

УДК 57.083.3; 577.18

© Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИКЛОСПОРИНА А В КРОВИ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

И.П. Андреева^{1,2}, Н.Т. Воробьева³, Л.И. Винницкий³, С.С. Богущ¹,
Е.М. Гаврилова¹, А.М. Егоров^{1,2}*

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва,
Ленинские горы, д. 1, с. 11, ГСП-1; тел.: (495) 9393492; факс: (495) 9392742;
эл. почта: imtek@newmail.ru

²ЗАО "Научно-внедренческое общество Иммунотех", Москва

³ГУ Российский научный центр хирургии имени акад. Б.В. Петровского РАМН,
лаборатория иммунологии и регуляторных механизмов в хирургии, Москва

Разработана иммуноферментная тест-система для количественного определения циклоспорина А (ЦсА) в цельной крови человека на основе конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Определены оптимальные условия проведения анализа. Предел обнаружения метода составил 25 нг/мл, линейность метода в диапазоне концентраций 60-1400 нг/мл составила 94-105%, коэффициент вариации результатов определения не превышал 8%. Показана хорошая корреляция результатов анализа с радиоиммунологическим и поляризационно-флуоресцентным методами анализа, коэффициенты линейной регрессии составили 0,965 и 0,984, соответственно. Разработанная тест-система стабильна в течение 9 месяцев при хранении при 4°C и может быть использована в клинической практике.

Ключевые слова: циклоспорин А, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ. Методы твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) широко применяются в медицинской диагностике, в том числе в клинических лабораториях для терапевтического мониторинга гормонов, лекарственных средств, диагностике вирусов (ВИЧ, гепатит) и бактерий, а также в биохимических и микробиологических исследованиях.

Лекарственный мониторинг обычно проводится в целях контроля уровня содержания лекарства в организме, чтобы убедиться в том, что выбранный режим дозирования для каждого конкретного пациента позволяет получить терапевтически эффективную концентрацию, не оказывающую токсического действия.

Циклоспорин А (ЦсА) обладает сильными иммуносупрессивными свойствами [1, 2]. Использование ЦсА в терапии пациентов с трансплантированными органами позволило увеличить выживаемость после трансплантаций в среднем более, чем в 3 раза. В организме ЦсА подвергается интенсивному метаболизму под воздействием монооксигеназной системы цитохром Р450 печени. В настоящее время из крови и внутренних органов выделено и охарактеризовано около десяти метаболитов ЦсА. Метаболиты обладают высокой нефро- и гепатотоксичностью.

* - адресат для переписки

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЦИКЛОСПОРИНА А В КРОВИ

Индивидуальность выведения из организма циклоспорина А и высокая токсичность его метаболитов делают совершенно необходимым постоянный оперативный контроль за содержанием препарата в организме пациентов [3, 4].

В связи с этим возникла необходимость создания быстрых и точных методов определения концентрации ЦсА в крови пациентов. Кроме того, немаловажными факторами при частом проведении анализа являются простота метода, надежность, воспроизводимость и низкая стоимость. В настоящее время для определения концентрации ЦсА применяются различные методы (как физико-химические, так и иммунохимические [5-9]). Несмотря на то, что “золотым стандартом” признан метод высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), наибольшее практическое распространение нашел иммунологический метод флуоресцентной поляризации (ПФИА), требующий использования специального оборудования, разработанного производителем тест-системы (“Abbott”, США), а также методы радиоиммунологического анализа (РИА). В последние годы активно развиваются методы ВЭЖХ в tandem с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), позволяющие определять одновременно не только содержание ЦсА в крови, но и других иммуносупрессантов [10, 11]. Все существующие в настоящее время методы определения концентрации ЦсА имеют те или иные недостатки (длительность процедуры анализа, высокая стоимость оборудования, работа с радиоизотопной меткой и т.д.). Кроме того, высокая стоимость импортных тест-систем (300-500 Е), предлагаемых в настоящее время на российском рынке, диктует необходимость создания более доступных отечественных аналогов.

В качестве альтернативы для определения концентрации ЦсА в образцах крови можно предложить твердофазный иммуноферментный анализ, хорошо зарекомендовавший себя в клинической практике благодаря относительной простоте, надежности, чувствительности, достаточно низкой стоимости оборудования, не требующего высокой квалификации персонала.

Цель данной работы состояла в разработке метода иммуноферментного твердофазного анализа для определения концентрации ЦсА в цельной крови пациентов и в сравнении получаемых результатов с другими существующими методами.

МЕТОДИКА. Конъюгат циклоспорина С (ЦсС) с бычьим сывороточным альбумином (ЦсС-БСА) был получен согласно методике, описанной в работе [12].

Моноклональные антитела к ЦсА (МоАт) были любезно предоставлены Российским научным центром молекулярной диагностики и лечения (Россия). Перекрестная реактивность МоАт к метаболитам ЦсА не превышала 10%. Лиофильное высушивание раствора МоАт к ЦсА в воде с добавлением 1% D(+)-трегалозы проводили на лиофильной установке “Super-modulo 12” (“Edwards”, Великобритания), как описано ранее [13].

В работе использовали следующие буферные растворы: 0,1 М Na-карбонатный, pH 9,5 (КБ); 0,1 М Трис-НСl, pH 8,0, содержащий 0,15 М NaCl и 0,04% Твин-20 (Трис-Т).

Калибровочные пробы, содержащие известные количества ЦсА, готовили в Трис-Т буферном растворе с добавлением 20% этанола или в сыворотке крови, не содержащей ЦсА, из исходного раствора ЦсА в этаноле (5 мг/мл).

Образцы цельной крови пациентов, содержащие ЦсА, были предоставлены Всероссийским научным центром хирургии РАМН.

Подготовка калибровочных проб и образцов крови к анализу. Образцы крови пациентов и калибровочные пробы, приготовленные на сыворотке крови, выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. По 50 мкл калибровочных проб или образцов крови помещали в микроцентрифужные пробирки и добавляли по 150 мкл метилового спирта в каждую пробирку, тщательно перемешивали 2-3 раза в течение 10 минут, затем центрифугировали (10 мин, 12000 g, 20-25°C). К 275 мкл трис-Т буфера добавляли 100 мкл супернатанта, перемешивали. Полученные растворы использовали для анализа.

Проведение ИФА циклоспорина А. Полистироловые планшеты ("Greiner", Австрия) были покрыты конъюгатом ЦсС-БСА в выбранной концентрации (150 мкл/лунка) в КБ в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали Трис-Т буферным раствором (4×200 мкл/лунка), вносили раствор БСА (5 мг/мл в КБ, 150 мкл/лунка) и инкубировали 1 ч при 37°C. Далее планшеты промывали Трис-Т буферным раствором (4×200 мкл/лунка), высушивали и хранили при 4°C.

В лунки планшета с сорбированным антигеном вносили по 50 мкл экстрактов калибровочных проб ЦсА или анализируемых образцов и по 50 мкл раствора МоАт в выбранной концентрации в Трис-Т. После инкубации (1 ч, 4°C) лунки промывали Трис-Т буферным раствором (3×200 мкл). Далее во все лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата антител овцы против IgG мыши с пероксидазой из корня хрена (Ат2-ПХ) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего промывали планшет, как описано ранее. Затем во все лунки добавляли по 100 мкл субстратного раствора, содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и пероксид водорода (ЗАО "НВО Иммунотех", Россия). Через 10-15 мин реакцию останавливали, внося в лунки планшета по 100 мкл 0,5 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность при 450 нм. Измерение оптической плотности продукта ферментативной реакции проводили на многоканальном спектрофотометре для 96 – луночных планшетов ("Anthos 2020", Австрия).

Чувствительность метода рассчитывали как среднее значение оптической плотности раствора, не содержащего ЦсА, минус 2 стандартных отклонения (n=20). Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2000. В работе представлены результаты экспериментов с достоверностью $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для определения концентрации ЦсА в цельной крови нами была выбрана непрямая схема конкурентного твёрдофазного ИФА. Метод основан на конкуренции циклоспорина А из измеряемой пробы и циклоспорина, иммобилизованного в составе конъюгата на поверхности лунок полистиролового планшета, за центры связывания специфичных к ЦсА моноклональных антител. Моноклональные антитела связываются как с циклоспорином, находящимся в растворе, так и с иммобилизованным на стенках полистиролового планшета. Количество антител, прореагировавших с иммобилизованным на планшете циклоспорином, выявляют с помощью поликлональных антител к IgG мыши, меченных пероксидазой хрена. Количество образовавшегося комплекса определяют с помощью реакции окисления хромогенного субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) пероксидом водорода. Интенсивность окраски продуктов ферментативной реакции обратно пропорциональна концентрации ЦсА, содержащегося в анализируемом образце.

На первом этапе разработки метода было необходимо выбрать оптимальные для анализа концентрации основных иммунореагентов. Критерием отбора служила (при условии минимального расходования реагентов) максимальная разница оптической плотности калибровочных проб 0 и 1400 нг/мл (не менее 0,7 опт. ед.), причем оптическая плотность для пробы 0 нг/мл должна была находиться в интервале 1-1,5 единиц оптической плотности. На рисунке 1 показано влияние концентраций иммобилизованного на твёрдой фазе конъюгата ЦсС-БСА (от 0,25 до 0,75 мкг/мл) и моноклональных антител к ЦсА в реакционной смеси (от 0,25 до 1,0 мкг/мл) на форму градуировочного графика. Кривая, характеризующаяся наибольшей чувствительностью, соответствует минимальным концентрациям иммунореагентов (рис. 1, кривая 5), но в данном случае максимальный сигнал оптической плотности был менее 1. Поэтому в качестве оптимальных были выбраны следующие концентрации: конъюгат ЦсС-БСА - 0,5 мкг/мл, МоАт - 0,5 мкг/мл, разведение конъюгата Ат2-ПХ - 1:6000 (рис. 1, кривая 4), как обеспечивающие хорошую чувствительность анализа и позволяющие получать аналитический сигнал порядка 1,5 оптических единиц.

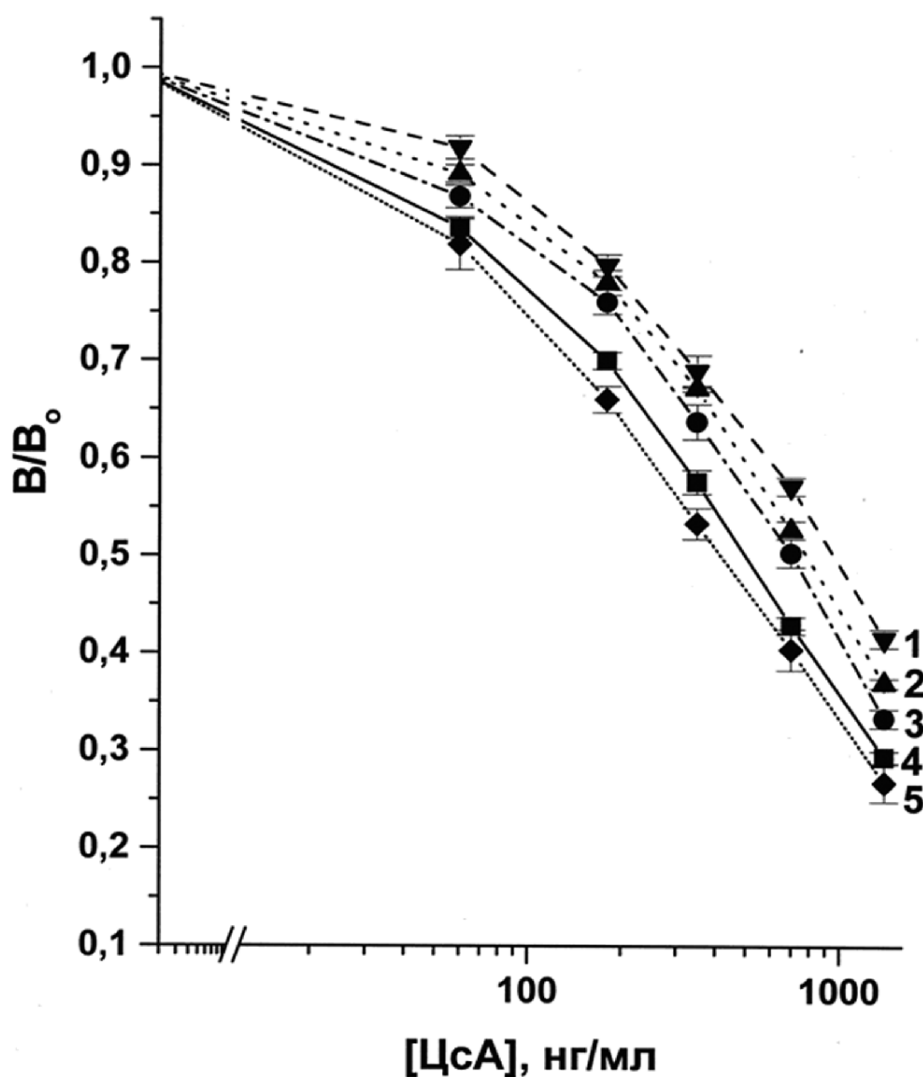


Рисунок 1.

Градуировочные графики определения ЦсА для стандартных растворов, приготовленных в сыворотке крови.

Концентрации конъюгата ЦсС-БСА (МоАт), мкг/мл: 1 - 0,75 (1,0); 2 - 0,5 (1,0); 3 - 0,75 (0,5); 4 - 0,5 (0,5); 5 - 0,25 (0,25); разведение конъюгата Ат2-ПХ во всех случаях 1:6000.

По оси ординат отношение B/B_0 , где B - оптическая плотность продукта ферментативной реакции в растворе ЦсА стандартной концентрации, B_0 - оптическая плотность в растворе с концентрацией ЦсА 0 нг/мл.

Одной из проблем при разработке метода определения ЦсА является приготовление стабильных стандартных растворов или калибровочных проб. Определение ЦсА рекомендуется проводить в цельной крови, поскольку от 50 до 70% циклоспорина А, находящегося в крови, связано с клетками. Из литературы известно, что порядка 70% всего введенного человеку ЦсА связывается с эритроцитами, 5-20% связано с лейкоцитами и около 20% (5-32%) лекарства находится в плазме, где от 70 до 90% циклоспорина А связано с белками плазмы, а остальной находится в несвязанном виде [4]. Отношение связанный/свободный ЦсА в плазме сильно зависит от температуры (от 73% связанного ЦсА при +4°C до 98% при +37°C). В связи с этим в протокол проведения анализа, как правило, включена стадия экстракции ЦсА из образцов крови органическими растворителями.

В качестве матрикса для приготовления калибровочных проб могут быть использованы: буферный раствор, сыворотка крови и цельная кровь человека. Приготовление калибровочных проб на основе цельной крови человека позволяет получить наиболее эффективные калибраторы, дающие воспроизводимые результаты. Однако при проведении анализа в этом случае дополнительно к набору реагентов клиническая лаборатория должна располагать пулом цельной крови человека, свободной от ЦсА, и врач-лаборант должен приготовить калибраторы непосредственно перед проведением анализа путем добавления аликвот раствора ЦсА в органическом растворителе в общую кровь человека, что может привести к существенным погрешностям.

В связи с этим для приготовления калибровочных проб мы использовали Трис-Т буферный раствор, содержащий 20% этилового спирта, и сыворотку крови, не содержащую ЦсА. Экспериментально было показано, что из крови экстрагируется приблизительно 1/10- 1/15 часть всего содержащегося в крови антибиотика, следовательно, истинное содержание ЦсА в каждом из калибраторов, приготовленных в буферном растворе, в 10-15 раз ниже, чем указано. Недостатком этого способа получения стандартов является исключение стадии экстракции ЦсА для самих калибраторов. Это означает, что небольшие изменения в количестве экстрагированного антибиотика, которые могут быть следствием изменения температуры, режима центрифугирования и т.д., могут быть неучтены. Кроме того, калибровочные пробы в буферном растворе очень нестабильны, концентрация ЦсА в них при хранении в течение 3 месяцев при 4°C изменялась более чем на 20%.

Для того чтобы исключить этот недостаток можно использовать в качестве матрикса при приготовлении стандартных растворов сыворотку крови человека. Нами была приготовлена опытная серия тест-системы для количественного определения ЦсА использованием калибровочных проб на основе сыворотки крови (на базе "НВО Иммунотех"). Эти стандарты, также как и образцы крови, при проведении анализа проходили стадию экстракции антибиотика. Стандартные растворы ЦсА, приготовленные в сыворотке крови, показали хорошую стабильность при хранении в течение 9 месяцев при 4°C. Концентрация ЦсА в них менялась незначительно (не более 10%) и на результаты анализа существенного влияния это не оказывало.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была разработана тест-система для определения ЦсА в крови методом ИФА. Чувствительность метода составила 25 нг/мл, линейность метода в диапазоне концентраций 60-1400 нг/мл составляла от 94% до 105% (таблица). Важной характеристикой тест-системы является специфичность анализа, использование моноклональных антител в данном методе обеспечивает высокую специфичность анализа, возможность исключения перекрестных реакций с близкими по структуре химическими соединениями и метаболитами ЦсА. Разработанный метод характеризуется хорошей точностью и воспроизводимостью результатов анализа. Коэффициенты вариации для проб, содержащих 70, 200 и 550 нг/мл ЦсА, составили 6,7, 5,7; и 3,4% в течение одного дня (n=10) и 7,5, 7,6 и 6,9% между днями (n=3) соответственно. Была изучена стабильность разработанной иммуноферментной тест-системы и показано, что все компоненты, входящие в её состав, стабильны в течение 9 месяцев при хранении при 4°C (данные не приведены).

Таблица. Тест на линейность (n=10).

[ЦсА], нг/мл	Разведение, n раз	[ЦсА] (C±σ), нг/мл		Линейность, %
		рассчитанная	найденная	
180	3	60	63±4,4	105
1400	8	175	164±10,6	94
1400	4	350	343±21,3	98
1400	2	700	671±36,2	96

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЦИКЛОСПОРИНА А В КРОВИ

Для определения надежности разработанного метода было проведено определение ЦсА в образцах крови пациентов, получающих лечение циклоспорином А после пересадки печени и почек. Полученные данные сравнивали с результатами, полученными при помощи методов, широко используемых в настоящее время в клинической практике, - методом поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа (TDx, "Abbott", США) и методом радиоиммуноанализа (Cyclosporin direct RIA KIT, "Immunotech", Чехия). Всего для проведения испытаний (на базе РНЦХ РАМН) было предоставлено 170 образцов крови. Сравнение результатов определения ЦсА, полученных методом ИФА, показало хорошую сходимость данных как с методом ПФИА (n=117), так и с методом РИА (n=53). Значения коэффициента корреляции Пирсона (R) составили 0,983 (рис. 2) и 0,965 (рис. 3), соответственно. Это подтверждает достоверность измерений, проводимых с помощью предложенного метода ИФА

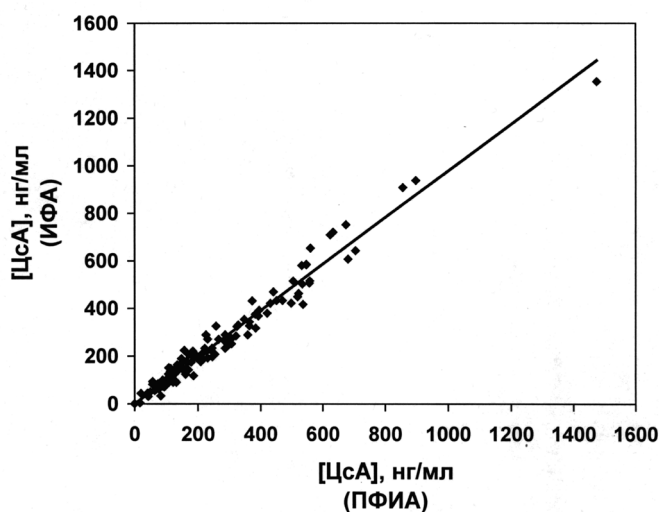


Рисунок 2.

Корреляция данных, полученных методом твердофазного иммуноанализа (ИФА) циклоспорино А в цельной крови, с данными поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА).

Уравнение аппроксимирующей прямой - $y = 0,978x$; $R = 0,983$ (n=117).

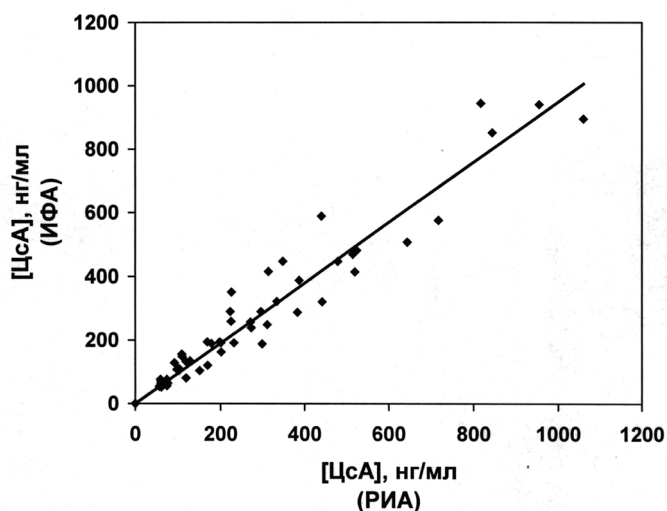


Рисунок 3.

Корреляция данных, полученных методом твердофазного иммуноанализа (ИФА) циклоспорино А в цельной крови, с данными радиоиммуноанализа (РИА).

Уравнение аппроксимирующей прямой - $y = 0,948x$; $R = 0,965$ (n=53).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Разработанный метод твёрдофазного иммуноферментного анализа для определения циклоспорина А в цельной крови характеризуется удовлетворительной чувствительностью (≥ 25 нг/мл), сравнимой с существующими аналогами, широким диапазоном определяемых концентраций (25-1400 нг/мл), хорошей воспроизводимостью результатов анализа (коэффициент вариации не превышает 8%). Разработанная тест-система стабильна в течение длительного хранения. Хорошая сходимость результатов определения ЦсА разработанным методом с данными, полученными для тех же образцов крови другими методами, свидетельствует о том, что данный метод может быть потенциально использован в клинической и лабораторной практике наряду с другими традиционными аналитическими методами. Стоимость разработанной тест-системы, рассчитанной на определение 41 исследуемого образца, значительно ниже (в 3-5 раз) предлагаемых на данный момент импортных аналогов. Кроме того для проведения анализов не требуется дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borel J.F. (1986) Progress in Allergy: Cyclosporin, **38**, 9-18.
2. Keown P.A., Primmett D.R. (1998) Transplant. Proc., **30**, 1712-1715.
3. Whiting P.H., Thomson A.W., Blair J.T., Simpson J.G. (1982) Br. J. Exp. Path., **63**, 88-94.
4. Quesniaux V.F.J. (1989) Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune), III. Immunochemistry and Monitoring. The Amer. Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, **41**, 249-258.
5. Bardelmeijer H.A., Ouwehand M., Beijen J.H., Schellens J.H.M., van Tellingen O. (2001) J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **763**, 201-206.
6. Zhou L., Tan D., Theng J., Lim L., Liu Y.P., Lam K.W. (2001) J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **754**, 201-207.
7. Gublis B., van der Heijen J., van As H., Thiry Ph. (1997) J. Pharmaceut. Biomed. Anal., **15**, 957-963.
8. Schutz E., Svinarov D., Shipkova M., Niedmann P.D., Armstrong V.W., Wieland E., Oellerich M. (1998) Clin. Chem., **44**, 2158-2164.
9. Donatsch P., Abisch E., Homberger M., Traber R., Trapp M., Voges R. (1981) J. Immunoas., **2**, 19-32.
10. Yang Z., Wang S. (2008) J. Immunol. Methods, **336**, 98-103.
11. Seger C., Tentschert K., Stöggel W., Griesmacher A., Ramsay S.L. (2009) Nat. Protoc., **4**, 526-534.
12. Kiselev M.V., Gladilin A.K., Melik-Nubarov N.S., Sveshnikov P.G., Miethе P., Levashov A.V. (1999) Anal. Biochem., **269**, 393-398.
13. Бозуи С.С., Булычева Ю.А., Гаврилова Е.М., Егоров А.М. (2002) Вестн. Моск. Ун-та, серия 2, Химия, **43** (6), 392-395.

Поступила: 21. 09. 2009.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETERMINATION
OF CYCLOSPORIN A IN WHOLE BLOOD

I.P. Andreeva^{1,2}, N.T. Vorobyeva³, L.I. Vinnitsky³, S.S. Bogush¹, E.M. Gavrilova¹, A.M. Egorov^{1,2}

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty, Department of Chemical Enzymology,
Leninskiye Gory, 1, bld. 11, GSP-2, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495) 9393492; fax: (495) 9392742;
e-mail: imtek@newmail.ru

²ZAO "NVO Immunotek", Moscow

³National Research Centre of Surgery RAMS,
Laboratory of Immunology and Regulatory Mechanisms, Moscow

A test-system based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of cyclosporin A (CSA) in human whole blood has been developed. The detection limit of the method was 25 ng/ml, the linearity of the method in the concentration range 60-1400 ng/ml varied from 94 to 105%, the variation coefficient did not exceed 8%. The novel method exhibited good correlation with radio-immunoassay and polarization fluoroimmunoassay methods; the linear regression coefficients were 0.965 and 0.983, respectively. The developed test system is stable for at least 9 months when stored at 4°C and can be used in clinical practice.

Key words: cyclosporin A, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).