

## Изучение стабильности биохимических маркеров при непрерывном длительном хранении сыворотки крови и при однократном размораживании

Козлова В. А., Метельская В. А., Покровская М. С., Ефимова И. А., Литинская О. А., Куценко В. А., Яровая Е. Б., Шальнова С. А., Драпкина О. М.

ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины” Минздрава России. Москва, Россия

**Цель.** Изучить влияние долгосрочного хранения при  $-70^{\circ}\text{C}$  и однократного размораживания образцов сыворотки крови, хранящихся в биобанке ФГБУ “НМИЦ ТПМ” Минздрава России (Биобанк), на биохимические показатели сыворотки крови, характеризующие функционирование ряда метаболических систем, путем сравнения результатов исследований, проведенных в 2013-2014 и 2020 гг.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служила сыворотка крови участников многоцентрового эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ, хранившаяся в специализированном Биобанке с 2013-2014 гг. при  $-70^{\circ}\text{C}$  либо непрерывно ( $n=149$ ), либо с однократным размораживанием ( $n=20$ ). Количественное определение биохимических показателей сыворотки крови исходно и в 2020 г. выполнено на одном и том же оборудовании и с использованием одних и тех же стандартных методов.

**Результаты.** Длительное хранение при  $-70^{\circ}\text{C}$  привело к небольшим, но статистически значимым изменениям практически всех анализируемых показателей: снизились уровни холестерина (ХС) липопротеинов низкой плотности (ЛНП), аполипопротеина А1, возрос уровень ХС липопротеинов высокой плотности, триглицеридов и аполипопротеина В, а также глюкозы, и высокочувствительного С-реактивного белка. Уровни инсулина и тиреотропного гормона за время хранения не изменились. В то же время, выявленные сильные положительные связи между исходными уровнями показателей и измеренными в 2020 г. в образцах, хранившихся непрерывно, свидетельствуют о правомочности такого хранения. В однократно размороженных за время хранения образцах изменения большинства показателей были более выраженными.

**Заключение.** Результаты проспективного когортного исследования, направленного на изучение стабильности образцов сыворотки крови человека во время их хранения в Биобанке, свидетельствуют о правомочности длительного хранения биообразцов при  $-70^{\circ}\text{C}$  без размораживания. Размораживание и повторное замораживание образцов во время хранения (даже однократное) недопустимо, поскольку приводит к выраженному снижению уровня ХС ЛНП. Учитывая тот факт, что именно уровень ХС ЛНП является мишенью липид-снижающей терапии, рекомендуется непрерывное низкотемпературное (не  $>-70^{\circ}\text{C}$ ) хранение образцов сыворотки крови, предназначенных для анализа этого показателя.

**Ключевые слова:** биобанкирование, длительное хранение, замораживание/оттаивание, стабильность, контроль качества, биообразцы, сыворотка крови, биохимические маркеры.

**Отношения и деятельность:** нет.

Поступила 06/11-2020

Получена рецензия 19/11-2020

Принята к публикации 26/11-2020



**Для цитирования:** Козлова В. А., Метельская В. А., Покровская М. С., Ефимова И. А., Литинская О. А., Куценко В. А., Яровая Е. Б., Шальнова С. А., Драпкина О. М. Изучение стабильности биохимических маркеров при непрерывном длительном хранении сыворотки крови и при однократном размораживании. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2736. doi:10.15829/1728-8800-2020-2736

### Stability of serum biochemical markers during standard long-term storage and with a single thawing

Kozlova V. A., Metelskaya V. A., Pokrovskaya M. S., Efimova I. A., Litinskaya O. A., Kutsenko V. A., Yarovaya E. B., Shalnova S. A., Drapkina O. M. National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

**Aim.** To study the effect of standard serum long-term storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  and with a single thawing on the biochemical markers by comparing the results of studies carried out in 2013-2014 and 2020.

**Material and methods.** The material was the blood serum of participants in the ESSE-RF study, which was stored in a specialized biobank from 2013-2014 at  $-70^{\circ}\text{C}$  either continuously ( $n=149$ ) or with a single thawing ( $n=20$ ). Initially and in 2020, the quantitative determination of

serum biochemical parameters was carried out using same equipment and standard techniques.

**Results.** Long-term storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  led to mild, but significant changes in almost all analyzed parameters: low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and apolipoprotein A1 levels decreased; levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides, apolipoprotein B, glucose, and high-sensitivity C-reactive protein increased. Insulin and

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: vkozlova2905@gmail.com

Тел.: +7 (906) 044-25-02

[Козлова В. А. — лаборант-исследователь лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0002-3843-6980, Метельская В. А. — д.б.н., профессор, г.н.с. отдела изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0001-8665-9129, Покровская М. С. — к.б.н., руководитель лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0001-6985-7131, Ефимова И. А. — лаборант-исследователь лаборатории “Банк биологического материала”, ORCID: 0000-0002-3081-8415, Литинская О. А. — к.м.н., руководитель клинико-диагностической лаборатории, ORCID: 0000-0002-0003-2681, Куценко В. А. — м.н.с. лаборатории биостатистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0001-9844-3122, Яровая Е. Б. — д.ф.-м.н., профессор, руководитель лаборатории биостатистики отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0002-6615-4315, Шальнова С. А. — д.м.н., профессор, г.н.с. отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний, ORCID: 0000-0003-2087-6485, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

thyroid-stimulating hormone levels did not change during storage. The revealed strong positive relationships between the initial concentrations and those measured in 2020 in samples that were stored continuously indicate the relevance of such storage. In samples with single thawing, changes in most parameters were more pronounced.

**Conclusion.** The results of a prospective cohort study aimed at studying the stability of human serum samples during storage indicate the validity of long-term storage at  $-70^{\circ}\text{C}$  without thawing. Freeze-thawing cycle of samples (even once) is unacceptable, since it leads to a pronounced LDL-C decrease. Given the fact that it is the LDL-C levels that is the target of lipid-lowering therapy, continuous low-temperature (not  $>-70^{\circ}\text{C}$ ) storage of blood serum samples is recommended.

**Key words:** biobanking, long-term storage, freeze-thawing, stability, quality control, biosamples, blood serum, biochemical markers.

**Relationships and Activities:** none.

Kozlova V.A.\* ORCID: 0000-0002-3843-6980, Metelskaya V.A. ORCID: 0000-0001-8665-9129, Pokrovskaya M.S. ORCID: 0000-0001-6985-

7131, Efimova I.A. ORCID: 0000-0002-3081-8415, Litinskaya O.A. ORCID: 0000-0002-0003-2681, Kutsenko V.A. ORCID: 0000-0001-9844-3122, Yarovaya E.B. ORCID: 0000-0002-6615-4315, Shalnova S.A. ORCID: 0000-0003-2087-6485, Drapkina O.M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

\*Corresponding author:  
vkozlova2905@gmail.com

**Received:** 06/11-2020

**Revision Received:** 19/11-2020

**Accepted:** 26/11-2020

**For citation:** Kozlova V.A., Metelskaya V.A., Pokrovskaya M.S., Efimova I.A., Litinskaya O.A., Kutsenko V.A., Yarovaya E.B., Shalnova S.A., Drapkina O.M. Stability of serum biochemical markers during standard long-term storage and with a single thawing. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2736. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2020-2736

apo AI — аполипротеин AI, apo B — аполипротеин B, Биобанк — биобанк ФГБУ "НИИЦ ТПМ" Минздрава России, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ЛВП — липопротеины высокой плотности, ЛНП — липопротеины низкой плотности, вСРБ — С-реактивный белок, определенный высокочувствительным методом, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, СРБ — С-реактивный белок, ТГ — триглицериды, ТТГ — тиреотропный гормон, ФГБУ "НИИЦ ТПМ" — Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины", Министерства здравоохранения Российской Федерации, ХС — холестерин, ЭССЕ-РФ — Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах Российской Федерации.

Ключевыми факторами, обеспечивающими поддержание высокого качества биологических образцов, являются регламентированные условия взятия биологического материала, преаналитической пробоподготовки и хранения биообразцов. Очевидно, что большинство ошибок при работе в лаборатории возникают из-за нарушений преаналитического этапа [1], поэтому в биобанкировании особенно важно соблюдение стандартных условий проведения преаналитического этапа, т.к. биобанк является платформой для многолетнего хранения широкого спектра биологических образцов. Надлежащее соблюдение преаналитических условий крайне необходимо для обеспечения высокого качества биообразцов, а также точности и воспроизводимости экспериментов с использованием биоматериала. С этой целью как в отдельных биобанках, так и в сообществах биобанков, включая ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories), BBMRI-ERIC (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure Consortium), ESBB (European, Middle Eastern & African Society for Biopreservation and Biobanking), НАСБИО (Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию), разрабатывается необходимая документация: стандартные операционные процедуры, единые стандарты по биобанкированию (International Organization for Standardization) — ISO 20387, ISO 21899, позволяющие стандартизовать и контролировать наиболее важные аспекты этапов пробоподготовки и длительного хранения биообразцов: температуру, длительность и условия хранения и транспортировки, фиксацию числа циклов замо-

раживания/оттаивания и задержки в обработке образца (до и после центрифугирования), использование специальных веществ-криопротекторов, тип антикоагулянта и т.д. [2].

В ведущих биобанках мира контроль качества биоматериала, хранящегося в течение долгого времени, проводится на регулярной основе. Наряду с этим продолжается поиск маркеров, характеризующих качество биообразцов и их хранения. Наиболее значимых результатов в этой области достигли специалисты отдела контроля качества биобанка Люксембурга (Integrated Biobank of Luxembourg, IBBL) [3].

Поскольку кровь и ее производные (сыворотка, плазма, клетки крови) являются наиболее часто используемым типом биоматериала при проведении биомедицинских исследований, изучение условий получения, хранения, размораживания крови является одним из актуальных направлений в области контроля качества биообразцов. В рамках биобанкирования и длительного хранения биообразцов основной задачей является сохранность свойств биохимических показателей, качественно или количественно определяемых в крови и ее производных. Существенную роль здесь играет обеспечение адекватных условий хранения. Образцы сыворотки обычно хранят в морозильных камерах при температуре не  $>-70^{\circ}\text{C}$ , т.к. большинство биохимических показателей не отличаются хорошей стабильностью. Неправильное хранение образцов может привести к быстрой деградации маркеров заболевания, а, следовательно, к снижению достоверности результатов исследований [4]. Цельную кровь, предназначенную для геномных исследова-

ний, допустимо хранить при температуре  $-30^{\circ}\text{C}$ , т.к. дезоксирибонуклеиновая кислота сохраняется в течение долгого времени при этих условиях [5].

Помимо времени и температуры хранения большое влияние на качество биообразцов оказывает количество циклов замораживания/оттаивания. При исследовании сыворотки и плазмы крови замораживание и размораживание сыворотки  $>1$  раза не рекомендуется, т.к. это может привести к деградации целого ряда маркеров, например, матриксных металлопротеиназ, их ингибиторов, сосудистых факторов роста [6]. При получении сыворотки и плазмы сразу после центрифугирования полученный объем следует разделять на несколько пробирок (аликвотировать), чтобы в случае необходимости повторного использования образца размораживать новую аликвоту. Важно отметить, что для оптимальной стабильности всех маркеров рекомендуется быстрое замораживание образцов сыворотки и плазмы, т.к. при медленном замораживании образуются кристаллы льда, которые разрывают молекулы, особенно белковые. Таким образом, для использования сыворотки в широком спектре исследований необходимо пользоваться универсальным правилом: сразу после центрифугирования замораживать аликвотированные образцы (оптимально при  $-70^{\circ}\text{C}$ ), а размораживание следует производить медленно, при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Некорректно переносить образец сразу же из  $-70^{\circ}\text{C}$  в комнатную температуру [7].

Несмотря на актуальность проблемы, исследований, посвященных изучению стабильности биохимических показателей, измеряемых в сыворотке крови, при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  в условиях биобанка, не так много. Большинство работ посвящено краткосрочному хранению биообразцов непосредственно в лаборатории. Более того, данные, полученные разными авторами по исследованиям стабильности биомаркеров во время хранения сыворотки, весьма противоречивы и требуют дополнительных исследований и уточнения для конкретных условий получения и хранения образцов, а также использования определенных тест-систем и приборов [2, 8].

Целью настоящей работы было изучить влияние долгосрочного хранения при  $-70^{\circ}\text{C}$  и однократного размораживания образцов сыворотки крови, хранящихся в биобанке ФГБУ «НИИЦ ТПМ» Минздрава России (далее Биобанк), на биохимические показатели сыворотки крови, характеризующие функционирование ряда метаболических систем, путем сравнения результатов исследований, проведенных в 2013–2014 и 2020 гг.

## Материал и методы

Объект исследования — образцы сыворотки крови, полученные в ходе исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемио-

логия сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах Российской Федерации) и хранящиеся в Биобанке с 2013–2014 гг. Исследование было проведено среди представительной выборки населения, включавшей мужчин ( $n=6919$ ) и женщин ( $n=11386$ ) в возрасте 25–64 лет. Образцы биоматериала были получены после получения информированного согласия и с соблюдением требований стандартных операционных процедур [9]. Сыворотку крови получали путем центрифугирования (1200 g, 15 мин, при  $+4^{\circ}\text{C}$ ), затем ее разделяли на аликвоты по 0,5–1,0 мл, замораживали, транспортировали на сухом льду и до исследования хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в Биобанке. Пробоподготовку проводили согласно международным стандартам и локальным регламентирующим документам; информационное сопровождение биообразцов осуществляли в соответствии с рекомендациями [10, 11].

Для проведения настоящего исследования было отобрано 169 биообразцов из 3 регионов РФ. Для анализа качества хранения биоматериала из общей региональной выборки (Вологда) случайным образом было отобрано 149 образцов сыворотки крови, хранящейся в Биобанке при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  в пробирках типа эппендорф с 2013–2014 гг по настоящее время, т.е. от 6 до 7 лет. По 10 образцов сыворотки крови из региональных выборок Тюмени и Иваново, собранных в 2014 г, были отобраны как размороженные на сутки при комнатной температуре и вновь замороженные при  $-40^{\circ}\text{C}$  и хранящиеся при этой температуре по настоящее время, т.е. всего 6 лет. Перед анализом все образцы размораживались в течение суток при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Во всех образцах определяли уровни общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), ХС липопротеинов низкой (ЛНП) и высокой плотности (ЛВП), аполипопротеинов (апо) А1 и апо В, С-реактивного белка (СРБ) высокочувствительным методом (вчСРБ), глюкозы, инсулина (только в образцах из Вологды, которые однократно размораживались) и тиреотропного гормона (ТТГ). Все лабораторные анализы исходно и в 2020 г выполнены с использованием одних и тех же приборов и тест-систем: показатели липидного профиля — на автоанализаторе Abbot Architect c8000 (США) прямыми ферментными методами; уровни апо А1 и апо В — иммунотурбидиметрическими методами, глюкозы — гексокиназным методом на этом же автоанализаторе; концентрацию инсулина и ТТГ измеряли иммунохемилюминесцентным методом на автоанализаторе Abbot Architect i2000SR (США).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакетов статистических программ STATISTICA 10.0 и SPSS 14.0. Для биохимических показателей, гипотеза о нормальном распределении которых не опровергалась с помощью критерия хи-квадрат, приведены среднее значение (Mean) и стандартное отклонение (SD). При отклонении распределения показателей от нормального данные представлены в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного размаха ( $Q_{25}; Q_{75}$ ), а также минимального (min) и максимального (max) значений. Гипотеза об отсутствии изменения концентрации биохимических показателей в плазме крови пациентов до и после хранения образцов проверялась с помощью парного  $t$ -критерия Стьюдента или его непараметрического аналога парного критерия Вилкоксона. Стабильность аналитов в процессе хранения оценивали, рассчитывая процент изменения от

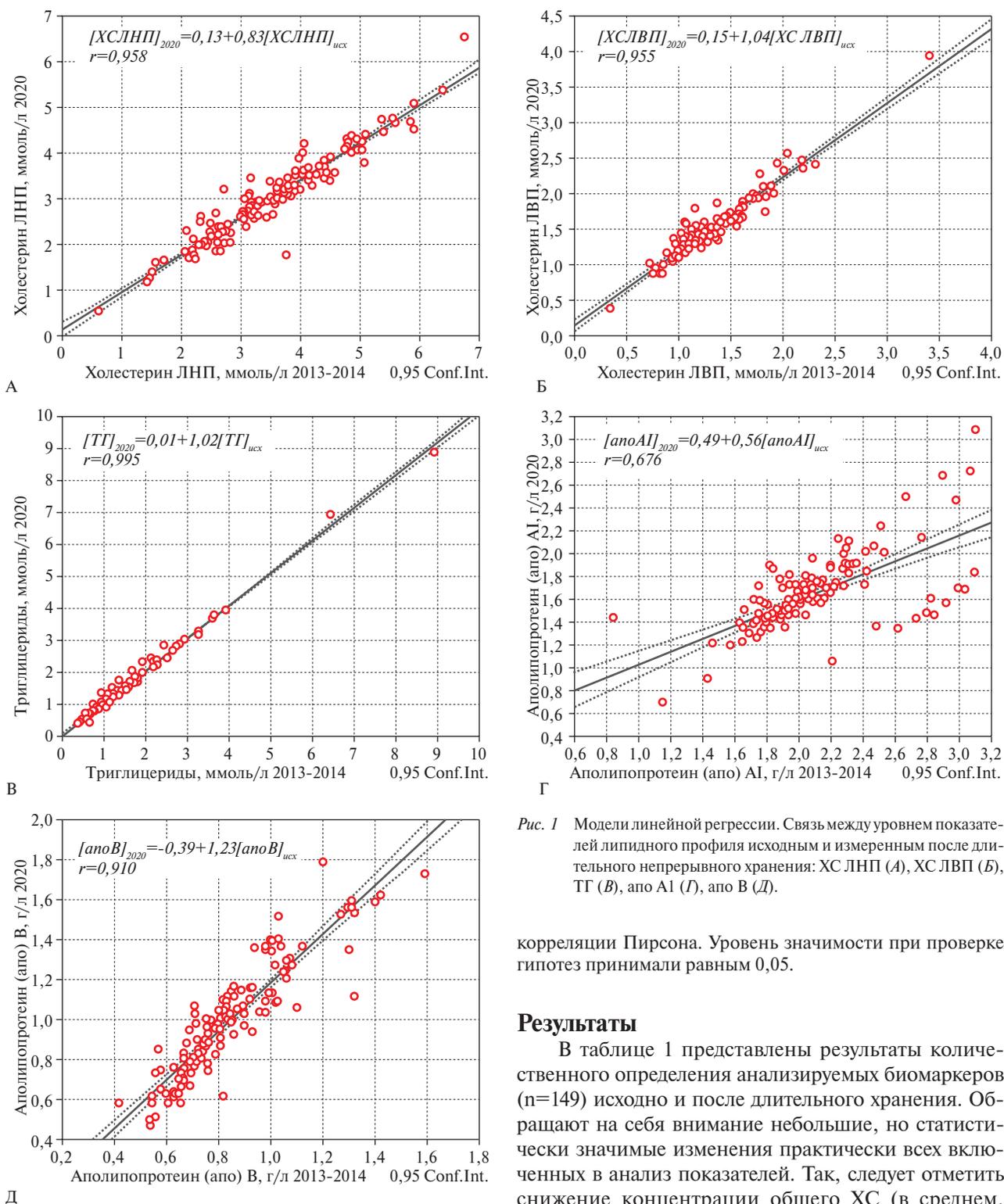


Рис. 1 Модели линейной регрессии. Связь между уровнем показателей липидного профиля исходным и измеренным после длительного непрерывного хранения: ХС ЛНП (А), ХС ЛВП (Б), ТГ (В), апо А1 (Г), апо В (Д).

корреляции Пирсона. Уровень значимости при проверке гипотез принимали равным 0,05.

## Результаты

В таблице 1 представлены результаты количественного определения анализируемых биомаркеров ( $n=149$ ) исходно и после длительного хранения. Обращают на себя внимание небольшие, но статистически значимые изменения практически всех включенных в анализ показателей. Так, следует отметить снижение концентрации общего ХС (в среднем, на 0,2 ммоль/л), ХС ЛНП (на 0,5 ммоль/л) и апо А1 (на 0,5 г/л). В то же время достоверно возросла концентрация ХС ЛВП (в среднем, на 0,2 ммоль/л), ТГ (на 0,1 ммоль/л), апо В (на 0,2 г/л), глюкозы (на 0,1 ммоль/л) и вчСРБ (на 0,3 мг/л). Уровень инсулина и ТТГ за время хранения не изменился.

В таблице 2 приведена концентрация исследуемых биомаркеров до и после длительного хранения, в течение которого образцы претерпели

исходных значений ( $\Delta\%$ ). Величину отклонения рассчитывали по формуле:  $[(C_{исх} - C_{2020}) / C_{исх}] \times 100\%$ , где  $C_{исх}$  — значение параметра, измеренное в начале исследования,  $C_{2020}$  — значение параметра, полученное в 2020г. Сравнение в двух независимых группах проводили с помощью теста Манна-Уитни. Для исследования связи между исходным уровнем биохимических показателей и измеренным после длительного хранения применяли модель парной линейной регрессии и вычисляли коэффициент

**Таблица 1**

Сравнение концентрации исследуемых показателей в сыворотке крови, измеренных исходно и в 2020гг (Mean±SD) в условиях непрерывного хранения (n=149)

Показатель	2013-2014гг	2020гг	p
Общий ХС, ммоль/л	5,41±1,15	5,17±1,10	0,0000
ХС ЛНП, ммоль/л	3,52±1,07	3,05±0,92	0,0000
ХС ЛВП, ммоль/л	1,32±0,35	1,53±0,38	0,0000
*ТГ, ммоль/л	1,14 [0,84; 1,62]	1,2 [0,86; 1,70]	0,0001*
апо А1, г/л	2,06±0,37	1,64±0,31	0,0000
апо В, г/л	0,84±0,27	0,99±0,27	0,0000
Глюкоза, ммоль/л	5,34±1,33	5,42±1,14	0,0026
вчСРБ, мг/л	3,17±6,20	3,47 ±6,37	0,0246
Инсулин, мкЕд/мл	9,46±5,81	9,24±5,76	0,7292
ТТГ, мкЕ/мл	1,89±1,89	1,87±1,84	0,4519

Примечание: для всех показателей (кроме ТГ) р-значения приведены для парного t-критерия Стьюдента; \* — р-значения приведены для параметрического критерия Вилкоксона; # — данные представлены в виде медианы [Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>] с округлением до четвертого знака после запятой.

**Таблица 2**

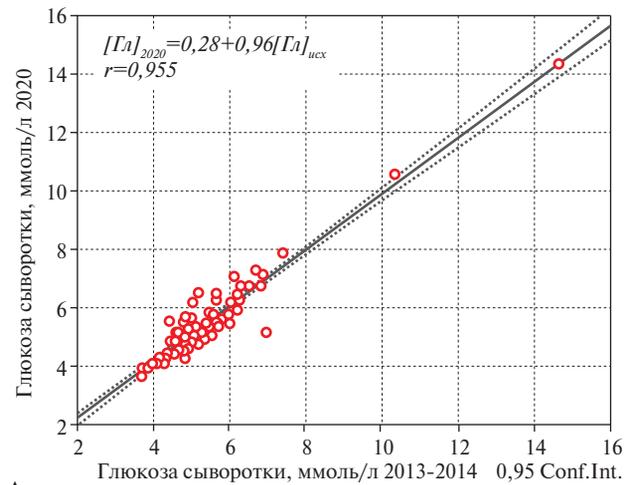
Сравнение концентрации исследуемых показателей в сыворотке крови, измеренных в исходно и в 2020гг (Mean±SD) в однократно размороженных образцах (n=20)

Показатель	2014 год	2020 год	p
Общий ХС, ммоль/л	5,48±1,38	4,90±1,27	0,0000
ХС ЛНП, ммоль/л	3,39±1,26	1,95±0,71	0,0000
ХС ЛВП, ммоль/л	1,40±0,38	1,36 ±0,36	0,5152
*ТГ, ммоль/л	1,31 [0,74; 1,54]	1,26 [0,72; 1,49]	0,0021*
апо А1, г/л	1,37±0,29	1,58±0,34	0,0001
апо В, г/л	0,80±0,30	0,97±0,30	0,0055
Глюкоза, ммоль/л	5,10±0,58	4,93±0,54	0,0114
вчСРБ, мг/л	2,43±1,66	2,31±1,46	0,1790
ТТГ, мкЕ/мл	1,55±0,78	1,35±0,76	0,0002

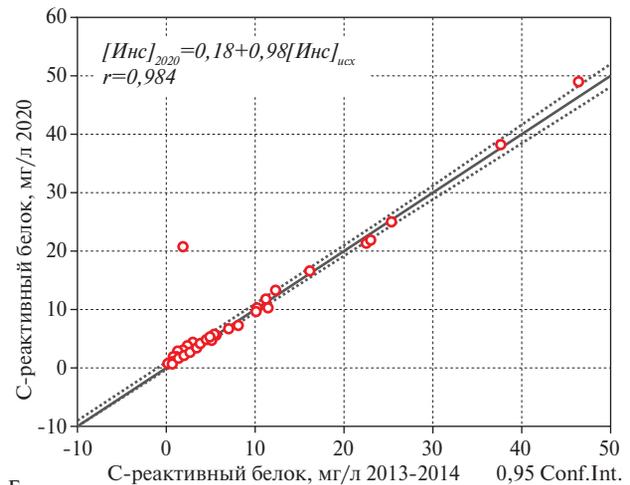
Примечание: для всех показателей (кроме ТГ) р-значения приведены для парного t-критерия Стьюдента; \* — р-значения приведены для параметрического критерия Вилкоксона; # — данные представлены в виде медианы [Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>] с округлением до четвертого знака после запятой.

однократное размораживание (n=20). Статистически значимо снизилась концентрация общего ХС (в среднем, на 0,6 ммоль/л) — за счет существенного снижения ХС ЛНП (на 1,4 ммоль/л), глюкозы (на 0,3 ммоль/л) и, в отличие от непрерывного хранения, ТТГ (на 0,2 мкЕ/мл). В отличие от непрерывного хранения при однократном размораживании биообразцов повысилась концентрация апо А1 (в среднем, на 0,2 г/л) и апо В (на 0,2 г/л).

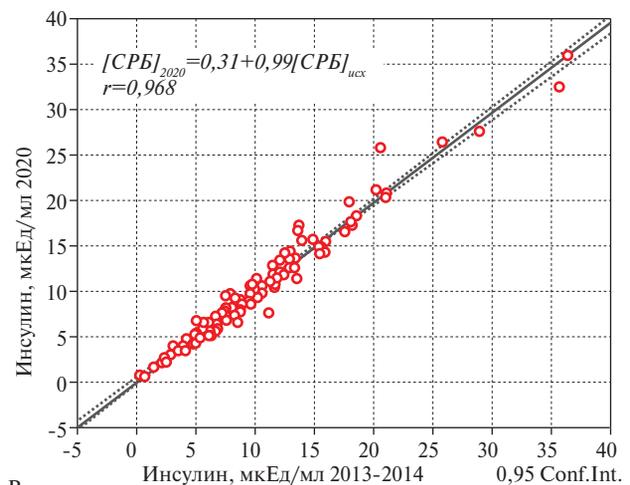
На рисунках 1 и 2 приведены результаты регрессионного анализа, демонстрирующие тесную положительную связь между исходным уровнем показателей липидного профиля (рисунок 1А-Д), а также глюкозы, инсулина и вчСРБ (рисунок 2А-В), и их уровнем, измеренным после длительного не-



А



Б



В

Рис. 2 Модели линейной регрессии. Связь между уровнем биохимических показателей исходным и измеренным после длительного непрерывного хранения: глюкоза (А), инсулин (Б), СРБ (В).

Примечание: Гл — глюкоза, Инс — инсулин.

прерывного хранения. Обращает на себя внимание несколько более низкий, но статистически значимый коэффициент корреляции для апо А1 (r=0,676), что может свидетельствовать о более ши-

Таблица 3

Сравнение различий в концентрациях исследуемых показателей в сыворотке крови (в %), измеренных исходно и в 2020г

Показатель	Непрерывное хранение (n=149)			Однократное размораживание (n=20)			p
	Me	Q <sub>25</sub> ;Q <sub>75</sub>	min; max	Me	Q <sub>25</sub> ;Q <sub>75</sub>	min; max	
Общий ХС	5,0	2,9; 8,2	-26,9; 28,9	10,3	6,2; 16,5	-0,9; 26,2	0,0005
ХС ЛНП	13,9	10,8; 17,0	-17,6; 52,1	44,4	40,1; 49,4	-85,4; 60,8	0,0005
ХС ЛВП	-15,6	-19,0; -10,6	-55,2; 4,4	4,7	-2,3; 8,9	-61,5; 21,8	0,0000
ТГ	-1,5	-5,2; 2,2	-40,2; 32,4	5,2	-0,02; 10,9	-11,5; 19,9	0,0000
апо АI	19,5	16,2; 23,0	-71,5; 51,8	-13,4	-22,4; -9,2	-30,1; 1,4	0,0000
апо В	-17,5	-24,9; -8,9	-50,2; 24,6	-11,8	-21,1; -8,5	-475,8; 7,9	0,3341
Глюкоза	-1,6	-3,8; 1,3	-26,7; 25,4	2,9	0,9; 6,6	-14,6; 15,9	0,0001
вчСРБ	-7,5	-29,0; -2,1	-937,9; 13,7	1,7	-4,9; 7,2	-50,0; 22,5	0,0001
Инсулин	0,0	-6,8; 6,2	-133,3; 31,3	-			
ТТГ	2,4	-21,9; 13,4	-275,5; 56,0	12,9	6,0; 17,7	0,0; 32,2	0,0000

Примечание: Δ% = (1 – концентрация показателя 2020/концентрация показателя 2012-2013) 100%; p-значения приведены для критерия Манн-Уитни с округлением до четвертого знака после запятой.

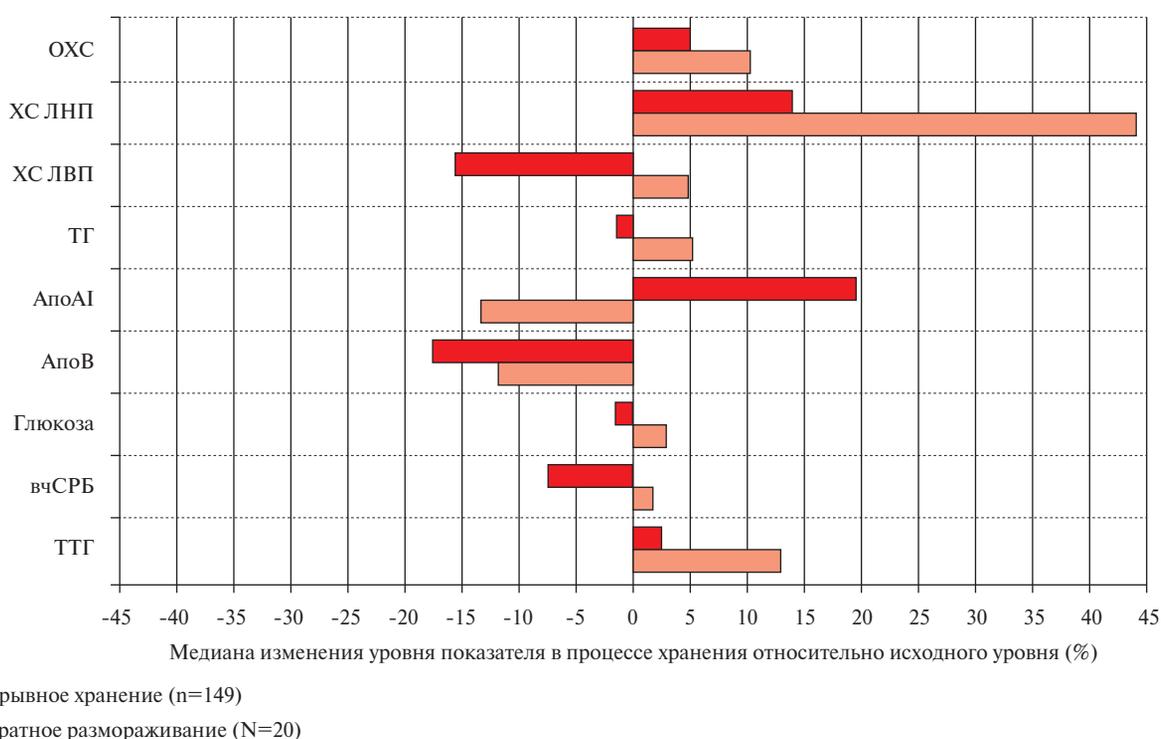


Рис. 3 Медиана изменения уровня показателя в процессе хранения относительно исходного уровня (%). Примечание: ОХС — общий ХС.

роком диапазоне вариации этого биомаркера в процессе длительного хранения.

В таблице 3 и на рисунке 3 представлены данные изменения уровней исследуемых показателей (Δ%) по сравнению с их исходным уровнем как в образцах непрерывного хранения, так и в пробах, которые однократно размораживались. Концентрация общего ХС снизилась в обоих случаях, но изменение было более выражено при однократном размораживании (5 vs 10,3%), что, в основном, было обусловлено существенным (на 44,4%) снижением уровня ХС ЛНП в образцах, которые однократно разморажива-

лись. Концентрация ХС ЛВП увеличилась на 15,6%, в образцах, которые хранились непрерывно, но несколько снизилась в однократно размороженных (на 4,7%). Различия между изменением в образцах, хранящихся непрерывно и однократно размороженных в таких показателях как ТГ, глюкоза, вчСРБ и ТТГ не были столь значительными.

### Обсуждение

В настоящей работе представлены результаты проведенного контроля качества хранения образцов сыворотки крови, полученных в ходе много-

центрового эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ и хранящихся в Биобанке с 2013-2014 гг при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Были проанализированы показатели, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ): общий ХС, ТГ, ХС ЛНП, ХС ЛВП, апо А1 и апо В, вчСРБ, глюкоза, инсулин, ТТГ.

Среди традиционных факторов риска ССЗ выделяют группу биомаркеров, определяемых как “липидный профиль”, позволяющих диагностировать нарушения в системе транспорта ХС в составе липопротеинов плазмы крови. Согласно данным одних авторов, большинство биомаркеров липидного профиля проявляют стабильность при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  [12]. Показано, что при хранении на  $-20^{\circ}\text{C}$  первоначальная концентрация ХС сохраняется до 5 лет, кроме того, этот показатель устойчив процедурам замораживания/оттаивания образцов сыворотки крови [13]. В то же время имеются противоположные данные, показывающие, что при длительном хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  концентрация ХС с течением времени увеличивается [14]; по сравнению с исходным значением (3,3 ммоль/л) через 1 год хранения концентрация ХС составляла 3,5 ммоль/л, через 7 лет — 4,6 ммоль/л, через 10 лет — 5,2 ммоль/л. В противоположность этому данные настоящего исследования свидетельствуют о снижении уровня ХС во время хранения, при этом при хранении однократно размороженных образцов снижение уровня общего ХС выражено в большей степени, и обусловлено значимым снижением концентрации ХС ЛНП при стабильном уровне ХС ЛВП.

Согласно данным литературы, концентрация ТГ при длительном хранении сыворотки крови при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  постепенно увеличивается, а при хранении при  $-70^{\circ}\text{C}$  остается неизменной, что фактически совпадает с данными авторов статьи, показавшими увеличение уровня ТГ всего на 1,5%. В то же время, в отличие от авторских данных, продемонстрировавших снижение (на 5,2%) уровня ТГ при однократном размораживании, в работах [2, 14, 15] показано, что после первого цикла замораживания/оттаивания при хранении на  $-196^{\circ}\text{C}$  концентрация ТГ изменяется, однако при хранении на  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 2-3 мес. отмечается их устойчивость к нескольким циклам замораживания/оттаивания.

В отличие от наших результатов, показавших некоторое повышение уровня ХС ЛВП (на 0,2 ммоль/л, или на 15,6%) в образцах сыворотки, хранившихся при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких лет, данные других авторов свидетельствуют о том, что концентрация ХС ЛВП при температуре при  $-70^{\circ}\text{C}$  остается неизменной, однако снижается при хранении на  $-20^{\circ}\text{C}$  [14]. При хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 2-3 мес. наблюдается устойчивость ХС ЛВП

к циклам замораживания/оттаивания, как и в случае с глюкозой, ТГ и общим ХС [15].

Относительно стабильности уровня апо А1 и апо В — основных белков ЛВП и ЛНП, соответственно, получены весьма разноречивые данные. Было показано, что при хранении цельной крови до 7 сут. при комнатной температуре концентрация апо А1 и апо В снижается на <4%. Уровни апо А1 и апо В остаются неизменными в плазме крови при  $-80^{\circ}\text{C}$  до 5 лет [16]. Согласно результатам настоящего исследования, при непрерывном хранении концентрация апо А1 снижалась на 19,5%, а в случае однократного размораживания и повторного замораживания образцов возрастала на 13,4%, тогда как концентрация апо В повышалась, в среднем, на 11,8-17,5% независимо от условий хранения.

По данным литературы, изменений в концентрации СРБ по сравнению со свежими образцами при длительном хранении образцов сыворотки как при  $-80^{\circ}\text{C}$ , так и в жидком азоте ( $-170^{\circ}\text{C}$ ) в течение 2-5 лет, обнаружено не было; кроме того, в парах жидкого азота концентрация СРБ оказалась даже выше, чем в параллельных образцах, хранящихся на  $-80^{\circ}\text{C}$  [8]. Хранение биообразцов при низких температурах обычно замедляет деградацию белков, поэтому длительное хранение образцов плазмы и сыворотки практически не влияет на уровень СРБ при хранении сроком >4 лет при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  [17].

В то же время концентрация СРБ уменьшалась с увеличением числа циклов замораживания/оттаивания (после первого цикла концентрация вчСРБ составляла 2,66 мг/л; после 3-го — 2,58 мг/л; 7-го — 2,43 мг/л; 10-го цикла — 1,89 мг/л) [8]. Однако в других источниках приводятся данные о нечувствительности концентрации СРБ к 7 циклам замораживания/оттаивания при условии хранения при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и стабильности до 9 циклов при хранении на  $-196^{\circ}\text{C}$  в жидком азоте [2]. Полученные результаты, показавшие стабильность уровня вчСРБ при однократном размораживании/оттаивании, согласуются с данными этих авторов [2]. Полагают, что подобные расхождения в данных могут быть вызваны различными условиями хранения, методами исследования и влиянием других преаналитических факторов [8].

Еще одним важным биохимическим показателем активности метаболических процессов в организме является уровень глюкозы крови. Глюкоза устойчива к длительному хранению при  $-70^{\circ}\text{C}$  [14], ее концентрация оставалась стабильной в процессе 6 циклов замораживания/оттаивания [2]. Об этом же свидетельствуют и результаты настоящей статьи: уровень глюкозы при хранении изменялся всего на 1,6% при непрерывном хранении и на 2,9% при однократном размораживании. Примечательно, что концентрация глюкозы чувствительна к отло-

женному центрифугированию и линейно снижается в образцах цельной крови с гепарином в течение >8 ч на 1,39 мг/дл/ч [2].

Концентрация инсулина и ТТГ, согласно представленным результатам, стабильна при непрерывном хранении; при однократном размораживании концентрация ТТГ незначительно (на 2,4%) снижается. Научных публикаций о стабильности инсулина и ТТГ к длительному хранению и циклам замораживания-оттаивания обнаружено не было [16].

Обсуждая факторы и условия хранения биообразцов, необходимо отметить, что существенное влияние на результаты количественного определения биохимических параметров крови оказывают оборудование и используемые аналитические методы. Чтобы нивелировать это влияние, использовали те же приборы и методы при измерении параметров исходно (2013-2014гг) и в настоящее время (2020г). Однако влияние реактивов нельзя исключить полностью, поскольку нет гарантии в поставке одной и той же партии реагентов в течение нескольких лет. Возможно, именно этот факт стал одной из основных причин, обнаруженных авторами достоверных, но, по-видимому, клинически незначимых отклонений в показателях, измеренных до и после длительного низкотемпературного хранения. Об этом, в частности, свидетельствуют накопленные к настоящему времени данные о том, что изменения в уровнях липидов, измеренных при заборе крови натощак и через 1-6 ч после еды, клинически незначимы и составляют: +0,3 ммоль/л для ТГ, -0,2 ммоль/л для ОХС и ХС ЛНП. На концентрацию ХС ЛВП, апо А1 и апо В состояние натощак/ненатощак не влияет. Кроме того, концентрации, измеренные натощак и ненатощак, одинаково изменяются во времени и сравнимы с точки зрения прогнозирования риска ССЗ [18]. Таким образом, экстраполируя данные о величине колебания уровня липидов, измеренных натощак и постпрандиально, на изменения, наблюдаемые в настоящем исследовании в процессе хранения биообразцов, которые варьировали примерно в таких же границах, можно заключить, что эти различия существенно не повлияют ни на диагностику дислипидемий, ни на клинические решения по их коррекции.

Особого внимания заслуживают результаты проведенного в настоящем исследовании регрессионного анализа (рисунки 1 и 2), продемонстрировавшие сильную положительную связь между параметрами, измеренными исходно и через 6-7 лет, что, во-первых, свидетельствует о высоком уровне сопоставимости значений, полученных в образцах до и после хранения, а во-вторых, с высокой степенью вероятности позволяет прогнозировать уровень того или иного показателя в ходе длительного хранения по его исходному значению. Этот факт убедительно свидетельствует о правомочности не-

прерывного длительного хранения образцов сыворотки крови и ее пригодности для проведения последующих анализов.

В то же время, как демонстрирует рисунок 3, вариации ни одного из показателей не превысили тот предел колебаний, в рамках которого они считаются приемлемыми (согласно характеристикам, разработанным Ricos, et al. еще в 1999г [19], и обновленным в 2014г и представленным на веб-сайте Westgard QC [20].

Таким образом, полученные результаты в совокупности с данными литературы свидетельствуют о неоднозначности вариаций уровней биохимических маркеров, наиболее часто определяемых в биомедицинских исследованиях. Очевидно, что применяемые в различных лабораториях (биобанках) методы получения биообразцов, их процессинга, транспортировки и хранения весьма схожи; более того, эти методы и подходы в значительной мере удовлетворяют требованиям высокого качества биообразцов. И хотя остается еще много вопросов, связанных с оптимизацией и гармонизацией исследований с применением биообразцов не только на национальном, но и на международном уровне [21], совершенно очевидно, что для обеспечения высокого качества биообразцов, точности и воспроизводимости результатов исследований с использованием биоматериала необходимо надлежащее соблюдение преаналитических условий, в т.ч. условий длительного хранения.

## Заключение

Впервые в России проведено проспективное когортное исследование, направленное на изучение стабильности образцов сыворотки крови человека в процессе их хранения в Биобанке и возможности оценки биохимических параметров, ассоциированных с ССЗ.

Полученные результаты свидетельствуют о правомочности длительного хранения биообразцов при  $-70^{\circ}\text{C}$  без размораживания.

Размораживание и повторное замораживание образцов во время хранения (даже однократное) недопустимо, поскольку приводит к статистически значимым изменениям ряда исследованных показателей, в т.ч. к выраженному снижению уровня ХС ЛНП. Учитывая тот факт, что именно уровень ХС ЛНП является мишенью липид-снижающей терапии, рекомендуется непрерывное низкотемпературное (не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ ) хранение образцов сыворотки крови, предназначенных для анализа этого показателя.

**Отношения и деятельность:** авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

1. Ellervik C, Vaught J. Preanalytical variables affecting the integrity of human biospecimens in biobanking. *Clin Chem*. 2015;61(7):914-34. doi:10.1373/clinchem.2014.228783.
2. Kang HJ, Jeon SY, Park J-S, et al. Identification of Clinical Biomarkers for Pre-Analytical Quality Control of Blood Samples. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(2):94-100. doi:10.1089/bio.2012.0051.
3. A guide to qualify your clinical samples. <https://www.findmyassay.com/> (15.08.2020).
4. Sivakova OV, Pokrovskaya MS, Efimova IA, et al. Quality control of serum and plasma samples for scientific research. *The Russian Journal of Preventive Medicine*. 2019;22(5):91-7. (In Russ.) Сивакова О. В., Покровская М. С., Ефимова И. А. и соавт. Контроль качества образцов сыворотки и плазмы крови для научных исследований. *Профилактическая медицина*. 2019;22(5):91-7. doi:10.17116/profmed20192205191.
5. Chen WC, Kerr R, May A, et al. The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30°C. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(2):106-13. doi:10.1089/bio.2017.0050.
6. Kisand K, Kerna I, Kumm J. Impact of Cryopreservation on Serum Concentration of Matrix Metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, Vascular Growth Factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank Samples. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(2):229-35. doi:10.1515/CCLM.2011.049.
7. Lee J-E, Kim SY, Shin S-Y. Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples. *Osong Public Health Res Perspect*. 2015;6(6):357-62. doi:10.1016/j.phrp.2015.11.005.
8. Bünger S, Klempt-Giessing K, Toner V, et al. A Novel Multiplex-Protein Array for Serum Diagnostics of Colorectal Cancer: Impact of Pre-Analytical Storage Conditions. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(6):379-86. doi:10.1089/bio.2013.0050.
9. Boytsov SA, Chazov EI, Shlyakhto EV, et al. Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia (ESSE-RF). The rationale for and design of the study. *Preventive Medicine*. 2013;16(6):25-34. (In Russ.) Бойцов С. А., Чазов Е. И., Шляхто Е. В. и др. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования. *Профилактическая медицина*. 2013;16(6):25-34.
10. Moore HM, Kelly A, Jewell SD, et al. Biospecimen reporting for improved study quality. *Biopreserv Biobank*. 2011;9(1):57-70. doi:10.1089/bio.2010.0036.
11. Sivakova OV, Pokrovskaya MS, Metelskaya VA, et al. International rules for description of biospecimens are an important factor in improving the quality of researches. *The Russian Journal of Preventive Medicine*. 2019;22(6):91-7. (In Russ.) Сивакова О. В., Покровская М. С., Метельская В. А. и др. Международные правила описания биообразцов — важный фактор повышения качества научных исследований. *Профилактическая медицина*. 2019;22(6):95-9. doi:10.17116/profmed20192206295.
12. Evans K, Mitcheson J, Laker MF. Effect of Storage at -70°C on Lipid, Lipoprotein and Apolipoprotein Concentrations. *Clin Chim Acta*. 1997;258(2):219-29. doi:10.1016/s0009-8981(96)06458-3.
13. Kuchmak M, Taylor L, Olansky AS. Suitability of Frozen and Lyophilized Reference Sera for Cholesterol and Triglyceride Determinations. *Clin Chim Acta*. 1982;120(2):261-71. doi:10.1016/0009-8981(82)90163-2.
14. Yu R, Dan Y, Xiang X. Stability of Chronic Hepatitis-Related Parameters in Serum Samples After Long-Term Storage. *Biopreserv Biobank*. 2017;15(3):211-9. doi:10.1089/bio.2016.0043.
15. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The Effect of Storage Time and Freeze-Thaw Cycles on the Stability of Serum Samples. *Biochem Med*. 2013;23(1):70-7. doi:10.11613/bm.2013.009.
16. Clark S, Youngman LD, Palmer A, et al. Stability of Plasma Analytes after Delayed Separation of Whole Blood: Implications for Epidemiological Studies. *Int J Epidemiol*. 2003;32(1):125-30. doi:10.1093/ije/dyg023.
17. Waateringe RP, Muller AC, Kobold AC, et al. Influence of Storage and Inter- and Intra-Assay Variability on the Measurement of Inflammatory Biomarkers in Population-Based Biobanking. *Biopreserv Biobank*. 2017;15(6):512-8. doi:10.1089/bio.2017.0001.
18. Nordestgaard BG, Langsted A, Mora S, et al. Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points. A joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J*. 2016;37(25):1944-58. doi:10.1093/eurheartj/ehw152.
19. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current Databases on Biologic Variation: Pros, Cons and Progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59(7):491-500. doi:10.1080/00365519950185229.
20. Westgard QC. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra-and inter-individual biological variation. Available at: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
21. Lermen D, Gwinner F, Bartel-Steinbach M, et al. Towards Harmonized Biobanking for Biomonitoring: A Comparison of Human Biomonitoring-Related and Clinical Biorepositories. *Biopreserv Biobank*. 2020;18(2):122-35. doi:10.1089/2019.0092.