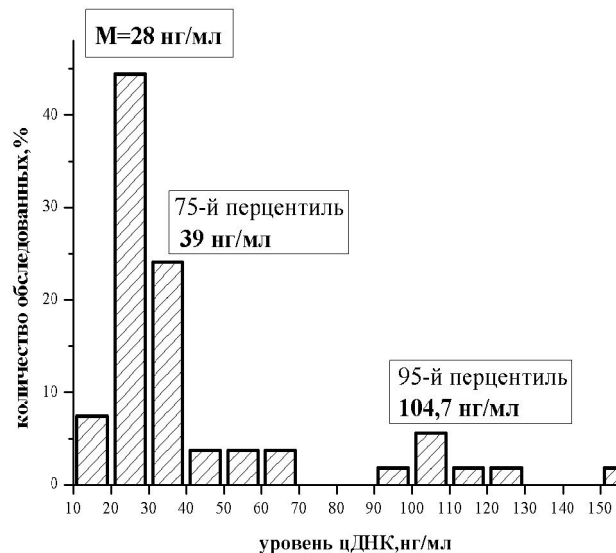


Рис. 5. Распределение обследованных по уровню цДНК

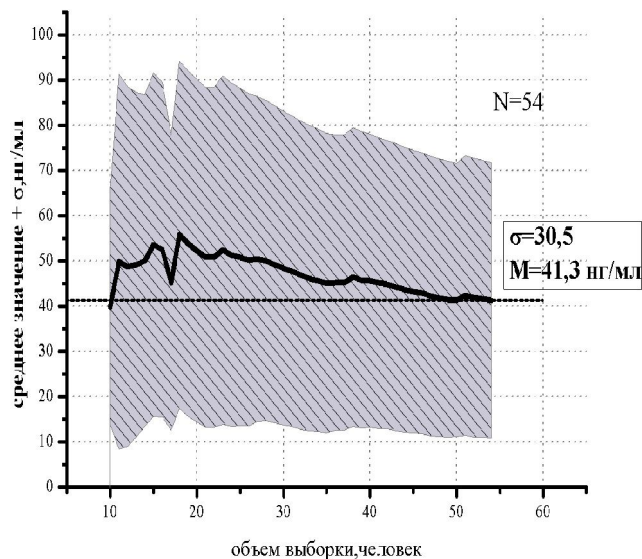


Рис. 6. Зависимость стандартного отклонения от объема выборки

Медиальное значение уровня цДНК составило 28 нг/мл, у 41 обследованного (75 %) концентрация цДНК была менее 40 нг/мл, в то время как у 6 обследованных (11 %) уровень цДНК превышал 90 нг/мл. Мы не стали исключать данных пациентов, хотя достаточно высокие значения уровня цДНК могут быть обусловлены наличием пока еще недиагностированной патологии. При установлении верхней границы референтного интервала мы предлагаем использовать значение 95-го перцентиля от 0, так как диагностическое значение имеет только повышение уровня цДНК. Корреляции между уровнем цДНК и возрастом не выявлено (по Спирмену, $R = 0,055$; $p = 0,68$). При сравнении уровня цДНК у мужчин и женщин статистически значимых различий не обнаружено (по Манну-Уитни, $p = 0,38$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный в работе протокол позволяет получать результаты с приемлемым для клинических исследований уровнем качества измерения. Стабильность замороженного образца плазмы при 2-месячном хранении позволяет рассчитывать на возможность применения сливной плазмы в качестве контрольных материалов.

Региональный референтный предел уровня циркулирующей ДНК плазмы крови условно здоровых добровольцев составил 14,7—104,7 нг/мл. Какой-либо связи между возрастом, полом и уровнем цДНК не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р ИСО 11843-2-2007 Статистические методы. Способность обнаружения. Часть 2. Методология в случае линейной калибровки. — М.: Стандартинформ, 2007. — 19 с.
2. ГОСТ Р ИСО 11843-3-2007 Статистические методы. Способность обнаружения. Часть 3. Методология определения критического значения отклика без ис-

пользования данных калибровки. — М.: Стандартинформ, 2007. — 17 с.

3. Тамкович С. Н., Власов В. В., Лактионов П. П. // Молекулярная биология. — 2008. — Т. 42, №1. — С. 12—23.

4. Clinical and laboratory standards institute. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. Proposed guideline // CLSI document EP6-P. Wayne, PA USA, 2004. — 39 p.

5. Pathak A. K., Bhutani M., Kumar S., Mohan A., Guleria R. // Clin Chem. — 2006. — P. 1833—42.

6. Van der Vaart M., Pretorius P. J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2008. — P. 92—97.

Контактная информация

Гнеушева Александра Андреева — аспирант кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: alexa-1808@yandex.ru

УДК 613.95:574

СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

Л. А. Давыденко, А. В. Беляева

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра общей гигиены и экологии,
Волгоградский медицинский научный центр*

Выполнен сравнительный анализ состояния здоровья и менструальной функции девочек-подростков учащихся общеобразовательных учреждений районов города с разной антропогенной нагрузкой.

Ключевые слова: состояние здоровья, физическое развитие, менструальная функция, антропогенная нагрузка, патологическая пораженность.

HEALTH STATUS OF FEMALE ADOLESCENTS RESIDING IN AREAS WITH DIFFERENT DEGREE OF ANTHROPOGENIC IMPACT

L. A. Davydenko, A. V. Belyaeva

A comparative study of health status and menstrual function in female adolescents attending secondary schools in areas with different degree of anthropogenic impact was performed.

Key words: health status, physical development, menstrual function, anthropogenic impact, disease prevalence.

Репродуктивные процессы девушек, при вступлении ими в фертильный возраст, могут быть существенно ограничены распространенностью и структурой общесоматической патологии в подростковом периоде [1, 2]. В этом случае хронические заболевания, возникшие в детском и подростковом возрасте, трансформируются как экстрагенитальная патология с соответствующим влиянием на течение и исход беременности.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить состояние здоровья девочек-подростков, проживающих на территориях города с различной антропогенной нагрузкой.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании принимали участие 593 девочки-подростка, учащихся 9 (14—15 лет) и 11 (16—17 лет) классов общеобразовательных учреждений, проживающих на территориях Волгограда, различающихся по экологическим и социально-экономическим условиям. Промышленная территория (Красноармейский и Кировский районы) — неблагоприятная по экологическим и социально-экономическим характеристикам, и центральная территория (Ворошиловский, Центральный районы) — относительно благополучная. Выполнен анализ результатов медицинского осмотра с расчетом показателя «патологическая пораженность». Оценка