

УДК 57.083.3, 577.18

МОДЕЛЬНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИКЛОСПОРИНА А В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

С. С. Богуш, Ю. А. Бульчева, Е. М. Гаврилова, А. М. Егоров*

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: boss@enzyme.chem.msu.ru)

Предложен модельный метод твердофазного иммуноферментного анализа циклоспоринона А в цельной крови человека. Изучено стабилизирующее влияние добавок трегалозы и циклодекстрина на сохранение активности моноклональных антител после лиофильного высушивания. Определены оптимальные условия проведения анализа. Показана хорошая корреляция для реальных образцов крови пациентов с методом радиоиммуноанализа ($r = 0,94$ для 24 образцов); предел обнаружения метода составил 25 нг/мл.

Циклоспорин А (ЦсА) является природным ундекапептидом, продуктом метаболизма грибов *Trichoderma polysporum*, обладающим выраженными иммунодепрессивными свойствами [1]. Он селективно подавляет активацию Т-клеток, блокируя транскрипцию мРНК лимфокинов, таких как интерлейкин-2. Благодаря этим свойствам ЦсА стал основным средством профилактики отторжения трансплантата при пересадке почек, пече-

ни, сердца, легких и костного мозга, а также для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний [2–4]. Клинические испытания показали, что препарат (особенно его метаболиты) обладает вариабельной фармакокинетикой, довольно узким терапевтическим диапазоном и нефротоксичностью [5]. В связи с этим возникла необходимость создания быстрых и точных методов определения концентрации ЦсА в крови пациентов. Кроме того,

*Государственный научный центр по антибиотикам, Москва, Россия; тел.: 111-42-38).

немаловажными факторами при частом проведении анализа являются простота метода, надежность, воспроизводимость и низкая стоимость. В настоящее время существуют разные методы (как физико-химические, так и иммунохимические [6–10]) для определения концентрации ЦсА. Все существующие в настоящее время методы определения концентрации ЦсА имеют те или иные недостатки (длительность процедуры анализа, высокая стоимость оборудования и т.д.). В качестве альтернативы этим методам 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.

Правильная и надежная работа тест-системы во многом обеспечивается стабильностью всех компонентов набора в течение всего срока годности. Для повышения стабильности иммунореагентов часто применяют консерванты, различные добавки, стабилизирующие структуру биомолекул, а также ингибиторы действия протеолитических ферментов и бактериостатические агенты, предотвращающие размножение микроорганизмов [11–12]. Одним из методов стабилизации биопрепаратов является лиофильное высушивание, условия проведения которого должны быть подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимально возможное сохранение свойств нативного препарата.

Цель данной работы состояла в разработке модельного метода иммуноферментного твердофазного анализа ЦсА в цельной крови пациентов, а также в изучении стабильности реагентов тест-системы в течение всего срока годности.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие препараты: полистироловые 96-луночные стрипованные планшеты для иммуноанализа (“*Nunc*”, США); циклоспорины А и С (ФГУП ГНЦА, Россия); Твин 20 (“*Serva*”, Германия); трегалоза, 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин (ГПБЦД) (“*ICN Pharmaceuticals*”, США); бычий сывороточный альбумин (БСА), трис-гидроксиэтилметан (Трис) (“*Sigma*”, США); конъюгат овечьих антител против IgG мыши с пероксидазой из корня хрена (Ат2-ПХ); стабилизирующий раствор для конъюгата овечьих антител против IgG мыши с пероксидазой из корня хрена (ЗАО “*НВО Иммунотех*”, Россия); готовый субстратный раствор, содержащий N,N,N',N'-тетраметилбензидин и перекись водорода (“*КЕМ&ТЕС*”, Дания); соли, основания, кислоты и растворители были марки “ч.д.а.” и “о.с.ч.” (“*Реахим*”, Россия). Моноклональные антитела к ЦсА (МоАт) были любезно предоставлены П.Г. Свешниковым (Российский научный центр молекулярной диагностики, Россия). Образцы цельной крови пациентов, содержащие ЦсА, были предоставлены

Всероссийским научным центром хирургии РАМН. Конъюгат ЦсС – бычий сывороточный альбумин (ЦсС–БСА) был получен Н.С. Мелик-Нубаровым согласно методике, описанной в работе [13]. Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре (ANTHOS, США).

Приготовление реагентов. Лиофильное высушивание раствора моноклональных антител к ЦсА в воде в различной концентрации с добавлением трегалозы или ГПБЦД проводили на лиофильной установке “*Supermodulo 12*” (“*Edwards*”, Англия), полученные образцы хранили при 4°. Рабочий раствор МоАт получали прибавлением к лиофильно высушенному препарату 5 мл 0,5 М Трис-НСl буферного раствора (рН 8,0) с добавлением 1,5 М хлорида натрия и 0,2% Твин 20 (промывочный буфер). Калибровочные пробы, содержащие ЦсА в концентрации 1200; 600; 300; 150; 75; 37,5; 0 нг/мл, готовили в промывочном буфере с добавлением 20%-го этанола и системы сывороточных белков крови человека (ЗАО “*НПП Иммунотех*”, Россия) из концентрированного раствора ЦсА в этаноле (5 мг/мл). Рабочий раствор конъюгата Ат2-ПХ готовили разведением концентрированного раствора в стабилизаторе (12 мл промывочного буфера). Экстракцию образцов цельной крови проводили по методике, описанной в работе [13].

Проведение анализа. В лунки полистиролового планшета вносили раствор конъюгата ЦсС–БСА в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,5), инкубировали в течение 12 ч при 4°, промывали 3 раза 0,5 М Трис-НСl буферным раствором (рН 8,0) с добавлением 1,5 М хлорида натрия и 0,2%-го Твин 20 (промывочный буфер), вносили раствор бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,5), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и промывали планшет 3 раза промывочным буфером (по 150 мкл в лунку). Затем в лунки планшета вносили (в дублях) калибровочные пробы и экстракты образцов цельной крови (по 50 мкл в лунку), а после – рабочий раствор моноклональных антител (по 50 мкл в лунку). Полученную в лунках смесь инкубировали при 4° в течение 1 ч, затем промывали планшет, как было описано ранее. Далее во все лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата Ат-ПХ и инкубировали в течение 30 мин при 37°, после чего промывали планшет, как описано ранее. Во все лунки вносили субстратную смесь (по 50 мкл в лунку), инкубировали в течение 10–15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте и останавливали реакцию 0,25 М серной кислотой (по 50 мкл в лунку). Измерение оптической плотности проводили при 450 нм.

Результаты и обсуждение

Подбор оптимальных концентраций иммунореагентов. Для оптимизации процедуры анализа был проведен подбор концентрации основных иммунореагентов. Были

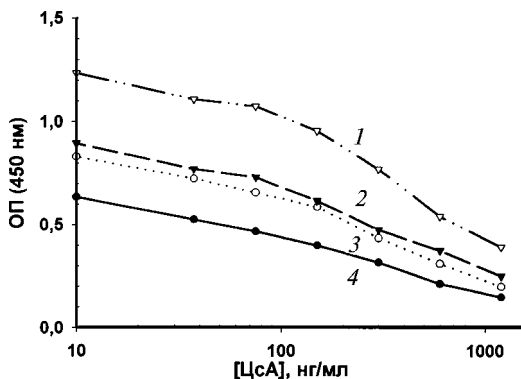


Рис. 1. Влияние концентрации конъюгата ЦсС-БСА (МоАт), мкг/мл, на форму градуировочного графика: 1 – 0,25 (0,25); 2 – 0,25 (0,5); 3 – 0,5 (0,25); 4 – 0,5 (0,5); разведение конъюгата Ат2-ПХ во всех случаях 1:8000

протестированы следующие концентрации реагентов: конъюгат ЦсС-БСА – 1, 0,75, 0,5, 0,25 мкг/мл; моноклональные антитела – 1, 0,5, 0,25, 0,125 мкг/мл; конъюгат Ат2-ПХ – разведение 1:5000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:15000. Критерием отбора служила при условии минимального расходования реагентов максимальная разница оптической плотности калибровочных проб 0 и 1200 нг/мл, причем оптическая плотность для пробы 0 нг/мл не должна была превышать 1,5 единицы оптической плотности. На рис. 1 показано влияние концентрации конъюгата ЦсС-БСА и МоАт на форму градуировочного графика. В результате из всех комбинаций иммунореагентов была выбрана оптимальная: конъюгат ЦсС-БСА – 0,5 мкг/мл, МоАт – 0,5 мкг/мл, разведение конъюгата Ат2-ПХ – 1:8000. Все дальнейшие эксперименты проводили именно с этой комбинацией.

Изучение влияния добавок на стабильность моноклональных антител после лиофильного высушивания. В качестве криопротекторов для биопрепаратов моноклональных антител при лиофильном высушивании можно использовать различные поли- и олигосахариды. Было проведено изучение влияния добавок ГПБЦД и трегалозы при лиофильном высушивании биопрепаратов МоАт в сравнении с нативными антителами, за которые принимали свежеприготовленный раствор МоАт такой же концентрации в промывочном буфере. Для этого на полистироловом планшете растворяли, начиная с концентрации 1 мкг/мл, рабочие растворы как нативных, так и лиофилизированных МоАт по 150 мкл в лунку в присутствии стабилизаторов в концентрации 1, 0,75 и 0,5%. Планшет инкубировали в течение 12 ч при 4°, промывали промывочным буфером, как указано ранее, и наносили в лунки планшета по 100 мкл рабочий раствор конъюгата Ат2-ПХ в разведении 1:8000 и инкубировали в течение 1 ч при 37°. После промывки определяли в лунках планшета оптическую плотность, как указано ранее, строили график зависимости (рис. 2, 3) и определяли сохранение активности как отношение оптической плотности

высушенных и нативных антител. Были получены следующие результаты при концентрации МоАт 0,5 мкг/мл для 1, 0, 75 и 0,5% стабилизатора: ГПБЦД – 80,3, 77,0 и 78,7%; трегалоза – 85,8, 73,5 и 66,3% соответственно. Аналогичные значения были получены и после хранения препаратов лиофилизированных антител в течение 6 мес при 4°. Из полученных данных видно, что как ГПБЦД, так и трегалоза могут быть успешно использованы для стабилизации лиофилизированных препаратов МоАт в течение всего предполагаемого срока хранения набора иммунореагентов.

Определение предела обнаружения. Предел обнаружения является важной аналитической характеристикой любого метода анализа. Для нахождения предела обнаружения было проведено определение оптической плотности пробы 0 нг/мл в 10 повторах, построен градуировочный график и рассчитано среднее квадратичное

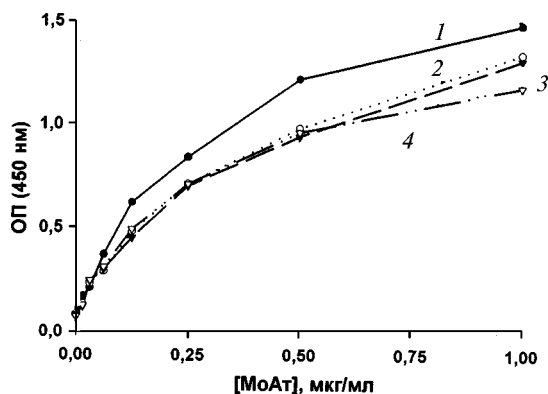


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации моноклональных антител, лиофильно высушенных в присутствии гидроксипропил-β-циклодекстрина (ГПБЦД): 1 – нативные МоАт; 2 – МоАт, высушенные из 1%-го раствора ГПБЦД; 3 – МоАт, высушенные из 0,75%-го раствора ГПБЦД; 4 – МоАт, высушенные из 0,5 % раствора ГПБЦД

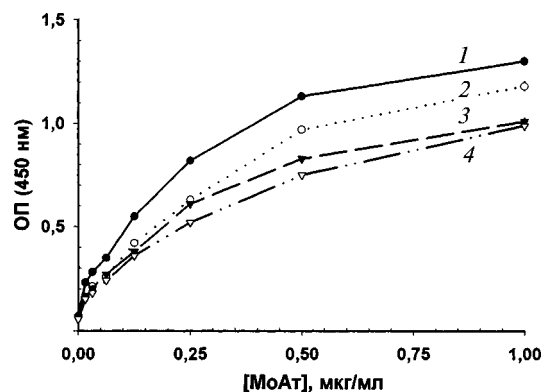


Рис. 3. Зависимость оптической плотности от концентрации моноклональных антител, лиофильно высушенных в присутствии трегалозы: 1 – нативные МоАт; 2 – МоАт, высушенные из 1%-го раствора трегалозы; 3 – МоАт, высушенные из 0,75%-го раствора трегалозы; 4 – МоАт, высушенные из 0,5%-го раствора трегалозы

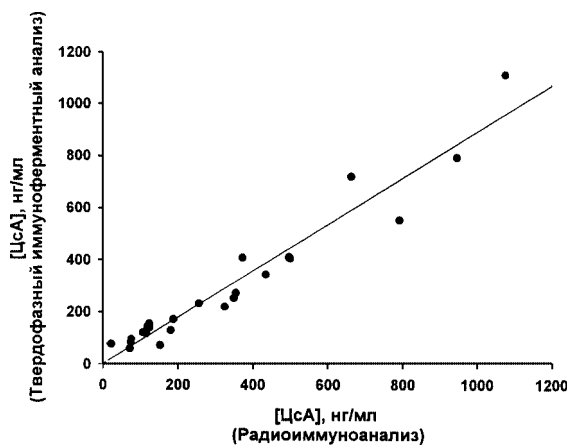


Рис. 4. Корреляция данных, полученных методом твердофазного иммуноанализа ЦсА в цельной крови, с данными радиоиммунологического метода

отклонение (σ) в единицах оптической плотности по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\text{ОП}_i - \overline{\text{ОП}}_0)^2}{n-1}},$$

где $\overline{\text{ОП}}_0$ – среднее арифметическое значение оптической плотности для калибровочной пробы 0 нг/мл в единицах оптической плотности; ОП_i – значение оптической плотности каждого измерения калибровочной про-

бы 0 нг/мл в единицах оптической плотности; n – число измерений.

На оси ординат градуировочного графика было отложено значение (2σ) и по значению на оси ординат определен предел обнаружения, который составил 25 нг/мл.

Корреляция с радиоиммунным методом анализа. Одним из методов проверки достоверности полученных в результате анализа данных является сравнение их с данными для тех же объектов, полученных другим методом. В качестве метода сравнения был выбран широко применяемый в клинической практике радиоиммунный метод анализа ЦсА в цельной крови (набор *Cyclo-Trac*, фирма DRG, США). Для 24 образцов крови пациентов, которые после пересадки печени и почек применяли препараты ЦсА для предотвращения отторжения трансплантата, были определены значения концентраций ЦсА этими двумя методами (данные для радиоиммуноанализа представлены Всероссийским научным центром хирургии, Москва), построен корреляционный график (рис. 4) и определен коэффициент корреляции, который оказался равным 0,94. Это говорит о хорошей сходимости результатов обоих методов и подтверждает достоверность измерений с помощью предложенного метода.

Таким образом, разработанный модельный метод твердофазного иммуноферментного анализа циклоспорина А в цельной крови обладает потенциалом для использования в клинической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borel J.F. // Progress in Allergy: Ciclosporin 1986. **38**. P. 9.
2. Homan W.P., Fabre J.W., French M.E., Millard P.R., Morris P.J. // Lancet. 1979. **1**. P. 421.
3. Shaheen F.A.M., Sheikh I.A., Al-Khader A. // Transplant. Proc. 1998. **7**. P. 3549.
4. Hinrichs D.J., Wegmann K.W., Peters B.A. // Cell Immunol. 1983. **77**. P. 202.
5. Whiting P.H., Thomson A.W., Blair J.T., Simpson J.G. // Br. J. Exp. Path. 1982. **63**. P. 88.
6. Bardelmeijer H.A., Ouwehand M., Beijen J.H., Schellens J.H.M., Tellingten O. van // J. Chromatogr. B. 2001. **763**. P. 201.
7. Zhou L., Tan D., Theng J. et al. // J. Chromatogr. B. 2001. **754**. P. 201.
8. Gublis B., Heijden J. van der, As H. van, Thiry Ph. // J. Pharmaceut. Biomed. An. 1997. **15**. P. 957.
9. Schetz E. et al. // Clin. Chem. 1998. **44**. P. 2158.
10. Donatsch P., Abisch E., Homberger M et al. // J. Immunoas. 1981. **2**. P. 19.
11. Davidson P., Sun W.Q. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. 1425. **1**. P. 235.
12. Mazzobre M.F., Buera M.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. **1473**. P. 337.
13. Kiselev M.V., Gladilin A.K., Melik-Nubarov N.S. et al. // Anal. Biochem. 1999. **269**. P. 393.

Поступила в редакцию 25.10.02