

С.Б. Шустов, Ю.Ш. Халимов,
В.В. Салухов, Г.Е. Труфанов

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ТОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В ЭНДОКРИНОЛОГИИ

РУКОВОДСТВО ДЛЯ ВРАЧЕЙ

3-е издание, переработанное и дополненное



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2017

МЕТОДЫ И ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ И ТОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В ЭНДОКРИНОЛОГИИ

1.1. МЕТОДЫ И ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ЭНДОКРИННОЙ ФУНКЦИИ

Современная лабораторная оценка функционального состояния эндокринных желез включает:

- определение уровня гормонов или их регуляторных факторов (глюкоза, кальций) в плазме и сыворотке крови;
- проведение функциональных проб;
- исследование экскреции гормонов или их метаболитов с мочой;
- определение скорости секреции гормонов;
- изучение гормон-рецепторных взаимоотношений и тканевых гормональных эффектов.

Каждый из перечисленных подходов можно использовать отдельно или в различных сочетаниях, что диктуется конкретной клинической ситуацией, оснащенностью и техническими возможностями лаборатории, а также наличием обученного медицинского персонала.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ГОРМОНА В КРОВИ

Определение уровня гормона в крови является основным и наиболее важным способом оценки эндокринной функции. Широкое применение гормональных исследований в клинической практике стало возможным после разработки в 1960 г. Р. Ялоу (R. Yalow) и С. Берсоном (S. Berson) радиоиммунологического метода, который, по сути, совершил переворот в медицине и биологии, так как позволил с высокой точностью определять минимальные концентрации биологически активных веществ в крови. Открытие принципа радиоиммунологического анализа (РИА) положило начало разработке целого ряда новых методик исследования, основанных на конкурентном связывании определяемого вещества с меченым антигеном или антителом и получивших в связи с этим общее название *методов связывания (конкурентное белковое связывание, сатурационный анализ)*. В отличие от биологических методов применявшихся ранее, методы связывания дали возможность судить о количестве анализируемого вещества не по его биологической (функциональной) активности, а по количеству комплекса, образовавшегося при взаимодействии исследуемого

вещества со связывающим агентом. Этот факт определил их большую чувствительность, специфичность и точность.

Принципиальной основой сатурационного анализа является конкурентное связывание определяемого вещества (немеченый лиганд) и идентичного ему меченого лиганда со специфической связывающей системой (связывающий агент, биндер) (рис. 1.1). Связывающий агент вступает в равноправное взаимодействие как с лигандом (искомым веществом), так и с его меченым аналогом, связываясь с ними в количествах, пропорциональных их исходным концентрациям (по закону действующих масс). Следовательно, чем выше содержание искомого вещества в пробе, тем меньшая часть его меченого аналога свяжется с биндером. При этом, зная количество связывающего агента и меченого лиганда, концентрация которых является величиной постоянной, можно рассчитать концентрацию искомого вещества. Обычно комплекс лиганд–связывающая система выпадает в осадок, а несвязанная часть меченого аналога остается в надосадочной жидкости.

Для обеспечения конкуренции меченого и немеченого лиганда за связывающие места количество меченого лиганда должно превышать связывающую способность биндера. Отделив комплекс антиген–антитело от несвязавшегося лиганда и измерив остаточную радиоактивность пробы, можно определить и количество связавшегося меченого лиганда (обратно пропорциональное содержанию в пробе искомого вещества).

Для этого одновременно проводится серия анализов определяемого вещества, концентрация которого известна (стандартные разведения). На основании концентрации строится *калибровочная кривая* — график зависимости изменения связывающей активности пробы от содержания в ней искомого вещества. Сопоставление активности исследуемых проб и проб с известной концентрацией искомого вещества позволяет определить концентрацию последнего.

Используемые в настоящее время в эндокринологии методы связывания различаются по типу связывающего агента и метки.

Методы связывания, в которых используется радионуклидная метка, называются **радиоконкурентными методами**. В связи с тем, что все этапы такого анализа проводятся не в организме больного, а в пробирке с биологическим материалом, данные методы получили также название *радиотестирования in vitro*. Среди них для определения уровня гормонов в крови и других биологических жидкостях наибольшее распространение получил *радиоиммунологический анализ*, в котором функции связывающего агента выполняют специфические антитела.

Среди других методик, основанных на радиоконкурентном связывании, следует отметить *иммунорадиометрический анализ*, в котором меченым является не лиганд, а связывающие антитела; *радиорецепторный анализ*, основанный на использовании в качестве связывающей системы вместо антител специфич-

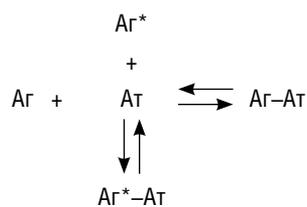


Рис. 1.1. Схема реакции связывания антиген–антитело на примере радиоиммунологического анализа: Ag^* — меченый антиген (лиганд); Ag — искомое вещество (немеченый лиганд); At — специфическое связывающее антитело

ческих тканевых рецепторов; белково-конкурентный анализ, в котором связывающей системой являются не антитела, а специфические белковые носители гормонов (например, тироксин- или тестостеронсвязывающий глобулин).

При определении уровня гормонов и других биологически активных веществ в методах связывания в качестве метки могут использоваться флуоресцирующее вещество (*иммунофлуоресцентный метод* или *флюороиммунный анализ*), а также фермент (*иммуноферментный анализ*).

Радиоиммунологический анализ

Необходимыми компонентами для **радиоиммунологического анализа (РИА)** являются проба, меченый антиген, антисыворотка (антитела), реагенты, ответственные за разделение связанного комплекса от несвязавшихся компонентов, растворы, обеспечивающие оптимальное прохождение реакции, и так называемые стандарты.

Исследуемая проба обычно является отцентрифугированной плазмой или сывороткой крови и, реже, другими биологическими субстратами (спинно-мозговая жидкость, моча, слюна и т. д.). Условия получения и хранения проб оговариваются особо в зависимости от вида исследования.

Меченый антиген — искусственно синтезированный или полученный биологическим методом гормон либо другое биологическое вещество, идентичное определяемому, которое метится радиоизотопами. Метка не должна изменять иммунореактивность антигена. Другие требования к метке — должна быть прочной, иметь высокую удельную радиоактивность. В наибольшей степени указанным требованиям отвечают ^{125}I (для белков и пептидов, имеющих в своем составе аминокислоты тирозин или гистидин) и ^3H (для других гормонов). Метка ^{125}I менее прочна по сравнению с тритиевой меткой, но более проста для радиометрии. Антигены, меченные ^3H , дольше сохраняются, но требуют более сложных средств для радиометрии — жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Антитела представляют собой γ -глобулины, которые получают путем иммунизации животных (кролики, морские свинки, крысы и др.) специфическими антигенами, аналогичными искомому веществу. Поскольку антигенные свойства прямо пропорциональны молекулярной массе вещества, то при использовании гормонов (например, тиреоидных и стероидных гормонов), не обладающих антигенными свойствами из-за малой молекулярной массы (*гантины*), предварительно проводят их конъюгирование с молекулами-носителями [бычьим альбумином, тиреоглобулином (ТГ) и др.]. Соотношение гаптена и носителя при этом должно быть по возможности наименьшим (не более 1:15).

Сравнительная характеристика основных *способов разделения* комплекса антиген—антитело от несвязавшихся компонентов при проведении радиоконкурентных методов представлена в табл. 1.1.

Растворы, необходимые для РИА, обычно являются солевыми или буферными, предназначенными для поддержания pH системы на протяжении исследования. *Стандарты* представляют собой пробы, содержащие известные, последовательно возрастающие концентрации антигена (искомого гормона), и используемые для построения калибровочной кривой.

Таблица 1.1

**Основные методы разделения свободных и связанных антигенов,
используемых в радиоиммунологическом анализе**

Метод	Вещество, материал	Преимущества	Недостатки
Адсорбция свободной фракции	Активированный уголь, ионнообменные смолы, тальк, двуокись кремния	Простота, скорость, низкая стоимость, стабильность реагентов	Зависимость от концентрации белка, недостаточная специфичность
Осаждение связанной фракции	Органические соединения: этанол, диоксан, полиэтиленгликоль. Соли: сульфат аммония, сульфат магния	Простота, скорость, низкая стоимость, стабильность реагентов	Низкая специфичность, зависимость от концентрации белка, возможный эффект вторичного растворения комплекса Ag–Ат
Метод твердой фазы	Антитела, прикрепленные или ковалентно связанные с пробирками, гранулами, дисками. Антитела, присоединенные к твердой матрице	Простота, скорость, возможность автоматизации	Необходимость получения большого количества антител, возможное неспецифическое связывание, сложность присоединения антител к твердой фазе
Метод двойных антител	Специфические антиглобулины	Специфичность и полное разделение свободной фракции от связанной, мягкое осаждение, не разрушающее комплекс Ag–Ат	Сложность получения вторых антител, длительность инкубации, возможность перекрестных реакций

Примечание: Ag — антиген; Ат — антитело.

При проведении любого радиоконкурентного анализа выделяют четыре этапа:

- 1) смешивание исследуемой пробы с меченым антигеном и антисывороткой в присутствии буферного раствора;
- 2) инкубация — период времени, в течение которого происходит иммунохимическая реакция (продолжительность этого этапа зависит от вида исследования и может длиться от 1 ч до 2 сут);
- 3) разделение связанного и несвязанного антигенов;
- 4) радиометрия проб и математическая обработка данных.

Радиометрические устройства соединяются с компьютером и печатающим устройством, позволяющими автоматизировать процесс получения конечных результатов исследования.

К основным *преимуществам* РИА и других методов радиоконкурентного связывания относятся их высокая чувствительность, приблизительно равная 10^{-12} г (для сравнения, чувствительность биохимических тестов не превышает 10^{-9} г); специфичность, то есть способность системы измерять только одну, строго определенную субстанцию; надежность — способность определять истинное количество вещества; точность, которая заключается в воспроизводимости

полученных результатов; доступность для автоматизации всего процесса — от пипетирования до обработки полученных результатов.

Основным организационным *недостатком* этих методов является необходимость специальной лаборатории для работы с радиоактивными материалами и более дорогостоящей аппаратуры и реактивов, а также целесообразность их применения, по экономическим соображениям, лишь при больших сериях проб, что снижает стоимость исследования и увеличивает эффективность использования аппаратуры. В связи с этим лаборатории, применяющие РИА, должны обслуживать достаточно большое количество лечебных учреждений.

Иммуноферментный анализ

Как указывалось выше, особенностью данного метода, в отличие от других методов связывания, является использование в качестве метки фермента, конъюгированного с антигеном или антителом. Применяемые для **иммуноферментного анализа (ИФА)** высокоочищенные ферменты должны обладать высокой активностью и стабильностью. Такими свойствами обладают пероксидаза, β -галактозидаза, щелочная фосфатаза, малатдегидрогеназа и некоторые другие ферменты. Наибольшее распространение в качестве фермента-маркера получила пероксидаза из хрена, что объясняется ее высокой окислительной способностью наряду с доступностью и низкой стоимостью получения.

ИФА, в котором необходимо разделение свободной и связанной с ферментом фракции антигенов (антител), называют *гетерогенным*. Для такого разделения используются антитела (антигены), иммобилизованные на нерастворимом носителе (целлюлозе, сефадексе, полистирене и др.) или на поверхностях пробирок, лунок микроплат, силиконовых трубок, шариков. При гетерогенном ИФА определение веществ белковой природы может осуществляться *прямым* способом, когда меченое антитело связывается непосредственно с антигеном, или *непрямым*, при использовании конъюгата антитело—фермент («вторые антитела») к первым антителам. *Гомогенный ИФА* не требует разделения свободных и связанных меченых молекул и используется в основном для определения гаптен. Определенный гаптен связывается ковалентной связью с молекулой фермента вблизи его активного центра. При специфическом связывании такого комплекса с антителами к гаптenu происходит ингибирование или активация каталитической активности фермента. Количественные измерения веществ в ИФА основаны на определении активности ферментов (после добавления в иммунохимическую систему субстратов, специфических для данных ферментов) калориметрическими методами или путем измерения теплового эффекта ферментативной реакции.

Флюороиммунный анализ

Флюороиммунный анализ (ФИА) основан на использовании явления люминесценции (флуоресценции) для исследования реакции антиген—антитело, происходящей на поверхности клеток или в срезах тканей. Локализация изучаемого антигена (антитела) устанавливается по специфической флуоресценции в месте реакции антиген—антитело после предварительной обработки