

**ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ****ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИЛИАРНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА В СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА***Т.А. Дружкова<sup>1\*</sup>, А.А. Шпак<sup>2</sup>, К.И. Козлова<sup>2</sup>, А.А. Яковлев<sup>1,3</sup>, А.Б. Гехт<sup>1</sup>, Н.В. Гуляева<sup>1,3</sup>*<sup>1</sup>“Научно-практический психоневрологический центр Департамента здравоохранения г. Москвы”, 115419, Москва, ул. Донская 43; \*эл. почта: [druzhkova.tatiana@mail.ru](mailto:druzhkova.tatiana@mail.ru)<sup>2</sup>МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России, 127486, Москва, Бескудниковский бульвар 59а<sup>3</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бултерова 5А

Определение цилиарного нейротрофического фактора – ciliary neurotrophic factor (CNTF) в слёзной жидкости (СЖ) человека рутинными лабораторными методами затруднено из-за его низкой концентрации в структурах глаза и недостаточного количества материала для анализа. Были подобраны условия для определения CNTF в СЖ твердофазным методом иммуноферментного анализа (ИФА) на основе набора Human CNTF Quantikine ELISA Kit (“R&D Systems”, США) с использованием автоматического иммуноферментного анализатора ChemWell 2910 Combi (“Awareness Technology Inc.”, США). Предварительная кислотная обработка проб СЖ позволила вдвое повысить концентрацию CNTF. Полностью автоматизированная система проведения анализа и выбор разбавителя с низкой оптической плотностью бланка (0.011) обеспечили линейную зависимость калибровочного графика от 0 до 250 пг/мл с возможностью его использования для расчета концентрации CNTF в области низких значений. Рабочие характеристики оптимизированной тест-системы ИФА (линейность метода, предел обнаружения, воспроизводимость, интерференция матрицы) в указанном диапазоне концентраций соответствовали критериям приемлемости для используемого метода определения. Разведение образцов СЖ в четыре раза, совмещённое с кислотной обработкой проб, оказалось оптимальным для получения стабильных результатов при проведении анализа. В этом случае концентрация CNTF в пробе составляла в среднем  $10.4 \pm 0.4$  пг/мл с коэффициентом вариации 4.2% и близостью определяемых значений к ожидаемым величинам на уровне 104%.

**Ключевые слова:** цилиарный нейротрофический фактор; слёзная жидкость; иммуноферментный анализ**DOI:** 10.18097/BMCRM00079**ВВЕДЕНИЕ**

Цилиарный нейротрофический фактор головного мозга человека – ciliary neurotrophic factor (CNTF) представляет собой одноцепочечный полипептид из 200 аминокислотных остатков с молекулярным весом 22.7 кДа. Известно, что он обнаруживается преимущественно в шванновских клетках и астроцитах I типа, важен для дифференцировки, питания и защиты развивающихся и повреждённых нейронов и глиальных клеток [1-3].

Ранее было показано, что CNTF выявляется и играет важную роль в метаболизме клеточных структур глаза животных. Сам фактор или его рецептор были обнаружены в наружных сегментах фоторецепторов [4], в ганглиозных клетках [4, 5], во внутренних ядерных слоях сетчатки [6], в глиальных клетках Мюллера [4], в клетках решетчатой пластинки и астроцитах головки зрительного нерва [7, 8].

Повышенное внимание к CNTF в офтальмологии в последние годы отчасти связано с клинической апробацией фирмой “Neurotech” (США) импланта NT-501, способного длительно продуцировать CNTF внутри глаза [9] и обеспечивать терапевтический эффект при некоторых офтальмологических заболеваниях [10, 11].

К сожалению, работ по изучению роли CNTF в метаболизме нервных клеток глаза, выполненных на клиническом материале, очень мало, хотя выявление и количественный анализ CNTF в слёзной и внутриглазной жидкости человека представляются крайне важными для уточнения патогенеза, мониторинга и оценки эффективности лечения многих тяжелых заболеваний органов зрения, в частности, глаукомы. Отчасти это обусловлено методическими трудностями количественного определения CNTF в биологических жидкостях глаза. Немногочисленные исследования в этом направлении проводились на дорогостоящем оборудовании с использованием сложных методик [12], выполнение которых затруднительно в условиях лечебных учреждений.

Целью представленной работы были подбор и оптимизация доступного лабораторного метода количественного определения CNTF в слёзной жидкости (СЖ, LF) человека.

Общеизвестно, что иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет с высокой специфичностью, чувствительностью и точностью определять крайне малые количества вещества в биологическом материале, обладая при этом стабильностью реагентов и простотой использования.

Поэтому была предпринята попытка подобрать условия, при которых коммерческий набор для выявления CNTF в сыворотке, плазме крови человека и супернатантах клеточных культур Human CNTF Quantikine ELISA Kit (“R&D Systems”, США) можно было бы применить к анализу CNTF в СЖ.

Основной проблемой, с которой пришлось столкнуться при попытке определения CNTF в СЖ при помощи указанного набора, оказалось недостаточное для анализа количество СЖ, собранной от каждого человека, особенно при офтальмологических патологиях, сопровождающихся синдромом “сухого глаза”. Вынужденное разбавление СЖ перед анализом значительно снижало и так невысокую концентрацию CNTF в СЖ. При расчёте концентрации по калибровочному графику (диапазон концентраций стандарта CNTF от 31.2 пг/мл до 2000 пг/мл, разбавитель – RD6-3), рекомендованному производителем, практически все результаты измерения попадали в область ниже уровня первого калибратора.

Были поставлены следующие задачи:

- подбор условий преаналитической подготовки проб СЖ, повышающих уровень CNTF при последующем определении;
- определение характеристик калибровочного графика в диапазоне концентраций от 0 до 250 пг/мл и оценка возможности его использования для определения CNTF в области низких значений;
- подбор разбавителя для стандарта CNTF и проб СЖ с более низким интерферирующим фоном по сравнению с RD6-3 и определение оптимальной степени разведения проб СЖ;



• проверка основных параметров оптимизированной тест-системы ИФА на их соответствие критериям приемлемости для используемого метода определения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Пробоподготовка

Забор стимулированной (выработанной слёзной железой) в ответ на механическое раздражение роговицы) СЖ в объёме 120 (70-150) мкл проводили из нижнего конъюнктивального свода пипеточным дозатором у 37 добровольцев без выявленных офтальмологических нарушений (средний возраст 65.7 (55-75) лет) после получения у них информированного согласия на участие в эксперименте. Полученный материал смешивали, разливали по 400 мкл, сразу замораживали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не более трёх месяцев.

Перед проведением анализа пробы СЖ размораживали, доводили до комнатной температуры, центрифугировали при 4000 *g* с использованием лабораторной центрифуги Allegra X-30R (“Beckman Coulter”, США) 10 мин и обрабатывали по методике, предложенной Okragly et al. [13]. Для этого в образцы СЖ с разной степенью разведения добавляли раствор 1 М HCl до pH 2.6 и инкубировали в течение 20 мин при постоянном перемешивании при помощи миксера Intelli Mixer RM-1L (“ELMI”, Эстония), затем нейтрализовали раствором 1 М NaOH до pH 7.4.

### ИФА

Концентрацию CNTF в СЖ определяли твердофазным методом ИФА с использованием набора Human CNTF Quantikine ELISA Kit на автоматическом иммуноферментном/биохимическом анализаторе ChemWell® 2910 Combi (“Awareness Technology Inc.”, США). Указанный прибор обеспечивал автоматизацию всех этапов выполнения анализа с точной системой дозирования (коэффициент вариации менее 1%) и считывания результатов измерений (коэффициент вариации менее 1%).

Для проведения ИФА были использованы:

- микропланшеты с нанесёнными мышиними моноклональными антителами, специфичными к CNTF человека;
- буфер для блокировки неспецифического фона RD1-9;
- поликлональные антитела, специфичные к CNTF, конъюгированные с пероксидазой хрена;
- субстрат, состоящий из равных долей стабилизированного раствора перекиси водорода и стабилизированного раствора тетраметилбензидина;
- раствор 2N серной кислоты для остановки реакции.

Для построения калибровочного графика проводили последовательные разведения стандарта (рекомбинантного человеческого CNTF) в диапазоне концентраций от 3.9 до 250 пг/мл.

Для разведения стандарта и проб СЖ использовали: разбавитель для сывороток RD6-3, разбавитель для клеточных культур RD5P, стерильный фосфатный буфер (PBS, pH 7.4) с добавлением 0.1% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA), PBS (pH 7.4) с добавлением 1% BSA, PBS (pH 7.4) с добавлением 4% BSA, проводя сравнительную оценку параметров тест-системы при разных разбавителях.

Процедура проведения анализа полностью соответствовала инструкции производителя [<https://www.rndsystems.com>].

Оптическая плотность проб измерялась с использованием основного фильтра 450 нм, отсекающего – 630 нм.

### Оценка параметров тест-системы

Для каждого из перечисленных вариантов разбавителей трижды (в дублях) определяли основные параметры

калибровочного графика и графика при разведении проб СЖ, ориентируясь на рекомендации Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), раздел EP-6A [14].

Степень увеличения определяемой концентрации CNTF после кислотной обработки проб СЖ на разных уровнях её разведения оценивали по соотношению результатов измерений предварительно обработанных и не обработанных образцов.

Интерферирующий эффект матрицы оценивали, ориентируясь на рекомендации CLSI, раздел EP14 A2 [15]. В предварительно обработанные кислотой пробы СЖ без разведения и с разведением в 4 раза добавляли известные концентрации рекомбинантного человеческого CNTF (50 пг/мл и 100 пг/мл) с последующим определением концентрации в пробах СЖ без добавления и с добавлением эндогенного CNTF и оценкой восстановления (соотношения измеренной и ожидаемой величин).

В качестве дополнительного контрольного материала использовали контроль первого уровня QC20 P176824 (“R&D Systems”) с установочными значениями от 175 до 285 пг/мл для супернатантов клеточных культур (разбавитель – RD5P) и установочными значениями от 183 до 299 пг/мл для сыворотки крови (разбавитель – RD6-3). Для оценки погрешности результатов измерений на разных уровнях калибровочного графика (от 0 до 250 пг/мл) использовали три степени разведения контроля QC20 P176824 (1:1; 1:10; 1:100).

Оценку погрешности измерений концентрации CNTF проводили в соответствии с рекомендациями CLSI, раздел EP5-A [16]. Внутрисерийную воспроизводимость оценивали, выполняя в одной аналитической серии по 10 повторных измерений контрольных образцов QC20 P176824 с разной степенью разведения и проб сливной СЖ в разведении 1:3 после их кислотной обработки. Межсерийную воспроизводимость оценивали с использованием перечисленных выше контрольных материалов в 10 аналитических сериях, проводя по 4 повторных измерения каждой пробы в каждой аналитической серии.

Предел аналитической чувствительности метода в используемой тест-системе ИФА был определён в соответствии с рекомендациями CLSI, раздел EP17 [17]. Для этого выполнили 50 измерений разбавителя PBS (pH 7.4) с 1% BSA и 50 измерений контроля QC20 P176824 в разведении 1:100.

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA for Windows, ver. 10.0. Результаты представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), указан также коэффициент вариации (CV). Сравнения проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Линейность калибровочных графиков и результатов измерений при разведении СЖ для разных разбавителей проверяли с помощью теста Уалда-Вольфовица.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Сравнительный анализ калибровочных графиков при использовании разных разбавителей

Для оценки возможности расчёта концентрации CNTF в области низких значений при помощи калибровочного графика от 0 до 250 пг/мл представлялось целесообразным подобрать разбавитель для стандарта и образцов сливной СЖ с минимальным интерферирующим фоном. Полученные данные представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, самый низкий интерферирующий фон был отмечен при использовании PBS с 0.1% BSA и PBS с 1% BSA.

**Таблица 1.** Параметры тест-системы ИФА при использовании разных разбавителей

	RD6-3	RD5P	PBS+4% BSA	PBS +1% BSA	PBS+0.1% BSA
Optical density of blank sample, M±SD	0.030±0.001	0.033±0.002	0.027±0.002	0.011±0.0003	0.010±0.0004
Standart sample, CV	3.4	3.7	6.6	3.8	5.0
n	24	24	24	24	24
Control sample, CV	5.3	7.1	4.4	2.5	7.0
n	12	12	12	12	12
LF sample, CV	13.7	8.1	9.6	7.1	5.0
n	24	24	24	24	24
Linear deviation for calibration curve, *p-value	0.3714	1	0.2857	0.1429	0.2857
p-values for comparisons of calibration curve slopes between RD6-3 and the other diluents		0.0001	0.04819	0.000729	0.0001
Linear deviation for LF sample dilution curve, *p-value	0.6667	1	0.6667	1	1

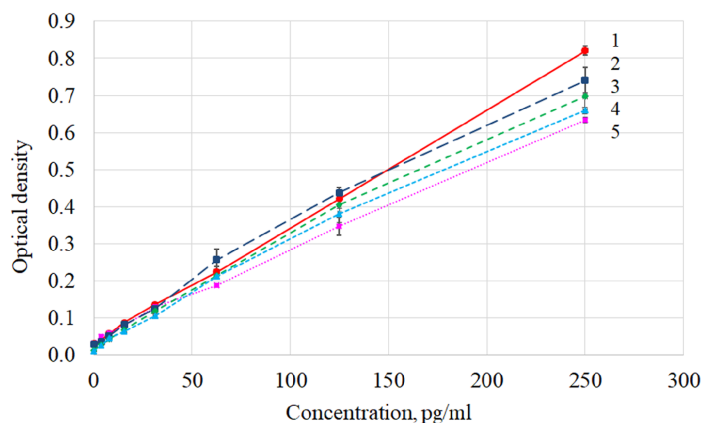
Примечание: \*p - достоверность отклонения от линейности по оценке теста Уалда-Вольфовица.

**Таблица 2.** Концентрация CNTF (пг/мл) в пробах СЖ не подвергнутых и подвергнутых кислотной обработке при разных разведениях

dilution		RD6-3			RD5P			PBS +4% BSA			PBS +1% BSA			PBS +0.1% BSA		
		without acid treatment	after acid treatment	p	without acid treatment	after acid treatment	p	without acid treatment	after acid treatment	p	without acid treatment	after acid treatment	p	without acid treatment	after acid treatment	p
1	M	20.4	36.6	0.0005	18.6	41.8	0.0000	19.2	37.9	0.0001	20.3	39.8	0.0000	18.0	36.2	0.0000
	SD	1.1	2.5		1.2	1.4		1.7	1.2		0.9	1.3		0.6	0.7	
	CV	5.4	6.9		6.3	3.4		8.7	3.2		4.5	3.3		3.4	2.0	
0.5	M	8.4	16.7	0.0004	7.4	18.7	0.0004	12.0	19.8	0.0053	11.7	19.5	0.0023	11.6	17.6	0.0002
	SD	0.5	1.2		0.6	1.7		1.0	2.2		0.9	1.7		0.5	0.7	
	CV	6.0	7.1		8.3	9.1		8.2	11.3		8.0	8.8		4.0	3.7	
0.25	M	3.9	9.9	0.0024	4.6	12.0	0.0004	6.0	11.6	0.0008	5.3	10.4	0.0002	4.6	8.9	0.0009
	SD	0.9	1.3		0.4	1.1		0.4	1.0		0.5	0.4		0.3	0.8	
	CV	22.3	12.7		9.5	8.9		6.0	8.8		9.0	4.2		5.5	9.2	
0.125	M	2.7	4.5	0.0539	3.2	5.8	0.0011	2.3	5.4	0.0013	2.6	5.3	0.0005	2.0	4.1	0.0001
	SD	0.9	0.7		0.4	0.4		0.5	0.4		0.4	0.3		0.2	0.2	
	CV	33.9	15.6		13.2	6.0		23.0	7.7		14.4	4.7		7.5	4.9	

Примечание: n=6 для каждого значения.

Калибровочные графики с использованием всех протестированных разбавителей в диапазоне концентраций от 0 до 250 пг/мл были линейны с высоким коэффициентом корреляции (табл. 1). Чувствительность метода определения при использовании разных разбавителей оценивали по углу наклона калибровочного графика. Достоверно более высокая чувствительность метода определения, выявленная при использовании RD6-3 (табл. 1) была обусловлена значимым различием между значениями калибраторов с большими значениями CNTF (выше 100 пг/мл) (рис. 1). В области низких концентраций (0-50 пг/мл), куда попадали практически все значения CNTF, определяемые в СЖ (табл. 2), достоверного различия в чувствительности метода определения при использовании различных разбавителей не было. Поэтому при выборе разбавителя для последующего анализа более важными представлялись такие характеристики как низкий фон и средние показатели CV измерений стандарта, контрольного



**Рисунок 1.** Калибровочные графики при разведении стандарта CNTF разными разбавителями. 1 - RD6-3, 2 - PBS +4% BSA, 3 - PBS +1% BSA, 4 - PBS +0.1% BSA, 5 - RD5P.

материала и проб СЖ, полученные с его использованием. Оптимальное соотношение указанных параметров имело место при использовании PBS с 1% BSA (табл. 1).

#### Влияние предварительной кислотной обработки проб СЖ на уровень детектируемой концентрации CNTF методом ИФА

Ранее было показано, что кислотная обработка биологического материала повышает степень выявления ряда нейротрофических факторов, в частности, фактора роста нервов, нейротрофина-3, глиального нейротрофического фактора, нейротрофического фактора головного мозга, а также трансформирующего фактора роста при последующем определении их методом ELISA [13, 18, 19]. Точный механизм этого явления не ясен. По мнению ряда авторов это может быть связано с высвобождением биоактивных форм факторов из их проформ. Также вполне возможно, что кислотная обработка биологического материала способствует отщеплению части лигандов от поверхностных рецепторов исследуемых факторов, повышая их доступность к иммунологическому связыванию с антителами при проведении ИФА [13]. Мы попробовали использовать этот опыт для повышения уровня выявляемого количества CNTF при определении его в СЖ. Одновременно с анализом параметров тест-системы ИФА при смещении калибровочного графика в область низких концентраций была предпринята попытка повысить определяемый уровень CNTF предварительной кислотной обработкой проб сливной СЖ без разбавления и при разведении в 2, 4 и 8 раз. Для разведения СЖ использовали пять вариантов разбавителей (рис. 1) с проведением сравнительного анализа полученных результатов. Предварительная кислотная обработка образцов СЖ позволила в среднем вдвое достоверно повысить в них определяемый уровень концентрации CNTF ( $p < 0.005$ ) (табл. 2). При этом не было обнаружено зависимости эффекта кислотной обработки проб СЖ от степени разведения и использованного разбавителя (рис. 2).

#### Линейность результатов измерений концентрации CNTF в пробах СЖ при её разведении

Для оценки линейности графика при разведении проб сливной СЖ использовали её кратные разведения (2, 4, 8 раз). Линейная зависимость графиков с высоким коэффициентом корреляции имела место при использовании всех протестированных разбавителей (табл. 1). При этом угол наклона для графиков разведения проб СЖ разбавителями RD5P (79%-137%), PBS с 4% BSA (96%-125%), PBS с 0.1% BSA (90%-129%), PBS с 1% BSA (98%-115%) не отличался от графика с использованием RD6-3 (табл. 1).

Степень отклонения определяемых значений CNTF, полученных при разведении СЖ, от ожидаемых (значений СЖ без разведения, разделённых на степень

разведения) оценивали по их соотношению, выраженному в процентах. При сопоставлении этих показателей на разных уровнях разведения оказалось, что лучшие показатели близости определяемых значений CNTF в СЖ к ожидаемым величинам имели место при применении PBS с 1% BSA (98%-115%) по сравнению с другими разбавителями: RD6-3 (76%-108%), RD5P (79%-137%), PBS с 4% BSA (96%-125%), PBS с 0.1% BSA (90%-129%).

При сравнении CV результатов измерений проб сливной СЖ на разных уровнях разведения выбранными разбавителями (табл. 2), оказалось, что лучшая комбинация показателей была при разведении СЖ в 4 раза PBS с 1% BSA, совмещённом с её кислотной обработкой (CV=4.2%). Поэтому для последующих серий экспериментов был использован именно этот вариант предварительной подготовки проб СЖ.

#### Оценка влияния матрицы на результаты измерения

Биологическая жидкость, в которой определяют измеряемый аналит и растворы для её разведения могут влиять на результаты измерений в ИФА. Поскольку используемый нами набор Human CNTF Quantikine ELISA Kit был адаптирован на определение CNTF в сыворотке, плазме и в супернатантах клеточных культур, не было изучено сочетанное влияние СЖ и выбранного нами разбавителя (PBS с 1% BSA) на результаты измерений. После добавления 50 пг/мл или 100 пг/мл эндогенного CNTF в пробы неразведённой СЖ, подвергнутой кислотной обработке, полученные результаты измерений были близки к ожидаемым величинам и составили 91% и 96% соответственно. После добавления 50 пг/мл и 100 пг/мл эндогенного CNTF в пробы СЖ после кислотной обработки, разведённой в 4 раза, эти показатели были 96% и 99% соответственно. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии существенных помех со стороны СЖ и разбавителя PBS с 1% BSA на результаты измерений CNTF в используемой тест-системе ИФА.

#### Оценка погрешности измерений

Случайную погрешность результатов измерений оценивали по SD и CV, рассчитывая внутрисерийную и межсерийную воспроизводимость данных, полученных при измерении концентрации CNTF в образцах сливной СЖ после кислотной обработки, разведённой в 4 раза, и контроля QC20 P176824 первого уровня без разведения, а также разведённого в 10 и в 100 раз. Результаты измерений оценивали по калибровочному графику в диапазоне концентраций от 0 до 250 пг/мл. В качестве разбавителя использовали PBS с 1% BSA.

Показатели внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости результатов измерений концентрации CNTF, полученные в установочных сериях контрольных материалов на разных уровнях в диапазоне концентраций от 2.5 пг/мл до 250 пг/мл соответствовали критериям приемлемости для используемого метода определения (табл. 3).

Оценку систематической погрешности результатов измерений (по смещению средних показателей полученных измерений от истинной величины) не проводили, поскольку в исследовании были использованы неаттестованные контрольные материалы (сливная СЖ и контроль QC20 P176824, аттестованный только для сыворотки и супернатантов клеточных культур) [<https://www.mdsystems.com>].

#### Оценка аналитической чувствительности тест-системы

В результате проведённых измерений по схеме, указанной в разделе "Материалы и методы", предел

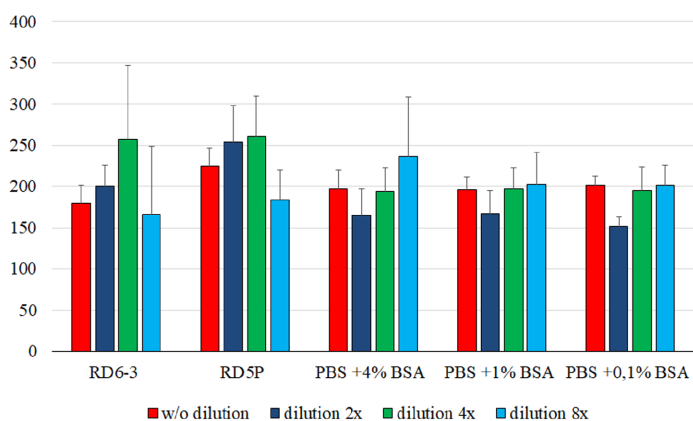


Рисунок 2. Увеличение определяемой концентрации CNTF после кислотной обработки проб СЖ, %.

**Таблица 3.** Воспроизводимость результатов измерений контрольных материалов при проведении ИФА с использованием калибровочного графика от 0 до 250 пг/мл и разбавителя PBS с 1% BSA

sample	Intra-assay precision				Inter-assay precision			
	QC20 P176824	QC20 P176824	QC20 P176824	LF	QC20 P176824	QC20 P176824	QC20 P176824	LF
dilution	1:100	1:10	1	1:3	1:100	1:10	1	1:3
n	10	10	10	10	50	40	40	40
main (pg/ml)	2.6	24.5	245.4	10.2	2.7	25.1	247.7	10.2
standard deviation	0.4	0.9	3.2	0.6	0.4	0.8	6.0	0.5
CV	13.8	3.6	1.3	5.4	15.4	3.4	2.4	5.2

обнаружения бланка (LOB) составил 0.33 пг/мл, предел чувствительности метода определения (LOD) оказался равным 1.01 пг/мл.

Доверительный интервал при заданном доверительном уровне 95% и n=50 составил для бланка – 0.00±0.06 пг/мл, для контрольного материала с низкими значениями CNTF – 2.66±0.11 пг/мл, для первого стандарта CNTF – 4.07±0.14 пг/мл.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показано, что предварительная кислотная обработка проб СЖ достоверно повышает уровень выявления CNTF, определяемого методом ИФА. Были подобраны условия для определения CNTF в СЖ указанным методом на основе набора Human CNTF Quantikine ELISA Kit. Рабочие характеристики полученной тест-системы ИФА (линейность метода, предел обнаружения, воспроизводимость, интерференция матрицы) в указанном ниже диапазоне концентраций калибровочного графика соответствовали критериям приемлемости для используемого метода определения и свидетельствовали о приемлемой точности и стабильности результатов измерений в области низких концентраций CNTF. Предварительное разведение образцов СЖ в 4 раза, совмещённое с их кислотной обработкой, оказалось оптимальным для получения стабильных результатов при проведении анализа.

Таким образом, оптимизированная тест-система ИФА с приведёнными ниже рабочими характеристиками может быть использована для определения CNTF в СЖ человека.

#### Рабочие характеристики полученной тест-системы ИФА

Проба: СЖ после кислотной обработки в разведении 1:3.

Метод определения: твердофазный метод ИФА.

Рабочая область калибровочного графика: 0÷250 пг/мл.

Разбавитель для стандарта CNTF, контроля и проб СЖ: PBS с 1% BSA.

Процедура: согласно инструкции производителя.

Считывание: основной фильтр 450 нм, отсекающий – 630 нм.

Метод расчёта по калибровочному графику: линейная регрессия  $y = 0.0044x + 0.0107$ ,  $R^2 = 0.9983$ .

Предел аналитической чувствительности: 1.01 пг/мл.

Внутрисерийная воспроизводимость для пробы: 5.4%.

Межсерийная воспроизводимость для пробы: 5.2%.

Близость измерения к ожидаемой величине при разведении пробы: 104%.

Восстановление для пробы: 95.9%÷99%.

Анализатор: Cherwell® 2910 Combi (“Awareness Technology Inc.”).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-015-00355.

### ЛИТЕРАТУРА

- Sleeman M.W., Anderson K.D., Lambert P.D., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J. (2000) The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm. Acta Helv.*, 74 (2-3), 265-272. DOI: 10.1016/S0031-6865(99)00050-3
- Kang S.S., Keasey M.P., Cai J., Hagg T. (2012) Loss of neuron-astroglial interaction rapidly induces protective CNTF expression after stroke in mice. *J. Neurosci.*, 32(27), 9277-9287. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1746-12.2012
- Purser M.J., Dalvi P.S., Wang Z.C., Belsham D.D. (2013) The cytokine ciliary neurotrophic factor (CNTF) activates hypothalamic urocortin-expressing neurons both *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 8(4), e61616. DOI: 10.1371/journal.pone.0061616
- Valter K., Bisti S., Gargini C., Di Loreto S., Maccarone R., Cervetto L., Stone J. (2005) Time course of neurotrophic factor upregulation and retinal protection against light-induced damage after optic nerve section. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46(5), 1748-1754. DOI: 10.1167/iovs.04-0657
- Miotke J.A., MacLennan A.J., Meyer R.L.J. (2007) Immunohistochemical localization of CNTFRalpha in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve crush: evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury. *Comp. Neurol.*, 500, 384-400. DOI: 10.1002/cne.21174
- Ji J.Z., Elyaman W., Yip H.K., Lee V.W., Yick L.W., Hugon J., So K.F. (2004) CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur. J. Neurosci.*, 19(2), 265-272. DOI: 10.1111/j.0953-816X.2003.03107.x
- Liu X., Clark A.F., Wordinger R.J. (2007) Expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and its tripartite receptor complex by cells of the human optic nerve head. *Mol. Vis.*, 13, 758-763.
- Sarup V., Patil K., Sharma S.C. (2004). Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Res.*, 1013(2), 152-158. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.03.030
- Wong F.S.Y., Tsang K.K., Lo A.C.Y. (2017) Delivery of therapeutics to posterior eye segment: cell-encapsulating systems. *Neural Regen. Res.* 12(4), 576–577. DOI: 10.4103/1673-5374.205093
- Zhang K., Hopkins J.J., Heier J.S., Birch D.G., Halperin L.S., Albin T.A., Brown D.M., Jaffe G.J., Tao W., Williams G.A. (2011) Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(15), 6241-6245. DOI: 10.1073/pnas.1018987108
- Birch D.G., Bennett L.D., Duncan J.L., Weleber R.G., Pennesi M.E. (2016) Long-term follow-up of patients with retinitis pigmentosa receiving intraocular ciliary neurotrophic factor implants. *Am. J. Ophthalmol.*, 170, 10-14. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.07.013
- Chowdhury U.R., Madden B.J., Charlesworth M.C., Fautsch M.P. (2010) Proteome Analysis of Human Aqueous Humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51, 4921-4931. DOI: 10.1167/iovs.10-5531.
- Okragly A.J., Haak-Frendscho M. (1997) An acid-treatment method for the enhanced detection of GDNF in biological samples. *Exp. Neurol.*, 145(2 Pt 1), 592-596. DOI: 10.1006/exnr.1997.6500
- Tholen D.W., Kroll M., Astles R., Caffo A.L., Happe T.M., Krouwer J., Lasky F. (2003) Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, 23(16).

15. Lasky F.D., Boone D.J., Eckfeldt J.H., Feldkamp C.S., Hassemer D.J., Krishnamurthy S., Long T.A., Miller W.G., Naito H.K., Posner A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline — Second Edition. CLSI document EP14-A2 EP14-A2, 25(4).
16. EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline — Second Edition, 24(25).
17. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline EP17-A 24(34).
- 18 Kimata H. (2004) Passive smoking elevates neurotrophin levels in tears. Human & experimental toxicology, 23, 215-217. DOI: 10.1191/0960327104ht445oa
- 19 Mandel A.L., Ozdener H., Utermohlen V. (2011) Brain-derived neurotrophic factor in human saliva: ELISA optimization and biological correlates. Journal of immunoassay & immunochemistry, 32, 18-30. DOI: 10.1016/j.psychres.2017.04.034

Поступила: 25. 09. 2018.  
Принята к публикации: 23. 10. 2018.

## MEASURING CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR (CNTF) IN LACRIMAL FLUID USING OPTIMIZED COMMERCIAL ELISA

*T.A. Druzhkova<sup>1\*</sup>, A.A. Shpak<sup>2</sup>, K.I. Kozlova<sup>2</sup>, A.A. Yakovlev<sup>1,3</sup>, A.B. Guekht<sup>1</sup>, N.V. Gulyaeva<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow Healthcare Department, 43 Donskaya str., Moscow, 115419 Russia; e-mail:druzhkova.tatiana@mail.ru

<sup>2</sup>Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, 59a Beskudnikovskiy bvd., Moscow, 127486 Russia

<sup>3</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, 5A Butlerova str., Moscow, 117485 Russia

The concentration of ciliary neurotrophic factor (CNTF) was measured in lacrimal fluid (LF) using Human CNTF Quantikine ELISA kit (“R&D Systems”, USA) on a ChemWell 2910 automatic analyzer (“Awareness Technology Inc.”, USA). We initially attempted to use commercial kits, designed for serum and plasma CNTF detection, to quantify lacrimal CNTF. The results, however, were rarely above the minimum detection level of the kits, most likely due to matrix complexity and low concentrations of CNTF in diluted LF (LF had to be diluted because of the small volume of collected samples). The optimal sensitivity and the lowest background for the best minimum quantifiable value were determined empirically. Phosphate buffer solution containing 1% bovine serum albumin was selected as an optimal diluent for CNTF measurements in small fluid samples. A standard curve was produced using the calibrating solutions 0-250 pg/ml. Acid treatment of LF samples before the analysis allowed to increase the detectable concentration of the CNTF two-fold. The 1:3 dilution was selected based on the available volume of collected LF and a reasonable variation coefficient. The described protocol allowed to develop a sandwich ELISA optimized for lacrimal CNTF.

**Key words:** ciliary neurotrophic factor; lacrimal fluid; sandwich enzyme immunoassay technique

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant № 18-015-00355.