



Кондратенко О.А.¹✉, Мириленко А.П.², Козыро И.А.¹

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск, Беларусь

Методологический подход к оценке результатов лабораторного исследования с использованием однотипных по назначению иммуноферментных тест-систем, отличающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений (на примере определения маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции у детей с хроническими заболеваниями почек)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Кондратенко О.А. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста, обзор литературы; Мириленко А.П. – обработка, написание текста; Козыро И.А. – редактирование.

Подана: 29.10.2024

Принята: 05.02.2025

Контакты: kondratencko2011@yandex.by

Резюме

Введение. В практике выполнения ординарных и особенно научно-практических клинико-лабораторных исследований нередко встречаются ситуации, когда исследователь вынужденно прибегает к использованию однотипных по назначению лабораторно-диагностических тест-систем разных фирм-производителей, значительно различающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений. Представленный методологический подход к статистическому анализу фактически измеренных концентраций маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови и моче с использованием иммуноферментных (ИФА) тест-систем, различающихся показателями аналитической чувствительности и пределов измерений, позволяет нивелировать те недостатки, которые не могут не возникать в силу отличий в аналитических характеристиках, присущих тест-системам разных фирм-производителей. Обсуждается возможность применения этой методологии в качестве инструмента для математического преобразования фактически полученных результатов в пригодные для корректного статистического анализа.

Цель. Разработка методологии статистического анализа на основании полуколичественной оценки результатов измерений концентрации в сыворотке крови и моче гранзима Б, цитокератина-18, аннексина-V, интерлейкина-6, эндотелина-1, ICAM-1 однотипными по назначению наборами ИФА-реагентов разных фирм-производителей, отличающихся аналитической чувствительностью и пределами измерений.

Материалы и методы. Обследован 141 пациент с хроническими заболеваниями почек. Методами плащечного иммуноферментного анализа произведено определение



содержания гранзима Б, цитокератина-18, аннексина-V, интерлейкина-6, эндотелина-1, ICAM-1 в сыворотке крови и моче с применением тест-систем разных фирм-производителей, различающихся пределами их аналитической чувствительности и диапазонами измерений.

Учет реакции осуществлялся на фотометре универсальном Ф300 ТП (ОАО «Витязь», Беларусь), спектрометре Magellan V 7.1 (длина волны измерения 450 нм). Статистическая обработка полученного материала проводилась с применением стандартного пакета Statistica 10.0, программы Microsoft Excel. В дополнение к этому полученные результаты подвергались обработке с использованием разработанного метода статистического анализа.

Результаты. На первом этапе были определены концентрации маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови и моче пациентов исследуемых групп и групп сравнения с использованием однотипных по назначению иммуноферментных тест-систем разных фирм-производителей, отличающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений. Полученные значения содержания одного и того же биологически активного вещества различались между собой на порядок. Таким образом, установлено, что фактические измерения оказались несоизмеримыми и нуждаются в процедуре приведения их к сопоставимым величинам с тем, чтобы вся совокупность полученных результатов стала однородной. Для этого методом анализа смесей (mixture analysis) с использованием компьютерной программы PAST v 3.17 / PAIaeontological Statistics произведено выделение валидных наблюдений, распределенных в середине шкалы, исключая «нулевые» и малые значения, а также выбросы. На следующем этапе фактически полученные данные были приведены к соизмеримым величинам посредством нормировки показателей измеренной концентрации относительно пределов измерений, свойственных соответствующей тест-системе с выражением полученного значения в баллах, кратных 10: определяемое вещество, баллы = концентрация определяемого вещества, ед. изм. / предел измерений тест-системы, ед. изм. \times 10.

Заключение. Предложенный методологический подход к оценке результатов лабораторного исследования обеспечивает достоверность статистического анализа фактически полученных данных в случае использования однотипных по назначению ИФА тест-систем, отличающихся аналитической чувствительностью реализуемых с их применением методов исследования и пределами измерений показателей концентрации соответствующего аналита.

Ключевые слова: апоптоз, эндотелиальная дисфункция, хронические заболевания почек, полуколичественное определение, метод анализа смесей

Aksana A. Kandratsenka¹✉, Andrey P. Mirilenko², Ina A. Kazyra¹

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Belarusian State Agrarian Technical University, Minsk, Belarus

Methodological Approach for Evaluating Laboratory Test Results Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Systems (ELISA) of the Same Type but Differing by Analytical Sensitivity and Measurement Limits (Using Apoptosis and Endothelial Dysfunction Markers in Children with Chronic Kidney Disease as Example)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Aksana A. Kandratsenka – study concept and design, material collection, processing, text writing, literature review; Andrey P. Mirilenko – text processing, writing; Ina A. Kazyra – editing.

Submitted: 29.10.2024

Accepted: 05.02.2025

Contacts: kondratencko2011@yandex.by

Abstract

Introduction. In the practice of laboratory testing in the framework of research work, situations often occur when a researcher is forced to use laboratory diagnostic test systems of the same type from different manufacturers, with significantly different indicators of analytical sensitivity and measurement limits. The presented methodological approach to statistical analysis of factually measured apoptosis and endothelial dysfunction marker concentrations in blood serum and urine using ELISA test systems differing in analytical sensitivity and measurement limits allows leveling out disadvantages that cannot not but arise due to differences in analytical characteristics of test systems from different manufacturers. The feasibility of using this methodology as a "tool" for mathematical transformation of factual results into those suitable for correct statistical analysis is discussed.

Purpose. To elaborate a methodology for statistical analysis based on a semi-quantitative assessment of blood serum and urine levels of granzyme B, cytokeratin-18, annexin-V, interleukin-6, endothelin-1, ICAM-1 measurements results using ELISA reagents sets of the same type from different manufacturers, differing in analytical sensitivity and measurement limits.

Materials and methods. 141 patients with chronic kidney diseases were examined. Granzyme B, cytokeratin-18, annexin-V, interleukin-6, endothelin-1, and ICAM-1 blood serum and urine levels were determined by ELISA using test systems from various manufacturers, differing in their analytical sensitivity and measurement ranges. The reaction was recorded using a universal photometer F300 TP (JSC Vityaz Belarus), a Magellan V 7.1 spectrometer (measuring wavelength 450 nm). Statistical processing of the results obtained was carried out using the standard package Statistica 10.0 and Microsoft Excel program. In addition, the obtained data were processed using the elaborated statistical analysis method.

Results. At the first stage, concentrations of apoptosis and endothelial dysfunction markers in the blood serum and urine of patients of both studied and comparison groups



were determined using ELISA kits of the same type from different manufacturers, with different analytical sensitivity and measurement limits. The obtained values for the same biologically active substance level differed from each other per order of magnitude. Thus, it was found that factual measurements appeared to be incommensurable and required to be brought to comparable values in order to make the totality of results obtained uniform. For this purpose, valid observations distributed in the middle of the scale, excluding "zero" and minor values, as well as outliers, were selected by mixture analysis using PAST v 3.17 / PAleontological Statistics software. At the next stage, the factual data were brought to commensurable values by normalizing the measured concentrations values to the measurements limits of the corresponding test system and expressing the resulting value in points in multiple of 10: substance to be determined, points = level of substance to be determined, units of measurement / limit of measurement of the test system, units of measurement \times 10.

Conclusion. The proposed methodological approach to evaluating laboratory test results ensures the reliability of statistical analysis of factual data in the case of using ELISA test systems of the same type, differing in analytical sensitivity of the test methods performed with these test systems and the limits of measurement of relevant analyte concentration.

Keywords: apoptosis, endothelial dysfunction, chronic kidney disease, semi-quantitative determination, method of mixture analysis

■ ВВЕДЕНИЕ

Эндотелий, по современным представлениям, самый большой в организме человека активный эндокринный орган [1]. Считается, что эндотелий способствует поддержанию тонуса сосудов, адгезии клеток, воспаления, проницаемости сосудов и коагуляции. Любой дисбаланс этих физиологических и патологических процессов вызывает эндотелиальную дисфункцию [2]. Нарушение функции эндотелия признано характерным для многих сосудистых заболеваний [3]. Почки содержат эндотелий различных типов, каждый из которых имеет специфические структурные и функциональные характеристики. Почечный эндотелий является одновременно мишенью и движущей силой почечных и системных сердечно-сосудистых осложнений [4].

Условием осуществления многих физиологических процессов (в том числе эмбрионального развития) является гибель клеток. Ежедневно миллиарды клеток умирают и быстро удаляются фагоцитами. Этот механизм уничтожения мертвых клеток работает гладко в нормальных условиях, демонстрируя эффективность фагоцитарных процессов [5]. Гибель клеток разделяют на случайную и регулируемую. Программированная гибель клеток играет жизненно важную роль в функционировании органов в процессе развития, координации адаптивных или неадаптивных реакций и преодолении долгосрочных вредных внутриклеточных или внеклеточных нарушений гомеостаза. В ситуации, когда клеточные реакции на стресс не могут реагировать на эти нарушения, гибель клеток является побочным эффектом попытки восстановить баланс, независимо от результата [6]. Апоптоз представляет собой генетически детерминированный процесс разрушения клеточных структур, в ходе которого происходит фрагментация клетки на отдельные апоптотические тельца

и дальнейшее поглощение этих телец макрофагами [7]. Недавние исследования показали, что запрограммированная гибель клеток участвует в повреждении почечных канальцев, наблюдаемом при диабетической нефропатии [8]. Апоптоз характеризуется конденсацией ядер и образованием апоптотических телец и оказывает эффект, опосредуя потерю подоцитов [9]. Полученные к настоящему времени данные показывают, что апоптоз тубулярных эпителиальных клеток является критическим элементом, инициирующим прогрессирующий фиброз [10].

С учетом сложности и высокой стоимости лечения, инвалидизации и тяжести поражения при терминальной стадии хронической болезни почек (ХБП) остро стоит вопрос разработки малоинвазивной ранней диагностики хронических заболеваний почек. Нами предположено, что маркеры апоптоза и эндотелиальной дисфункции можно рассматривать как дополнительные лабораторные предикторы хронических нефропатий. В качестве маркеров апоптоза использовались иммунохимические тесты определения гранзима Б, цитокератина-18, аннексина-V, а эндотелиальной дисфункции – интерлейкина-6, молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), эндотелина-1. В ходе работы мы столкнулись со сложностью оценки полученных результатов исследования концентрации этих биологически важных веществ с использованием однотипных по назначению наборов реагентов разных фирм-производителей. Иммуноферментные тест-системы, использовавшиеся нами для определения концентрации исследуемых веществ в сыворотке крови и моче пациентов, при одинаковых размерностях единиц измерения различались аналитической чувствительностью и пределами измерений, что не позволяло корректно провести статистический анализ полученных данных. Поэтому нами был разработан методологический подход к статистическому анализу с использованием полуколичественной оценки фактически полученных данных.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методологии статистического анализа на основании полуколичественной оценки результатов измерений концентрации в сыворотке крови и моче гранзима Б, цитокератина-18, аннексина-V, интерлейкина-6, эндотелина-1, ICAM-1 однотипными по назначению наборами ИФА-реагентов разных фирм-производителей, отличающихся аналитической чувствительностью и пределами измерений.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование был включен 141 пациент педиатрического отделения № 1 (для нефрологических больных) Республиканского центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии с хроническими заболеваниями почек в возрасте от 2 до 17 лет. Обследованные дети распределены по группам: исследуемая – пациенты с первичными иммуноопосредованными гломерулопатиями (ГП) (n=32), со вторичными иммуноопосредованными ГП (n=41), с неиммуноопосредованными ГП (n=33), а также с негломерулярными хроническими заболеваниями почек (n=35), составившие группу сравнения 1. Все дети с ГП имели морфологически подтвержденный диагноз. Критерием включения пациентов в группу сравнения 1 было отсутствие поражения почечных клубочков. В группу сравнения 2 вошли 48 детей: пациенты педиатрического отделения № 2 (для кардиологических больных) УЗ «2-я городская детская клиническая больница» без признаков поражения почек и наличия воспалительных и аутоиммунных процессов.



Объектом исследования были сыворотка крови и моча пациентов исследуемых групп и групп сравнения. Для определения концентрации маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции производился забор венозной крови с последующим центрифугированием образцов. Полученная сыворотка хранилась в пробирках без использования консерванта при температуре -20°C . Для определения концентрации исследуемых биологически активных веществ в моче забор материала производился из утренней порции, полученной путем естественного мочеиспускания. Образцы также хранились в пробирках без использования консерванта при температуре -20°C .

Использовались однотипные наборы реагентов от 3–4 фирм-производителей.

Для определения гранзима B:

- Granzyme B ELISA Kit (E-EL-H1617, Elabscience, США);
- Granzyme B (78E96FF66B, Cloud-Clone Corp., США);
- Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit (EH0157, FineTest, Китай).

Для определения аннексина-V:

- Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (EH0423, FineTest, Китай);
- Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (E-EL-H0422, Elabscience, США);
- Human Annexin 5 ELISA Kit (E1107Hu, BT LAB, Китай).

Для определения цитокератина-18:

- Keratin 18 (SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США);
- Cytokeratin 18 ELISA Kit (EH2820, FineTest, Китай);
- Human cytokeratin 18 ELISA Kit (E1715Hu, BT LAB, Китай).

Для определения молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1):

- sICAM-1/CD54 ELISA Kit (EH0161, FineTest, Китай);
- sICAM-1/CD54 ELISA Kit (E-EL-H0135, Elabscience, США);
- Human Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 Elisa Kit (E0263Hu, BT LAB, Китай);
- Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) (SEA548Hu, Cloud-Clone Corp., США).

Для определения эндотелина-1:

- Endothelin-1 ELISA Kit (EH0648, FineTest, Китай);
- Endothelin 1 ELISA Kit (E-EL-H0064, Elabscience, США);
- Endothelin 1 ELISA Kit (E1238Hu, BT LAB, Китай);
- Endothelin 1 (CEA482Hu, Cloud-Clone Corp., США).

Для определения интерлейкина-6:

- Human Interleukin 6 ELISA Kit (E0090Hu, BT LAB, Китай);
- Interleukin 6 (IL6) (SEA079Hu, Cloud-Clone Corp., США);
- Интерлейкин-6-ИФА-Бест (А-8768, АО «Вектор-Бест», Россия).

Каждый из видов использованных наборов реагентов обладал только одному ему присущими характеристиками, отличающимися от таковых, присущих другим аналогичным наборам реагентов.

Методы исследования, реализуемые с использованием наборов реагентов, имели различную аналитическую чувствительность:

- для набора реагентов Granzyme B ELISA Kit (E-EL-H1617, Elabscience, США) аналитическая чувствительность выполняемого с его применением метода составила 9,38 нг/л, диапазон измерений – 15,63–1000 нг/л;
- для набора реагентов Granzyme B (78E96FF66B, Cloud-Clone Corp., США) аналитическая чувствительность исследования составила 0,059 мкг/л, диапазон измерений – 0,156–10 мкг/л;

- для набора реагентов Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit (EH0157, FineTest, Китай) аналитическая чувствительность исследования составила 0,938 нг/л, диапазон измерений – 1,563–100 нг/л;
- для набора реагентов Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (EH0423, FineTest, Китай) аналитическая чувствительность исследования составила 0,938 мкг/л, диапазон измерений – 1,563–100 мкг/л;
- для набора реагентов Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (E-EL-H0422, Elabscience, США) аналитическая чувствительность исследования составила 0,19 мкг/л, диапазон измерений – 0,31–20 мкг/л;
- для набора реагентов Human Annexin 5 ELISA Kit (E1107Hu, BT LAB, Китай) аналитическая чувствительность исследования составила 0,046 мкг/л, диапазон измерений – 0,1–40 мкг/л;
- для набора реагентов Keratin 18 (SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США) аналитическая чувствительность составила 0,06 мкг/л, диапазон измерений – 0,156–10 мкг/л;
- для набора Human cytokeratin 18 ELISA Kit (E1715Hu, BT LAB, Китай) аналитическая чувствительность составила 0,049 мкг/л, диапазон измерений – 0,1–40 мкг/л;
- для набора Cytokeratin 18 ELISA Kit (EH2820, FineTest, Китай) аналитическая чувствительность составила 0,094 мкг/л, диапазон измерений – 0,156–10 мкг/л;
- для набора Endothelin-1 ELISA Kit (EH0648, FineTest, Китай) аналитическая чувствительность составила 0,75 нг/л, диапазон измерений – 1,25–80 нг/л;
- для набора Endothelin 1 ELISA Kit (E-EL-H0064, Elabscience, США) аналитическая чувствительность составила 0,75 нг/л, диапазон измерений – 1,25–80 нг/л;
- для набора Endothelin 1 ELISA Kit (E1238Hu, BT LAB, Китай) аналитическая чувствительность составила 1,01 нг/л, диапазон измерений – 2–600 нг/л;
- для набора Endothelin 1 (CEA482Hu, Cloud-Clone Corp., США) аналитическая чувствительность составила 2,71 мкг/л, диапазон измерений – 6,17–500 мкг/л;
- для набора sICAM-1/CD54 ELISA Kit (EH0161, FineTest, Китай) аналитическая чувствительность составила 0,469 мкг/л, диапазон измерений – 0,781–50 мкг/л;
- для набора sICAM-1/CD54 ELISA Kit (E-EL-H0135, Elabscience, США) аналитическая чувствительность составила 46,88 нг/л, диапазон измерений – 78,13–5000 нг/л;
- для набора Human Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 Elisa Kit (E0263Hu, BT LAB, Китай) аналитическая чувствительность составила 2,61 нг/л, диапазон измерений – 5–2000 нг/л;
- для набора Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) (SEA548Hu, Cloud-Clone Corp., США) аналитическая чувствительность составила 34 нг/л, диапазон измерений – 78–5000 нг/л;
- для набора Human Interleukin 6 ELISA Kit (E0090Hu, BT LAB, Китай) аналитическая чувствительность составила 1,03 нг/л, диапазон измерений – 2–600 нг/л;
- для набора Interleukin 6 (IL6) (SEA079Hu, Cloud-Clone Corp., США) аналитическая чувствительность составила 3,2 мкг/л, диапазон измерений – 7,8–500 мкг/л;
- для набора Интерлейкин-6-ИФА-Бест (A-8768, АО «Вектор-Бест», Россия) аналитическая чувствительность составила 0,5 мкг/л, диапазон измерений – 5,6–300 мкг/л.

Учет реакции осуществляли на фотометре универсальном Ф300 ТП (ОАО «Витязь», Беларусь), спектрометре Magellan V 7.1, длина волны измерения 450 нм.



Для статистического анализа результаты приводили к одним единицам измерения. Статистическая обработка полученного материала проводилась с применением стандартного пакета Statistica 10.0, программы Microsoft Excel.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация традиционно используемых клинико-лабораторных исследований, состоящая в применении коммерческих тест-систем разных фирм-производителей, нередко существенно различающихся химико-аналитическими характеристиками (даже в ситуации выполнения одного и того же вида исследования), выявила ряд недостатков, выражающихся в невозможности использовать для статистического анализа фактически полученные результаты по причине существенных различий в диапазонах числовых значений. Это и явилось основой обоснования целесообразности создания и внедрения нового методологического подхода, во многом базирующегося на использовании методов статистического анализа.

На первом этапе были определены показатели концентрации маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови и моче пациентов исследуемых групп и групп сравнения с использованием однотипных по назначению иммуноферментных тест-систем разных фирм-производителей, отличающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений. Полученные каждым набором реагентов результаты представлены в табл. 1 в виде Me (25–75%), где Me – медиана, (25–75%) – межквартильный размах.

Как видно из представленной таблицы, значения концентрации одного и того же биологически активного вещества, определенные разными наборами тест-систем, во многих случаях различаются между собой на порядок.

С помощью гистограмм мы попытались на примере значений концентрации гранзима Б в сыворотке крови, полученных с использованием тест-систем Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай (набор 1) и Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США (набор 2), графически продемонстрировать, как распределились измерения относительно количества наблюдений (рис. 1). Приведенные виды наборов реагентов были выбраны по причине того, что с их применением было получено наибольшее количество «содержательных» результатов, то есть значений, отличающихся от 0, и с отсутствием выбросов. Наборами реагентов 1 и 2 проведено соответственно 72 и 43 измерения.

Полученные этими же наборами реагентов значения концентрации гранзима Б в сыворотке крови оказались наиболее несоизмеримыми – Me 8,9 (4,7–13,6) для Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай, и Me 218,8 (31,3–250) для Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США. Также не подлежат сравнению между собой и значения концентрации гранзима Б в моче – Me 8,3 (4,5–12,7) для первой тест-системы и Me 109,4 (15,6–125) для второй. При этом фактические значения концентраций гранзима Б в сыворотке крови и моче попадают в заявленный диапазон аналитической чувствительности исследования, выполненного с применением наборов реагентов Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай, и Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США.

Эти же выводы подтверждаются и при анализе концентраций цитокератина-18 в сыворотке крови и моче. По принципу наибольшего количества «содержательных» результатов для сравнения взяты те из них, которые были получены с использованием

Методологический подход к оценке результатов лабораторного исследования с использованием однотипных по назначению иммуноферментных тест-систем, отличающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений (на примере определения маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции у детей с хроническими заболеваниями почек)

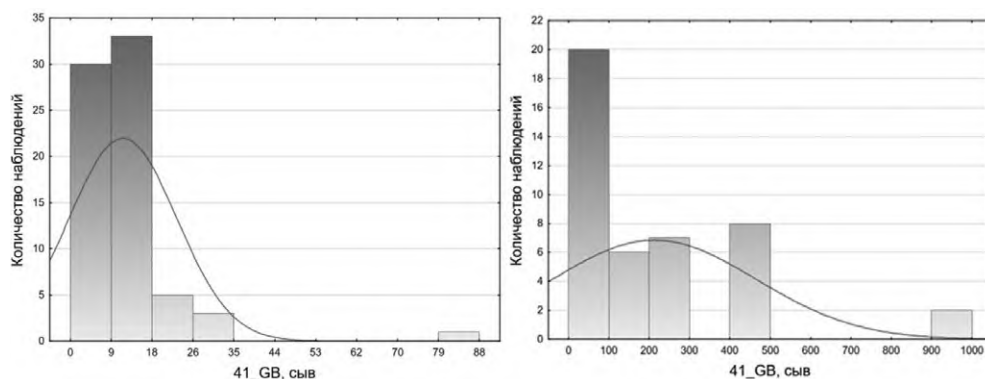
Таблица 1

Граничные значения фактически измеренной концентрации маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции, полученные с использованием иммуноферментных тест-систем разных производителей

Table 1

Boundary values of factually measured markers of apoptosis and endothelial dysfunction concentrations obtained using enzyme immunoassay systems from different manufacturers

Гранзим Б, Ме (25–75%)		Аннексин-V, Ме (25–75%)		Цитокератин-18, Ме (25–75%)	
Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit (EH0157, FineTest, Китай), нг/л		Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (E-EL-H0422, Elabscience, США), мкг/л		Keratin 18 (SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США), мкг/л	
Сыворотка 8,9 (4,7–13,6)	Моча 8,3 (4,5–12,7)	Сыворотка 1,3 (1,3–2,5)	Моча 0,6 (0–0,6)		
Granzyme B (78E96FF66B, Cloud-Clone Corp., США), нг/л		Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit (EH0423, FineTest, Китай), мкг/л			
Сыворотка 0,3 (0–0,3)	Моча 0,3 (0–0,3)	Сыворотка 3,7 (0–3,7)	Моча 6,1 (0,2–6,3)	Сыворотка 0,8 (0,3–1,1)	Моча 0,5 (0,1–0,7)
Granzyme B ELISA Kit (E-EL-H1617, Elabscience, США), нг/л		Human Annexin 5 ELISA Kit (E1107Hu, BT LAB, Китай), мкг/л		Цитокератин 18 ELISA Kit (EH2820, FineTest, Китай), мкг/л	
Сыворотка 218,8 (31,3–250)	Моча 109,4 (15,6–125)	Сыворотка 3,0 (1,9–4,9)	Моча 4,8 (5,0–9,8)	Сыворотка 0 (0–0)	Моча 0,1 (0–0,1)
				Human cytokeratin 18 ELISA Kit (E1715Hu, BT LAB, Китай), мкг/л	
				Сыворотка 2,0 (4,1–6,1)	Моча 3,5 (4,4–7,9)
Эндотелин-1, Ме (25–75%)		ICAM-1, Ме (25–75%)		Интерлейкин-6, Ме (25–75%)	
Endothelin-1 ELISA Kit (EH0648, Fine-Test, Китай), нг/л		Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) (SEA548Hu, Cloud-Clone Corp., США), мкг/л		Interleukin 6 (IL6) (SEA079Hu, Cloud-Clone Corp., США), нг/л	
Сыворотка 15,5 (5,0–20,5)	Моча 14,7 (7,5–22,2)	Сыворотка 2,3 (0,2–2,5)	Моча 1,2 (0,1–1,3)	Сыворотка 0 (0–0)	Моча 0 (0–0)
Endothelin 1 (CEA482Hu, Cloud-Clone Corp., США), нг/л		sICAM-1/CD54 ELISA Kit (E-EL-H0135, Elabscience, США), мкг/л		Интерлейкин-6-ИФА-Бест (A-8768, АО «Вектор-Бест», Россия), нг/л	
Сыворотка 55,6 (55,6–111,1)	Моча 6,2 (0–6,2)	Сыворотка 1,1 (0,1–1,3)	Моча 3,1 (0,2–3,3)	Сыворотка 11,1 (5,6–16,7)	Моча 16,7 (0–16,7)
Endothelin 1 ELISA Kit (E1238Hu, BT LAB, Китай), нг/л		sICAM-1/CD54 ELISA Kit (EH0161, FineTest, Китай), мкг/л		Human Interleukin 6 ELISA Kit (E0090Hu, BT LAB, Китай), нг/л	
Сыворотка 19,6 (63,5–83,1)	Моча 65,2 (82,2–147,4)	Сыворотка 21,9 (3,1–25)	Моча 25,0 (25,0–50,0)	Сыворотка 41,1 (51,8–92,9)	Моча 64,6 (107,3–171,9)
		Human Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 Elisa Kit (E0263Hu, BT LAB, Китай), мкг/л			
		Сыворотка 0,1 (0,1–0,2)	Моча 0,3 (0,3–0,5)		



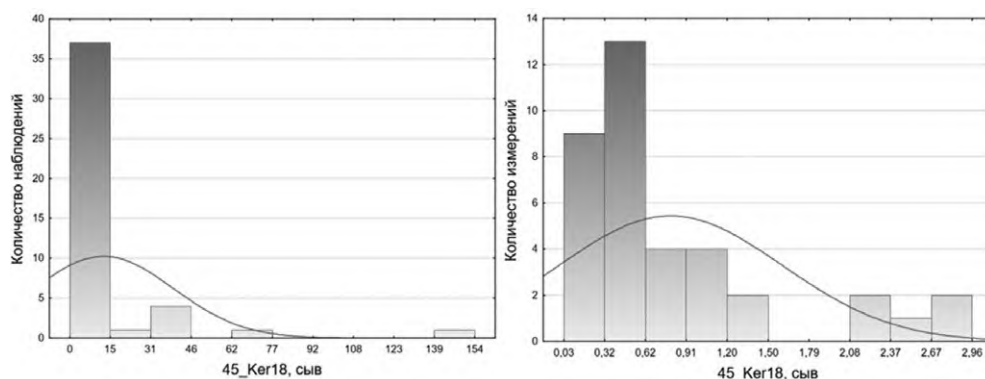
Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH015, FineTest, Китай

Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США

Рис. 1. Концентрация гранзима Б в сыворотке крови, измеренная тест-системами Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай, и Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США
Fig. 1. Granzyme B blood serum concentration measured by the test systems Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, China and Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, USA

тест-систем Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США (набор 1) и Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США (набор 2). Наборами 1 и 2 проведено соответственно 44 и 37 измерений. На рис. 2 показаны гистограммы распределения значений концентрации цитокератина-18 относительно количества наблюдений в сыворотке крови.

Результаты измерений, выполненных с применением тест-систем Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США (набор 1) и Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США (набор 2), различаются между собой более чем в 10 раз (значение полученных



Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США

Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США

Рис. 2. Концентрация цитокератина-18 в сыворотке крови, измеренная тест-системами Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США, и Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США
Fig. 2. Cytokeratin-18 blood serum concentration measured by the test systems Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, USA and Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., USA

концентраций цитокератина-18 в сыворотке крови Me 9,6 (0–9,6) для набора 1 и Me 0,8 (0,3–1,1) для набора 2), что затрудняет проведение корректного статистического анализа. Данная серия измерений также попадает в заявленный диапазон аналитической чувствительности исследования, выполненного с применением наборов реагентов Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США, и Keratin 18, SEB231Hu, Cloud-Clone Corp., США.

Аналогичным образом были проанализированы результаты, полученные каждым из использованных наборов реагентов.

Таким образом, установлено, что фактические измерения оказались несоизмеримыми и нуждаются в процедуре приведения их к соизмеримым величинам с тем, чтобы вся совокупность полученных результатов стала однородной.

Специфика выполненных нами измерений состоит в том, что они содержат большое количество «нулевых» результатов, а также некоторое количество измерений, которые с точки зрения статистического анализа считаются выбросами. Математический анализ корректно проводить на соизмеримых результатах, «нулевые» значения и выбросы из анализа следует исключить. С целью приведения наблюдений к однородности непригодные для статистического анализа случаи исключались, для чего нами был применен метод анализа смесей (mixture analysis) [11]. Суть метода продемонстрирована на примере анализа результатов, полученных с использованием наборов реагентов Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай (набор 1) и Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США (набор 2). С помощью компьютерной программы PAST v 3.16 / Palaeontological Statistics [12] произведено выделение валидных наблюдений, распределенных в середине шкалы, исключая «нулевые» и малые значения, а также выбросы. На рис. 3 графически представлены результаты, полученные с использованием анализа смесей (mixture analysis) концентрации гранзима B в сыворотке крови.

Столбцы гистограммы отображают распределение полученных значений концентрации гранзима B в сыворотке крови относительно числа наблюдений, наложенные

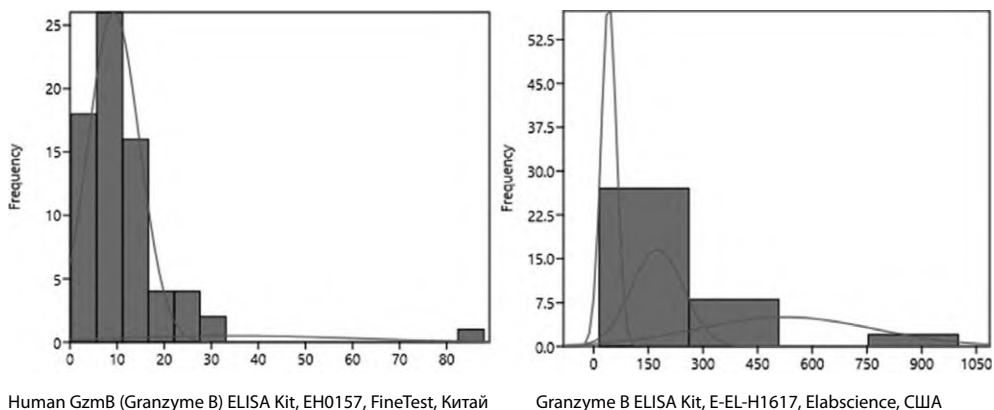


Рис. 3. Анализ смесей концентрации гранзима B в сыворотке крови
Fig. 3. Analysis of granzyme B concentration mixtures in blood serum



на них графики – «нулевые» значения, валидные измерения и выбросы. С помощью этого анализа выделена подгруппа для дальнейшего нормирования, отброшены непригодные для статистического анализа измерения и выбросы. Как видно из графиков, результаты, полученные набором реагентов 1, распределились в две подгруппы, и у подгруппы для нормирования среднее значение составило 9,3 нг/л. Измерения, выполненные с применением набора реагентов 2, распределились в три подгруппы, в этом случае у подгруппы для дальнейшего нормирования среднее значение составило 175 нг/л.

Аналогичным образом были обработаны данные по всем тест-системам, которыми определялась концентрация биологически активных веществ. Полученные данные приведены в табл. 2. Они представлены по тем наборам, в которых получено наибольшее количество убедительных измерений: набор 1 – Human Gzmb (Granzyme B) ELISA Kit, EH0157, FineTest, Китай, набор 2 – Granzyme B ELISA Kit, E-EL-H1617, Elabscience, США, набор 3 – Human ANXA5 (Annexin A5) ELISA Kit, EH0423, FineTest, Китай, набор 4 – Human Annexin 5 ELISA Kit, E1107Hu, BT LAB, Китай, набор 5 – Cytokeratin 18, E-EL-H2072, Elabscience, США, набор 6 – Human cytokeratin 18 ELISA Kit, E1715Hu, BT LAB, Китай, набор 7 – Endothelin-1 ELISA Kit, EH0648, FineTest, Китай, набор 8 – Endothelin 1 ELISA Kit, E1238Hu, BT LAB, Китай, набор 9 – sICAM-1/CD54 ELISA Kit, E-EL-H0135, Elabscience, США, набор 10 – Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), SEA548Hu, Cloud-Clone Corp., США, набор 11 – Интерлейкин-6-ИФА-Бест, А-8768, АО «Вектор-Бест», Россия, набор 12 – Human Interleukin 6 ELISA Kit, E0090Hu, BT LAB, Китай.

Анализируя полученные в результате анализа смесей средние значения концентраций маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции, можно отметить, что их значения в некоторых случаях различаются вплоть до 15 раз. В такой ситуации проведение корректного статистического анализа невозможно.

Таблица 2
Среднее значение концентрации маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови и моче, полученное с использованием методологии анализа смесей (mixture analysis)

Table 2
Average concentration of apoptosis and endothelial dysfunction markers in blood serum and urine, obtained using the methodology of mixture analysis

Исследуемый маркер	№ набора, среднее значение концентрации \bar{X} / предел измерений			
	Сыворотка		Моча	
Гранзим Б, нг/л	№ 1 9,3 / 100	№ 2 175 / 1000	№ 1 7,1 / 100	№ 2 71 / 1000
Аннексин-V, мкг/л	№ 3 4,43 / 100	№ 4 3,7 / 40	№ 3 11,1 / 100	№ 4 4,6 / 40
Цитокератин-18, мкг/л	№ 5 17,6 / 154	№ 6 4,7 / 40	№ 5 10,7 / 154	№ 6 3,5 / 40
Эндотелин-1, нг/л	№ 7 15,2 / 80	№ 8 108 / 600	№ 7 15,9 / 80	№ 8 113 / 600
ICAM-1, мкг/л	№ 9 1,9 / 10	№ 10 0,99 / 5	№ 9 0,58 / 10	№ 10 0,24 / 5
ИЛ-6, нг/л	№ 11 22,3 / 300	№ 12 64,9 / 600	№ 11 29,2 / 300	№ 12 102 / 600

Методологический подход к оценке результатов лабораторного исследования с использованием однотипных по назначению иммуноферментных тест-систем, отличающихся показателями аналитической чувствительности и пределами измерений (на примере определения маркеров апоптоза и эндотелиальной дисфункции у детей с хроническими заболеваниями почек)

Таблица 3
Результаты измерений, пересчитанные в баллы посредством 10-балльного нормирования
Table 3
Measurement results converted into points by means of 10-point normalization

Исследуемый маркер	№ набора, значение концентрации в баллах			
	Сыворотка		Моча	
Гранзим Б, нг/л	№ 1 – 0,93	№ 2 – 1,75	№ 1 – 0,7	№ 2 – 0,7
Аннексин-V, мкг/л	№ 3 – 0,44	№ 4 – 0,92	№ 3 – 1,1	№ 4 – 1,2
Цитокератин-18, мкг/л	№ 5 – 1,1	№ 6 – 1,2	№ 5 – 0,69	№ 6 – 0,87
Эндотелин-1, нг/л	№ 7 – 1,9	№ 8 – 1,8	№ 7 – 2,0	№ 8 – 1,9
ICAM-1, мкг/л	№ 9 – 1,9	№ 10 – 2,0	№ 9 – 0,58	№ 10 – 0,48
ИЛ-6, нг/л	№ 11 – 0,74	№ 12 – 1,1	№ 11 – 0,97	№ 12 – 1,7

На третьем этапе фактически полученные данные были приведены к соизмеримым величинам посредством нормировки значений концентрации относительно пределов измерений по соответствующей тест-системе с выражением полученного значения в баллах, кратных 10: определяемое вещество, баллы = концентрация определяемого вещества, ед. изм. / предел измерений тест-системы, ед. изм. \times 10. В табл. 3 приведены результаты измерений после нормирования в баллах.

Из представленной таблицы видно, что средние значения нормированных измерений существенно сблизились. В таком виде результаты вполне сопоставимы и становятся пригодными для корректного проведения последующего статистического анализа.

Таким образом, предложенную методику можно рассматривать как эффективный инструмент для математического преобразования фактически полученных результатов в пригодные для корректного статистического анализа.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный методологический подход к оценке результатов лабораторного исследования обеспечивает достоверность статистического анализа полученных данных в случае использования однотипных по назначению ИФА тест-систем, отличающихся аналитической чувствительностью и пределами измерений.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Krüger-Genge A., Blocki A., Franke R.P., et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4411. doi: 10.3390/ijms20184411
2. Kozanoglu I., Pepedil-Tanrikulu F. Functions of the endothelium and its role in hematopoietic cell transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*. 2022;61(1):103368. doi: 10.1016/j.transci.2022.103368
3. Kumar G., Kumar Dey S., Kundu S. Functional implications of vascular endothelium in regulation of endothelial nitric oxide synthesis to control blood pressure and cardiac functions. *Life Science Journal*. 2020;259:118377. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118377
4. Jourde-Chiche N., Fakhouri F., Dou L., et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019;15(2):87–108. doi: 10.1038/s41581-018-0098-z
5. Bertheloot D., Latz E., Franklin B.S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*. 2021;18(5):1106–1121. doi: 10.1038/s41423-020-00630-3. Epub 2021 Mar 30.



6. Shen S., Ji C., Wei K. Cellular senescence and regulated cell death of tubular epithelial cells in diabetic kidney disease. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2022;13:924299. doi: 10.3389/fendo.2022.924299
7. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*. 2018;25(3):486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
8. Wang Y., Jin M., Cheng C.K., et al. Tubular injury in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and potential therapeutic perspectives. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2023;14:1238927. doi: 10.3389/fendo.2023.1238927
9. Jiang A., Song A., Zhang C. Modes of podocyte death in diabetic kidney disease: an update. *Nephrol*. 2022;35(6):1571–1584. doi: 10.1007/s40620-022-01269-1
10. Ma T., Li H., Liu H., et al. Neat1 promotes acute kidney injury to chronic kidney disease by facilitating tubular epithelial cells apoptosis via sequestering miR-129-5p. *Mol. Ther*. 2022;30(10):3313–3332. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.05.019
11. Gibson E., Goldsmith J., Kioumourtzoglou M.A. Complex mixtures, complex analyses: an emphasis on interpretable results. *Current environmental health reports*. 2019;6(2):53–61. doi: 10.1007/s40572-019-00229-5
12. *PAST v 3.16 / Palaeontological Statistics. Reference manual*. Available at: https://elearning.unite.it/pluginfile.php/65167/mod_resource/content/0/past3manual.pdf