

УДК 573.6.086.83:57.083.3

Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования

Н.В. Пивень

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Immunochemical analysis: scientific basics, tendencies of development and possibilities of practical use

N.V. Piven

Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Аннотация

В настоящем обзоре приводятся сведения по анализу результатов собственных исследований, связанных с разработкой научных основ, технологии новых средств радиоиммунного, иммуноферментного, иммунобиосенсорного и др. видов современного иммунохимического анализа концентраций различных биорегуляторов, патологических субстанций, иммуномодулирующих и др. молекул и научно-обоснованной методологии их использования в медицинской практике при патологии различного (аутоиммунного, эндокринного, аллергического, онкологического) генеза. Освещены современные тенденции развития и практического использования методов современного иммунохимического анализа.

Ключевые слова

Иммунохимический анализ, антитела, иммунобиотехнология, диагностика, патогенез, практическое использование

В начале 80-х годов с целью ликвидации зависимости отечественного здравоохранения от импорта РИА-наборов (именно они были первыми среди средств иммунохимического анализа - ИХА) и в соответствии с постановлениями директивных органов Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ИБОХ НАН Б) был назначен головной организацией в стране по этой проблеме и ему было поручено создать научные основы, разработать соответствующие технологии и организовать

Summary

In the present review there are listed data on the analysis of proper research results connected with the elaboration of scientific basics, technologies of new means of radioimmune, immunoenzyme, immunobiosensor and other kinds of modern immunochemical analysis of various bioregulators, pathologic substances, immunomodulating and other molecules, and scientific-grounded methodology of their use in medical practice under different pathologies (of autoimmune, endocrine, allergic, oncological genesis). Up-to-date tendencies in the development and practical use of modern immunochemical methods are highlighted.

Keywords

Immunochemical analysis, antibodies, immunobiotechnology, diagnostics, pathogenesis, practical use

опытно-промышленный выпуск первых отечественных радиодиагностических наборов. Широкое внедрение методов ИХА в практику здравоохранения сдерживалось тогда не только отсутствием в стране производства радиодиагностических наборов для анализа различных биорегуляторов, но и отсутствием научных разработок, направленных на создание соответствующих технологий.

В настоящем обзоре изложены основные результаты научных исследований в хроноло-

гическом порядке, начиная с первых разработок по созданию отечественных радиодиагностических наборов для анализа белково-пептидных, стероидных и тиреоидных гормонов, некоторых белков и опухолевых маркеров, включая разработку методологии получения антител к веществам различной природы для целей ИХА, и завершая освещением ряда проблем современного ИХА и его модификаций (иммуноферментного – ИФА, иммунофлюоресцентного – ФИА, иммунобиосенсорного и др. видов ИХА) и основных принципов научно-обоснованной методологии их использования в медицинской практике.

1. Получение антисывороток для иммунохимического анализа

На первых этапах исследований было важно разработать методологию получения антител, пригодных для ИХА регуляторных белков, опухолевых маркеров, белково-пептидных, стероидных и тиреоидных гормонов и на их основе создать аналитические тест-системы, а затем организовать промышленный выпуск первых отечественных радиодиагностических наборов.

Специфические антисыворотки (антитела) являются основным компонентом любой системы иммуноанализа, а характеристики используемых антител, такие как специфичность и аффинность, во многом определяют основные параметры разработанных на их основе аналитических тест-систем. Получение антисывороток для целей ИХА представляет собой достаточно сложную задачу, успешное решение которой зависит от природы и свойств иммуногена, вида используемого адьюванта, схемы иммунизации, способа введения антигена, его оптимальной дозы и т.д. Многочисленные литературные сообщения, в основном, сводятся к описанию успешных примеров в получении антител против того или иного антигена, а различия при экспериментальном сравнении методик между собой, как правило, пытаются объяснить различиями в индивидуальном ответе иммунизируемых животных. Результаты многолетней экспериментальной работы по получению специфических антисывороток, пригодных для ИХА белково-пептидных, тиреоидных и стероидных гормонов, опухолевых маркеров и регуляторных белков, позволили нам провести анализ закономерностей и фактов, влияющих как на процесс образова-

ния антител, так и на их аналитические параметры [1]. На некоторых аспектах этой проблемы хотелось бы остановиться.

Иммуноген. Основным критерием при использовании антисыворотки в любом иммунохимическом методе является ее специфичность. Этот параметр связан прежде всего с химической чистотой иммуногена, который до сих пор не получил однозначного толкования. С одной стороны, существование примесей в препаратах антигена вызывает появление антител и к этим компонентам, а, с другой стороны, каждая стадия очистки может приводить к химическим изменениям в молекуле антигена, следствием чего будет выработка антител новой специфичности, которые на большей или меньшей протяженности перестают узнавать свой антиген. Нами накоплен значительный опыт по использованию высокоочищенных антигенов при иммунизации животных с целью получения соответствующих антител. Так был разработан метод получения противоинсулиновых антител с улучшенными аналитическими параметрами при использовании высокоочищенных препаратов инсулина [2,3] и антител к ряду белковых антигенов - плацентарному лактогену - ПЛ, тироксинсвязывающему глобулину - ТСГ, раково-эмбриональному антигену - РЭА и тиреоглобулину - ТГ [4-6]. Высокая степень чистоты иммуногена, на наш взгляд, позволяет не только исключить перекрестные реакции антисыворотки, но и (даже в тех случаях, когда кросс-реактивность не важна) избежать антигенную конкуренцию, которая может препятствовать образованию некоторых специфических антител [7].

Иммуногенность - способность антигена вызывать продукцию антител или другие иммунные реакции, находится, как правило, в прямой зависимости от их молекулярной массы. Вещества с молекулярной массой менее 800 (к ним, в частности, относятся стероидные и тиреоидные гормоны) вообще не иммуногенны, однако, становятся таковыми после присоединения их в качестве гаптенов к более крупным молекулам, например, высокомолекулярным белкам. Трудность получения антител к ним связана с тем, что эти соединения часто являются обычными для организма метаболитами, не имеющими ни видовой специфичности, ни собственной иммуногенности. Кроме того, низкое содержание их в биологических жидкостях, а также наличие боль-

шого числа структурно-родственных соединений предъявляет особые требования к аффинности и специфичности получаемых антисывороток. В качестве иммуногенов нами были использованы конъюгаты стероидных и тиреоидных гормонов с белками-носителями (человеческим - ЧСА, или бычьим сывороточным альбумином - БСА) с различной плотностью посадки гаптена на молекулу носителя. Было показано, что иммуногенность конъюгатов «гаптен-носитель» зависит от положения и стереохимии гаптена (именно эти факторы определяют специфичность получаемых антител); молярного соотношения гаптен-носитель; типа и длины мостика между носителем и гаптенем; природы и свойств носителя; способа химического присоединения гаптена к молекуле носителя; способа и продолжительности периода иммунизации [8].

До сих пор не установлена четкая корреляция между молярным соотношением компонентов конъюгата и специфичностью, активностью и аффинностью получаемых антител. Некоторые авторы считают наиболее эффективным молярное соотношение гаптен:носитель 12-30 : 1 [9], другие - 1:1 [10]. Нами разработан метод получения антисывороток с улучшенными аналитическими параметрами к стероидным и тиреоидным гормонам, при котором при иммунизации были использованы конъюгаты этих гормонов с белками с высокой (30-50 моль на 1 моль белка) эпитопной плотностью посадки, и тем самым показана возможность использования высоковалентных конъюгатов для получения антисывороток к гормонам [11].

Второй аспект этого вопроса связан с выбором носителя для конъюгирования его с гаптенем, который сам бы вызывал наиболее эффективно интенсивный синтез антител у иммунизируемых животных. Нами разработан новый способ получения антисывороток к гормонам стероидного и тиреоидного профиля [11, 12], отличительной особенностью которого является применение чередующихся введений гормонов, конъюгированных с различными белками-носителями (БСА, ЧСА) в сочетании с высокой валентностью конъюгата, результатом чего явилось получение высокоактивных антисывороток, обладающих строгой специфичностью и высокой аффинностью.

И, наконец, третий аспект - способ химического соединения гаптена с носителем, который существенно влияет на иммуноген-

ность конъюгата. Так, сравнительный анализ результатов по получению антипрогестероновых иммунных сывороток с помощью конъюгатов, в которых связь с гаптенем осуществлялась через С3- и С11-положение, показал, что специфичность антител была выше при использовании конъюгатов, в которых носитель присоединен к гаптenu через положение С11. В этом положении молекула стероида удалена на длину четырех углеродных атомов и, по нашему мнению, связь гаптена с носителем через короткий химический мостик приводит к получению более специфичных антисывороток.

Часть наших экспериментов была связана с изучением влияния дозы иммуногена на динамику продукции и характеристики антисывороток, так как сведения по этому вопросу достаточно противоречивы, несмотря на их многочисленность. Параллельная иммунизация кроликов разными дозами РЭА (10 и 100 мкг) показала, что доза 10 мкг недостаточна для стимуляции удовлетворительного иммунного ответа: кролики продуцировали антитела с титрами в 4-5 раз меньшими по сравнению с животными, которым антиген вводился в дозе 100 мкг [13]. Применение больших доз не приводило к повышению эффективности результата. Получение хороших результатов при еженедельном введении иммуногена в больших дозах следует рассматривать как описание в литературе успешных примеров, но, в целом, такой подход не может быть рекомендован. На наш взгляд, эффективная доза, как правило, ниже общепринятой и для кроликов и морских свинок равна 100 мкг на первое введение. Последующие введения антигена предусматривают использование доз, равных половине первоначальной [14]. Использование слишком высоких и слишком низких доз нежелательно не только потому, что может вызвать состояние толерантности у животных, но и потому, что может приводить к продукции антител с низкой аффинностью в силу стимуляции лимфоцитов, несущих низкоаффинные рецепторы.

Адьювант. Нами проведен сравнительный анализ действия адьювантов различной природы (в том числе и препаратов микробных клеток) - неспецифических стимуляторов иммунных реакций - на аналитические параметры и динамику продукции антител. Изучение основных аналитических параметров антител (специфичность, аффинность, связывающая способность с антигеном - титр) к

целому ряду белковых антигенов и гаптенов, полученных с использованием коклюшной моновакцины (*B. pertussis*), которая по сведениям некоторых авторов обладает высокой адьювантной активностью [15], выявило ряд существенных преимуществ такого подхода. В серии экспериментов при получении антисывороток было обосновано введение низких доз иммуногена в сочетании с вакцинами типа АКДС и БЦЖ, что оказалось не менее эффективным при проведении иммунизации, чем многократная иммунизация с применением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) [14]. Важно и соотношение объемов антигена и адьюванта. На примере получения антител к тестостерону было показано, что применение 2-х объемов ПАФ на один объем водного раствора антигена оказалось более эффективным, чем общепринятое соотношение 1:1. Наш многолетний опыт работы с веществами различной природы доказал преимущества использования сочетаний различных адьювантных систем: полного (неполного) адьюванта Фрейнда и вакцин типа БЦЖ, АКДС, *b.pertussis*; адьюванта Фрейнда и гидроокиси алюминия; чередований введений иммуногена, иммобилизованного на сефарозе, активированной бромистым цианом, с введением антигена на гидроокиси алюминия и т.д. [12, 16, 17].

Однако, немаловажным обстоятельством на пути получения хороших результатов являются и индивидуальные особенности животных. Иммунореактивность животных генетически детерминирована [18], поэтому животных с неудовлетворительными характеристиками получаемых антител следует выводить из эксперимента. Однако, такое решение в некоторых случаях можно принять лишь через несколько месяцев иммунизации, так как «трудные» иммуногены иногда не сразу вызывают интенсивный иммунный ответ, а хорошие продуценты антител могут быть затем не лучшими.

Режим иммунизации. Для получения специфических антисывороток к белковым антигенам нами были использованы различные схемы иммунизации, которые различались между собой дозой, способом и местом введения иммуногена, типом адьюванта, длительностью процесса иммунизации. Перед иммунизацией обязательно проведение иммунохимической идентификации каждого антигенного препарата методом антигенного иммунодиффузионного анализа с помощью стандартных (контрольных) тест-систем [7]. Для

низкомолекулярных соединений (стероидных и тиреоидных гормонов) в ходе предварительных экспериментов устанавливали оптимальную плотность посадки каждого гаптена на молекуле белка-носителя (валентность конъюгата), т.к. нами установлено влияние плотности посадки гаптенов на белках-носителях как на процесс количественного накопления антител, так и на их специфичность. Изучение перечисленных аналитических параметров антисывороток в процессе иммунизации позволило сделать еще один важный вывод: значения специфичности, аффинности и титров антител меняются в динамике иммунизации, что предъявляет особые требования к их контролю при каждом цикле иммунизации и очередном заборе крови. Чередование высокой и низкой аффинности антител в течение периода иммунизации связывают с различиями в строении активных центров антител разных классов и подклассов иммуноглобулинов [18]. Результатом наших экспериментов явилась разработка оптимальных схем иммунизации для получения высокоспецифичных и высокоаффинных иммунных сывороток, пригодных для целей радиоиммунного и других родственных типов анализа. В качестве примеров приведем некоторые из них.

Антисыворотка к инсулину. При разработке метода получения противоинсулиновых антител был предложен новый экспериментальный подход, отличительной особенностью которого является использование при иммунизации морских свинок чередования двух адьювантных депонирующих соединений: инсулин – ПАФ и инсулин-бром-циан-сефароза (или инсулин - гидроокись алюминия). Такой методический подход позволил получить антисыворотки с улучшенными аналитическими параметрами: перекрестная реакция с проинсулином была не более 10%, глюкагоном - 0,3%, С-пептидом - 0,05%; константа связывания – $1,02-1,73 \times 10^{12}$ л/моль. Титр антисыворотки после первого цикла иммунизации был в пределах 1:20000 - 1:30000, через 6 месяцев - 1:60000 - 1:80000, а через 10-12 месяцев - 1:100 000 - 1:200000, что позволяло в радиоиммунологической тест-системе доводить разведение антисыворотки до 1:400000 - 1:1000000 [16].

Антисыворотка к РЭА. Разработанный нами метод предусматривает однократное внутрикожное введение кролику 100 мкг антигена, эмульгированного в ПАФ. Одновременно

менно животному вводится подкожно вакцина БЦЖ и коклюшная моновакцина [13]. В результате была достигнута существенная экономия дефицитного антигенного материала и получены высокоафинные специфические антитела. Процент перекрестной реакции с неспецифическим кросс-реагирующим антигеном (НСА) был равен 1%; величина константы связывания - 1×10^{10} л/моль; титр антисыворотки через 21 день после начала иммунизации составлял 1:25000, через 3-4 месяца - 1:60000, что позволяло в радиоиммунологической тест-системе использовать антисыворотку в разведении 1:200000 - 1:250000 [19, 20].

Антисыворотка к ПЛ. В качестве антигена использовали препараты высокоочищенного гормона, полученного из аммоний-бикарбонатного экстракта плаценты. Была разработана эффективная схема иммунизации, сущность которой состоит в многократном введении ПЛ в дозе 100 мкг на каждое введение. Полученные антитела были ковалентно иммобилизованы на белке А золотистого стафилококка на основе его способности связываться с Fc-фрагментом антител. Изучена возможность использования иммобилизованных таким образом первых антител в РИА. Такой методический подход позволил сократить время анализа, исключив стадию применения специального сепарирующего агента, увеличить достоверность результатов и упростить процедуру самого анализа [4]. Специфичность анализа в системах с применением антител в гомогенной среде и антител, иммобилизованных на белке А, была сопоставима: форма калибровочного графика, положение стандартных точек на нем, а также определенные концентрации ПЛ в контрольных сыворотках свидетельствуют о том, что иммобилизованные на белке А антитела могут быть применимы для ИХА ПЛ [21].

Антисыворотка к ферритину получена путем иммунизации кроликов препаратом высокоочищенного ферритина, выделенного из селезенки человека. С целью повышения специфичности полученных антител были проведены хроматография иммунной сыворотки на ферритине, ковалентно связанного с сефарозой, после чего адсорбционная хроматография на гранулированном полиакриламидном носителе для удаления примесных продуктов кислотной деструкции ферритина. Такой методический прием позволил при создании иммунорадиометри-

ческой аналитической системы сократить время анализа, сохранив его чувствительность, точность и достоверность [17].

Антисыворотка к гормонам. В качестве иммуногенов были использованы конъюгаты стероидных и тиреоидных гормонов с белками-носителями (ЧСА или БСА) с различной плотностью посадки гаптена на носителе. Разработан способ получения антисывороток к стероидным и тиреоидным гормонам, отличительной особенностью которого является применение чередующихся введений гормонов, конъюгированных с различными белками-носителями (ЧСА и БСА) с высокой эпитопной плотностью [11]. В некоторых случаях, в частности, при получении антисыворотки к кортизолу был применен новый методический прием, суть которого состоит в том, что одновременно с первым введением конъюгата кортизол-3-карбоксиметиллоксин-БСА проводили подкожную инъекцию адсорбированной вакцины КДС в качестве неспецифического стимулятора иммуногенеза, а весь процесс иммунизации состоял из двух введений иммуногена с интервалом между ними 10 недель [12]. В результате разработанных методов существенно улучшены такие аналитические параметры антисывороток, как специфичность и связывающая активность [8]. Величина константы связывания для антисывороток к гормонам была в пределах $1-2 \times 10^9$ л/моль. Титры антисывороток для разных видов антисывороток колебались от 1:20 000 до 1:100 000. В частности, титр антител к тироксину в 3 раза, к трийодтирону в 2,5 раза, а конечное разведение антисывороток к прогестерону в аналитической системе в 17 раз, к тестостерону в 3-4 раза были выше по сравнению с описанными в литературе.

Оценка аналитических параметров антисывороток. Антисыворотки, предназначенные для ИХА, тестировались по трем основным параметрам: специфичность, аффинность и титр. Важность перечисленных параметров антисыворотки очевидна при создании иммунохимических тест-систем. Недостаточная специфичность делает антисыворотку совершенно непригодной даже при наличии высокого титра и хорошей аффинности. В свою очередь, низкие значения константы связывания не позволяют применять антисыворотку для создания методов ИХА. Хорошая специфичность антисыворотки, полученная в модельном эксперименте, не

всегда может гарантировать высокую специфичность аналитической системы в целом. Заключение о полной пригодности антисыворотки для каждой конкретной тест-системы можно сделать после оценки формы калибровочного графика и проведения теста «на открытие» различных концентраций анализируемого антигена (гаптена) в контрольных сыворотках в сочетании с изучением ее специфичности и аффинности. Однако следует иметь в виду, что на результат определения аналитических параметров антител большое влияние оказывает тип метки, используемый в тест-системе. Многочисленными экспериментами было показано, что радиоактивные препараты лиганда будут существенно отличаться в иммунохимическом отношении в зависимости от того, содержат они внешнюю (йод-125) или внутреннюю (^3H) метку. При этом применение 125-йод-меток позволяло, например, использовать антисыворотки в разведениях почти в 10 раз больших, чем для систем с ^3H [1].

Таким образом, в результате выполнения серии экспериментальных исследований разработаны новые эффективные методы получения антисывороток к регуляторным белкам, опухолевым маркерам, белково-пептидным, стероидным и тиреоидным гормонам с улучшенными аналитическими параметрами, пригодными для целей РИА (ИФА) этих соединений. На основе новых методов создана научно обоснованная биотехнология получения высокоспецифичных антисывороток, используемых как для разработки новых средств современного ИХА, так и для серийно выпускаемых радиодиагностических наборов 25 наименований. Приоритетность проведенных исследований подтверждена 10 Авторскими свидетельствами СССР [2, 11, 13, 16, 17, 22-24] и присуждением в 1988 г. Государственной премии БССР в области науки и техники [25].

2. Разработка новых методов ИХА

Вслед за РИА другие методы иммунохимического анализа, такие как ИФА, ФИА и др., заняли ведущее место в медицинской практике в силу их строгой специфичности, информативности и возможности проводить количественную детекцию широкого круга различных биорегуляторов, опухолевых маркеров, транспортных молекул и белков, дифференцировочных маркеров различных клеточных популяций и др. с высоким уровнем чувствительности (10^{-9} - 10^{-16} моль/л). Необходи-

мость изучения механизмов функционирования регуляторных систем организма на молекулярно-генетическом уровне требует идентификации нового класса регуляторных молекул и патологических субстанций. В связи с чем в последние годы нами проводились исследования по разработке новых средств иммунохимического анализа, позволяющих оценивать функциональную, патогенетическую, диагностическую и прогностическую роль целого ряда иммунорегулирующих и иммуномодулирующих молекул: гормонов, аутоантител, маркеров апоптоза, антигенов Главного комплекса гистосовместимости, CD-антигенов - маркеров иммунокомпетентных клеток и др., основанных на использовании новых биотехнологических решений (применение моноклональных антител нескольких специфичностей, различных типов детектирующих молекул - радиоизотопных, ферментных и флюоресцирующих меток, систем «биотин-авидин (стрептавидин)», твердофазных систем разделения и т.д.).

Противоинсулиновые антитела. Обнаружение и контроль за уровнем свободных противоинсулиновых антител имеют важное клинико-диагностическое значение, в частности, для анализа концентрации инсулина; обнаружения состояния иммунорезистентности; динамического контроля за уровнем противоинсулиновых антител у больных диабетом, при лечении которых используют различные препараты инсулина (в том числе и новые современные формы рекомбинантного человеческого инсулина); выявления групп риска в отношении сахарного диабета среди взрослого и детского населения и т.д. В связи с вышеизложенным нами была разработана аналитическая тест-система и на ее основе отечественный набор реактивов для анализа противоинсулиновых антител в сыворотке крови человека - РИА-анти-ИНС [26]. Чувствительность данной радиоиммунологической системы (минимально определяемая концентрация антител, достоверно отличающаяся от нулевой для $p < 0,01$) составила 20 нг/мл. Высокая специфичность системы обеспечивалась использованием высокоочищенных препаратов инсулина для получения меченного радионуклидами йод-125-инсулина и спецификой самого метода йодирования [2]. Проведен сравнительный анализ противоинсулиновых антител с помощью разработанного метода и коммерческого набора реакти-

вов RIA-AIA (Cis-International, Франция) у здоровых лиц и больных диабетом I (получавших препараты инсулина) и II типов. Результаты, полученные с помощью двух аналитических тест-систем, были сопоставимы и соответствовали клинической картине заболевания.

В последние годы внимание многих исследователей привлекает разработка альтернативных методов ИХА, в частности, методов иммунобиосенсорного анализа различных соединений в силу не только их специфичности и чувствительности, что характерно для всех модификаций современного ИХА, но и в силу их неотъемлемого свойства – экспрессности анализа, время которого может составлять от нескольких секунд до нескольких минут.

Нами в рамках Международного проекта Белорусского и Украинского Фондов фундаментальных исследований предпринята попытка разработать научные основы и технологию нового экспресс-метода количественного иммунохимического анализа (на примере противоинсулиновых антител) на основе использования достижений современной биосенсорики, в частности, феномена поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и принципов иммунохимической реакции взаимодействия антигенов и антител.

Феномен поверхностного плазмонного резонанса (ППР): Поляризованный лазерный луч входит в среду с большим рефракторным индексом (стеклянная призма) и выше критического угла происходит его полное внутреннее отражение. При этих условиях электромагнитное поле светового луча проникает через тонкий слой золота, покрывающий стеклянную пластинку. При определенном угле падения светового луча происходит взаимодействие этих колебаний со свободными электронами (плазмонами) на поверхности золотой пленки. Как результат такого взаимодействия возникает возбуждение поверхностных плазмонов, что приводит к уменьшению интенсивности отраженного луча. Это и есть феномен ППР, а угол, при котором наступает плазмонный резонанс, называется резонансным углом. Величина последнего зависит от рефракторного индекса и диэлектрической постоянной среды, которая контактирует с металлом и находится на расстоянии около 1 мкм от его поверхности. Она также чувствительна к изменениям состояния поверхности, которые вызваны появлением на ней дополнительных слоев вследствие иммобилизации

биологического материала и возникновения с ним специфических взаимодействий [27].

Разработанный принцип работы ППР-биосенсора состоит в том, что биологический распознающий элемент (молекулы инсулина) иммобилизуется на поверхности сенсорного чипа (в нашем случае – стеклянная пластинка с напыленным слоем золота). Другой связываемый агент – раствор образца (сыворотка крови пациента, содержащая аутоантитела к инсулину) наносится поверх сенсорного чипа и происходит взаимодействие его с иммобилизованными молекулами. Связывание антигена с антителами на поверхности чипа приводит к изменению резонансного угла, пропорционального концентрации анализируемого соединения. Это взаимодействие (изменение рефракторного индекса) на поверхности чипа прослеживается детектором. Время изменений рефракторного индекса регистрируется в виде сенсограмм. Сенсограммы не только дают информацию о связывании компонентов (или его отсутствии), но и содержат информацию о кинетике и силе взаимодействия. Детектирующим прибором является прибор «Плазмон-Spr-4М», разработанный сотрудниками НАН Украины.

Разработка формата иммунобиосенсорного анализа противоинсулиновых антител включало выполнение нескольких этапов [28]:

- Создание оптимальных условий для взаимодействия реагентов на поверхности биосенсорного чипа.
- Разработка способов высокоэффективной иммобилизации инсулина на поверхности трансдюсеров - преобразователей в биосенсорных устройствах.
- Подбор оптимальных концентраций компонентов для специфической иммунохимической реакции «антиген-антитело» в модельных экспериментах.
- Отработка оптимального алгоритма проведения анализа путем изучения кинетики взаимодействия антигена (инсулин и/или его конъюгат с носителем), иммобилизованного на поверхности пластинки сенсорного чипа, и антител (аутоантител к инсулину).
- Изучение иммунохимических и аналитических характеристик иммуносенсоров (специфичность, чувствительность, диапазон определяемых концентраций и др.).
- Разработка лабораторного и портативного вариантов иммуносенсоров и апроба-

ция их использования в модельных экспериментах и на клиническом материале.

Разработанный новый метод иммунобиосенсорного анализа противоинсулиновых антител на основе ППР обладает: высоким уровнем чувствительности (5 Е/см^3); широким диапазоном определяемых концентраций ($0 - 100 \text{ Е/ см}^3$); возможностью повторного использования биосенсорного чипа и высокой экспрессностью: время анализа до 10 мин (в то время как в традиционных методах ИФА и РИА оно может составлять 4 – 24 часа) [29].

Свободные легкие цепи иммуноглобулинов (СЛЦ). Обнаружение свободных легких цепей иммуноглобулинов – белков Бенс-Джонса с- и I-типа, как и других моноклональных иммуноглобулинов и их фрагментов в крови (моче) больных характеризует синдром «моноклональной иммуноглобулинопатии», а накапливаемые в избыточных количествах гомогенные белки называют парапротеинами. Проблемы клинической интерпретации их появления в организме детально рассмотрены нами в обзоре [30]. Парапротеинемия является результатом пролиферации одного клона В-клеток и может проявляться в виде повышенной продукции гомогенных СЛЦ иммуноглобулинов. Количественный анализ СЛЦ важен как для специалистов, занимающихся изучением структуры и функции иммуноглобулинов, так и для клиницистов, поскольку СЛЦ могут служить маркерами лимфоидной пролиферации при ряде заболеваний, таких как множественная миелома, плазмоцитомы, макроглобулинемия Вальденстрема, лимфома и т.д. Причины развития и распространения в последние годы этих заболеваний остаются пока неясными. Обсуждается целый ряд факторов: генетическая предрасположенность, связанная с дефектом Т-супрессорной функции; влияние хронической антигенной стимуляции; радиационные и химические воздействия на организм; вирусные повреждения и др.

Серьезным препятствием в изучении этой проблемы является отсутствие надежных высокочувствительных и доступных методов количественного анализа СЛЦ. Традиционно используемые для этих целей лабораторные методы (иммуноэлектрофорез, иммунодиффузия, турбодиметрия) недостаточно чувствительны и не позволяют определять клинически значимые пороговые концентрации СЛЦ в крови, а следовательно, исключают возможность выявления доклинических ста-

дий заболевания. Появившийся в последние годы новый метод нефелометрии для определения уровня СЛЦ в сыворотке крови и моче предусматривает приобретение дорогостоящих приборов – нефелометров, что создает ограничения для использования его в лабораторной практике [30].

Целью нашего исследования была разработка тест-систем для количественного РИА и ИФА λ -СЛЦ иммуноглобулинов в крови и моче на основе моноклональных антител двух специфичностей (МАТ-1 и МАТ-2) к различным эпитопам антигенной молекулы и сравнение двух вариантов этих тест-систем в идентичных условиях [31]. МАТ-1 были иммобилизованы на твердой фазе (шариках полистирола), а в МАТ-2 введены йодная или ферментативная метки. Использование на первой стадии МАТ-1 к скрытым внутренним антигенным детерминантам легких цепей, реагирующих с СЛЦ, но не реагирующих с этими цепями, входящими в состав интактных иммуноглобулинов, концентрация которых в крови во много раз выше концентрации СЛЦ, позволило преодолеть проблему перекрестной реакции с иммуноглобулинами, для решения которой другие исследователи используют предварительное удаление иммуноглобулинов из анализируемых образцов [32], что значительно утяжеляет и удлиняет процедуру анализа и мало пригодно для лабораторной практики. Другие авторы предлагают определение СЛЦ только в моче, что снижает клиническую информативность самого теста, так как при нормально функционирующих почках белки Бенс-Джонса в моче отсутствуют, что не означает отсутствия патологического процесса в организме. Появление белков Бенс-Джонса в моче, по современным воззрениям, является результатом поражения почек из-за их нефротоксичности при далеко зашедшем процессе [33]. Кроме того, существование СЛЦ в форме димеров или тетрамеров [34] наводит на мысль, что наиболее ранним признаком наличия опухоли, продуцирующей моноклональные СЛЦ, будет не выявление их в моче, как принято считать, а обнаружение этих белков в крови.

Разработанные новые методы количественного ИФА и РИА концентрации λ -СЛЦ иммуноглобулинов (иммунометрические «сэндвич»-варианты) в биологических жидкостях имеют рабочий диапазон определяемых концентраций от 25 до 1000 нг/мл, харак-

теризуются высокой чувствительностью (25 нг/мл), при этом продолжительность анализа составляет 5 ч. Проведены сравнительный анализ двух методов и оценка их клинко-диагностической значимости при различных формах патологии, сопровождаемой нарушением антителосинтезирующей функции иммунной системы [35-37].

Fas-AP01 (CD 95)-антиген-рецептор. В последние годы доказано существование взаимосвязи между нарушениями регуляции процесса апоптоза и развитием онкологических, аутоиммунных и других заболеваний, сопровождаемых снижением эффективности иммунологического надзора [38]. Исследования целого ряда авторов выявили новые механизмы подавления иммунологического надзора, связанные с апоптозом и Fas-антигеном-рецептором (FasR, AP0-1, CD95) – одного из ключевых соединений, запускающих программу апоптоза [39]. Особенно мало изучена значимость растворимой сывороточной формы sFasR, которая образуется либо за счет протеолитического расщепления мембранной формы (shedding – шеддинг), либо за счет альтернативного сплайсинга мРНК, приводящего к образованию транскрипта, соответствующего растворимой форме [40].

Нами разработана тест-система для ИФА концентрации sFasR в сыворотке крови на основе МАТ двух специфичностей [41]. Принцип метода основан на специфическом взаимодействии FasR с МАТ к нему, иммобилизованными на твердой фазе (полистироловом планшете). Образовавшийся комплекс “МАТ-FasR” выявляли с помощью вторых МАТ к FasR другой специфичности, меченных пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяли с помощью субстрат-хромогенной смеси, регистрируя оптическую плотность (при длине волны 492 нм) на многоканальном спектрофотометре, величина которой находится в количественной зависимости от концентрации FasR. Проведена оценка клинко-диагностической значимости разработанного метода ИФА при патологии аутоиммунного, онкологического и аллергического генеза (р.3). Доказана возможность использования разработанного метода для анализа концентрации FasR - количественного маркера нарушений регуляции механизмов апоптоза; обоснована целесообразность использования этого теста в качестве дифференциально-диагностического, патогенети-

ческого и прогностического критерия при патологии аутоиммунного, онкологического и аллергического генезов [41-42].

Антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA-A, B, C, HLA-DR). Антигены главного комплекса гистосовместимости человека (Human Leucocyte Antigens - HLA) выполняют ведущую роль в иммунорегуляции организма путем участия во всех ключевых механизмах иммунитета. Существует мнение, что механизмы развития большинства заболеваний человека связаны с нарушением регуляции антигенов и генов HLA, а некоторые формы патологии ассоциируют с появлением или отсутствием конкретных антигенов HLA [43]. В силу этого идентификация и количественный анализ антигенов HLA может быть использован как для диагностики, так и для изучения молекулярно-генетических основ развития целого ряда основных заболеваний человека.

Разработан метод детекции антигенов HLA-A,B,C и HLA-DR на лейкоцитах периферической крови на основе принципов непрямой иммунофлюоресценции. Принцип метода состоит в том, что тестируемые антигены (HLA-A,B,C и HLA-DR) лимфоцитов взаимодействуют с соответствующими МАТ с образованием иммунокомплекса. Последующее добавление вторых МАТ, меченных флюорохромом и специфичных по отношению к первым МАТ, приводит к образованию меченого «сэндвич»-иммунокомплекса. Подсчет клеток, меченных ФИТЦ, осуществляли с помощью флюоресцентного микроскопа [44]. Параллельно проводили серию контролей: контроль собственной флюоресценции объекта (без внесения МАТ); контроль качества неспецифической флюоресценции лимфоцитов (инкубация их с конъюгатом МАТ-ФИТЦ); контроль неспецифического связывания с поверхностью лунок.

3. Разработка научно-обоснованной методологии использования средств ИХА в медицинской практике при различных формах патологии

Самостоятельным направлением наших исследований является разработка научно-обоснованной методологии использования новых средств ИХА в медицинской практике при конкретных формах патологии для целей диагностики, изучения патогенеза заболеваний, оценки эффективности проводимой терапии на основе количественных критериев, которыми являются концентрации изучае-

мых биорегуляторов и эффекторных молекул. Благодаря такому подходу получены новые сведения о механизмах функционирования различных регуляторных систем организма в норме и при патологии различного генеза и оценена клиничко-диагностическая значимость выявленных с помощью ИХА нарушений при конкретных видах патологии.

3.1. Радиоиммуноанализ в оценке гормонального гомеостаза

Первые исследования в этом направлении были связаны с углубленным изучением гормонального гомеостаза, особенностей функционирования различных гормональных систем организма, их резервных возможностей и взаимосвязи с клинической симптоматикой и видом проводимой терапии при аутоиммунной патологии (на примере ревматоидного артрита – РА у женщин в возрасте 45-65 лет).

С помощью РИА у больных ревматоидным артритом обнаружены изменения концентраций половых гормонов (повышение уровня прогестерона и эстриола, снижение содержания эстрадиола, тенденция к понижению уровня тестостерона) на фоне тенденции к снижению концентрации кортизола в сочетании с диссоциацией уровней этих гормонов в ответ на фармакологическую пробу с АКТП. Выявленные нарушения связаны с клинической симптоматикой, тяжестью и давностью заболевания и свидетельствуют о дезинтеграции деятельности изучаемых гормональных систем [45].

У больных РА обнаружен гипотиреоз, что подтверждается снижением уровней Т3 и Т4 на фоне повышенной концентрации ТТГ. Степень выраженности гипотиреоза зависит от клинической симптоматики заболевания: по мере развития и утяжеления РА явления гипотиреоза нарастают [46]. Следствием выявленных изменений в функционировании гонад, коры надпочечников, системы «гипофиз-щитовидная железа» являются обнаруженные нами серьезные нарушения гормонального гомеостаза при РА в виде андроген-эстрогенного дисбаланса, надпочечниковой недостаточности и гипотиреоза, которые обуславливают патогенез этого заболевания.

Доказана возможность использования средств современного ИХА для оценки эффективности и целесообразности противовоспалительной и гормональной терапии, контроля за функционированием эндокринных желез под влиянием применяемых препаратов

и разработки обоснованных рекомендаций для избирательного назначения лечебных, в том числе гормональных препаратов с учетом функционального состояния эндокринных систем [14]. Таким образом, ИХА в сочетании с нагрузочными пробами является надежным адекватным средством для количественной оценки нарушений гормонального гомеостаза и изучения их роли в патогенезе РА, позволяющим контролировать течение болезни, эффективность и целесообразность проводимой терапии, прогнозировать исход заболевания.

3.2. Возможности и перспективы использования методов ИХА в онкологии

Важность проблемы раннего распознавания рака трудно переоценить. Выявленный с помощью современных диагностических методов рак в 50% случаев оказывается уже метастазированным. Не удивительно, что число исследований, направленных на поиск простых биохимических и иммунологических маркеров, которые могли бы диагностировать рак задолго до его клинических проявлений, постоянно увеличивается. При различных сочетаниях радионуклидных *in vitro* тестов на раково-эмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопротеин (АФП) и ферритин на базе Всесоюзного Онкологического научного Центра АМН СССР были проведены обследования 110 практически здоровых лиц, 672 человека с воспалительными и злокачественными процессами в различных отделах желудочно-кишечного тракта, 290 больных раком легкого, 123 больных раком молочной железы, 45 с заболеваниями простаты и 117 детей, больных лимфогрануломатозом с целью оценки клинической значимости различных РИА тестов и их сочетаний для первичной диагностики рака, определения стадии злокачественного процесса, для оценки эффективности хирургического и лекарственного лечения, доклинического выявления рецидива заболевания. При этом 47% всех пациентов обследованы в динамике от 2 до 10 раз после радикальной операции, химиотерапевтического и лучевого лечения.

Установлено, что наиболее информативным представляется тест на РЭА: уровень РЭА существенно возрастает параллельно распространенности процесса. При этом метастазирование в печень обуславливает наиболее высокую степень повышения уровня РЭА. АФП, как диагностический тест на рак,

“работает” только при первичной гепатоме и тератобластоме. Причины повышения уровня АФП при других злокачественных опухолях следует, по-видимому, искать в состоянии печени. Повышение концентрации ферритина у онкологических больных можно, прежде всего, отнести за счет нарушений обмена железа в организме и, вероятно, патологии функции печени. Без учета этих изменений определение клинической значимости теста на ферритин не имеет смысла [47].

К диагностическим опухолевым маркерам-антигенам можно отнести и СЛЦ иммуноглобулинов, т.к. доказано их появление при злокачественных заболеваниях лимфопролиферативного генеза таких как множественная миелома, плазмоцитомы, лимфома, болезнь легких цепей и др., частота возникновения которых, как уже было сказано, в последние годы возрастает [36]. С помощью разработанных нами методов РИА и ИФА у больных миеломой обнаружено повышение концентрации СЛЦ в сочетании с повышенным уровнем иммуноглобулинов той или иной классовой принадлежности. В то же время у больных с другими формами злокачественных заболеваний (нелимфопролиферативного генеза) уровень СЛЦ оказался повышенным лишь у лиц, имеющих параллельное повышение концентрации онкомаркеров. При заболеваниях аутоиммунного генеза (в частности, ревматоидном артрите, системной красной волчанке) концентрация СЛЦ у большинства больных оставалась без изменений, а количество аутоантител различной специфичности было повышенным. На основании полученных данных сделан вывод о возможности использования ИХА СЛЦ в качестве диагностического критерия возникновения онкопатологии лимфопролиферативного генеза, сопровождаемой моноклональной парапротеинемией. При этом обнаружена зависимость концентрации СЛЦ иммуноглобулинов от вида патологии, стадии заболевания и характера проводимой терапии, что дает основание говорить о возможности использования разработанных методов не только для целей диагностики, но и мониторинга состояния больных, контроля эффективности терапии, прогнозирования исхода целого ряда заболеваний, связанных с моноклональной гиперпродукцией СЛЦ иммуноглобулинов [48, 49].

В настоящее время в области иммунодиагностики опухолей ведутся активные исследо-

вания по нескольким направлениям. Прежде всего идет широкий поиск, идентификация и количественный анализ новых онкологических маркеров наиболее распространенных опухолей, обладающих высокой специфичностью и клинической информативностью. Определение большинства онкомаркеров диктует необходимость детекции концентрации веществ, выражаемых в нано- и пикограммах (10^{-9} - 10^{-12} г), в связи наиболее употребляемыми остаются методы радиоиммунного и иммуноферментного анализа. Появление новых сведений об изменениях, происходящих на поверхности опухолевых клеток, способах идентификации опухолевых антигенов и генов, кодирующих их экспрессию, а также развитие новых биотехнологий, связанных прежде всего с усовершенствованием методов получения МАТ и достижениями иммуногенетики и генной инженерии, позволило существенно продвинуться в вопросах иммунодиагностики опухолей. Обнаружение и анализ концентраций различных опухолевых антигенов, таких как СА 19.9; СА 195; СА 125; СА 15.5; СА 549; СА 50; специфический антиген предстательной железы, кислая фосфотаза простаты, раково-эмбриональный антиген, тимозинкиназа, α -единица тиреотропного гормона, алкалин-фосфотаза, хорионический гонадотропин, бета-2-микроглобулин, сульфогликопротеиновый антиген, антитела к белку р53, тканевой полипептидный антиген, гликопротеин F-19, тканевые антигены TAG-TAG 72 и др. с высоким уровнем чувствительности (10^{-9} - 10^{-12} моль/л) и специфичности с помощью специальных диагностических наборов реактивов, позволяет существенно повысить эффективность ранней диагностики онкологических заболеваний [50, 51].

Количественный анализ *in vitro* различных опухолевых маркеров с помощью методов современного ИХА в настоящее время занимает существенное место как для первичной диагностики опухолевых заболеваний, так и для контроля эффективности проводимого лечения, обнаружения метастазов, прогнозирования рецидива заболевания после хирургического вмешательства, а также для скрининга больших популяций с целью выявления рака и выделения групп риска. Надежность и эффективность мониторинга развития опухолевого процесса существенно повышается при использовании анализа нескольких опухолевых маркеров в различных комбинациях не

только в сыворотке крови, но и других биологических жидкостях, в том числе и омывающих опухоль. Поиск первичного очага опухоли проводится путем одномоментного анализа двух и более маркеров, а определение его локализации – по повышению доминирующего онкомаркера, ассоциированного с конкретными типами опухолей [51].

3.3. ИХА как основа системы донозологического скрининга и мониторинга скрытых нарушений функции щитовидной железы

Особое место среди основных заболеваний человека занимает патология щитовидной железы (ЩЖ). Среди факторов внешней среды, обуславливающих тиреоидные заболевания, в литературе обсуждают такие как облучение инкорпорированными радионуклидами, загрязнение окружающей среды, ухудшение питания, хронический стресс, недостаток йода в питьевой воде, возрастающий экологический прессинг, нарастающая тенденция роста числа заболеваний и состояний, связанных со снижением реактивности основных регуляторных систем организма, и др. Результаты проводимых исследований показывают, что в последние годы среди населения нашей Республики, как и во всем мире, возросло число заболеваний ЩЖ. Так, за последние пять лет заболеваемость гипертиреозом возросла почти в 1,8 раза по сравнению с 1997 годом, гипотиреозом – в 2 раза, а количество тиреоидитов увеличилось в 1,5 раза [52]. Таким образом можно предположить, что тенденция к росту заболеваемости ЩЖ в дальнейшем будет сохраняться. И не случайно перечень приоритетных научных исследований по проблеме ликвидации медицинских последствий аварии на ЧАЭС, определенный Всемирной организацией здравоохранения, включает и изучение патологии ЩЖ. Особое место в этой проблеме занимают ранние доклинические (донозологические) формы нарушений функции ЩЖ, которые часто остаются вне поля зрения специалистов в силу отсутствия клинических проявлений патологии. Разработка и использование для этих целей высокочувствительных и специфичных методов ИХА позволяет приблизиться к решению этой проблемы. Несмотря на большой объем проводимых научных исследований, связанных со ЩЖ, до сих пор предметом изучения, как правило, остаются лица с клинически выра-

женной патологией ЩЖ, в то время как здоровые люди остаются вне поля зрения специалистов. Проводимые же профилактические осмотры среди здорового населения основаны на использовании традиционных подходов, при этом акцент делается часто на результаты ультразвукового исследования (УЗИ), диагностическая значимость которого, по мнению специалистов, недостаточно высока.

Широкое внедрение в клиническую практику методов ИХА тиреоидных гормонов и белков позволило не только достоверно разграничить повышенный, нормальный и сниженный уровни этих гормонов в крови и, тем самым, верифицировать состояния гипо-, эу- и гипертиреоза, но и диагностировать латентно протекающие нарушения функции ЩЖ. Именно на основе ИХА значений концентраций регуляторов тиреоидного статуса основана современная международная классификация нарушений функционального состояния системы «гипофиз – щитовидная железа». Следует заметить, что несмотря на неблагоприятные тенденции в сторону увеличения заболеваний ЩЖ, выявлению доклинических нарушений функции ЩЖ у практически здоровых лиц, что возможно оценить высокочувствительными методами современного количественного ИХА концентраций тиреоидных гормонов и белков, уделяется мало внимания. В то время как именно в нашей республике существуют возможности для такого рода исследований в силу выпуска отечественных радиодиагностических и иммуноферментных наборов для анализа тиреоидных гормонов и белков на базе хозрасчетного опытного производства ХОП ИБОХ НАН Беларуси.

Ранее нами при проведении обследования здоровых лиц – жителей Минской области была доказана возможность использования средств ИХА для оценки функции системы «гипофиз-щитовидная железа» на основе изучения концентраций тиреоидных гормонов и белков и выявления на этой основе доклинических нарушений функции щитовидной железы [53].

В последние годы нами была поставлена и решена задача – разработать на основе ИХА научно обоснованную методологию и автоматизированную систему донозологической диагностики и мониторинга скрытых нарушений функции ЩЖ. Объектом исследования явились здоровые лица трудоспособного возраста (18 – 60 лет). Сущность методического подхода состоит в проведении комплек-

сного клинико – лабораторного обследования, включающего сбор анамнеза, осмотр специалиста-эндокринолога, УЗИ ЩЖ и количественный ИХА концентраций тиреоидных гормонов, белков и аутоантител к антигенам щитовидной железы в сыворотке крови. Такой методический подход позволил не только выявлять скрытые нарушения функции ЩЖ, но и формировать на их основе в зависимости от характера выявленных нарушений группы риска для организации и проведения последующего динамического слежения за развитием патологии с разработкой при этом для каждой группы соответствующих индивидуальных лечебно-профилактических рекомендации.

Проведенный анализ выявленных функциональных нарушений в системе «гипофиз - щитовидная железа» в зависимости от возраста обследуемых лиц обнаружил существенные различия их распределения. Наибольший процент нарушений тиреоидного статуса выявлен в группах лиц 20 -29 лет (54,4%) и 30 -39 лет (51,7%), в то время как в группе лиц 18 – 19 лет он был наименьшим (8,3%), а в группах лиц среднего (40-49 лет) и пожилого (50- и старше) он составил 49,1% и 37,5% соответственно. Таким образом, полученные результаты обосновывают целесообразность проведения донологического скрининга в нашем регионе прежде всего у лиц молодого возраста (20-39 лет). Характер выявленной скрытой патологии у мужчин и женщин также различался: гипертиреоз был выявлен в 15,1% случаев среди обследованных мужчин и в 13,3% случаев среди женщин, в то время как гипотиреоз – в 11,5% и 12,9% случаев соответственно. Риск развития АИТ был существенно выше среди мужчин – 21%, против 16,5% у женщин, а риск развития узлообразований, наоборот, был выше у женщин – 7,4% по сравнению с мужчинами – 4,1%. Результаты этого раздела исследований обосновывают необходимость проведения скрининговых исследований как среди женского, так и среди мужского населения, которые, как правило, реже обращаются к специалистам – эндокринологам.

Динамическое слежение (мониторинг) за лицами, отнесенными в сформированные группы риска, включало проведение комплексного клинико – лабораторного обследования; оценку тиреоидного статуса с дополнительным анализом концентраций свободных форм Т4 и Т3, содержания различных типов аутоантител (к тиреопероксидазе – АТ-ТПО,

микросомальному антигену – АТ-МСА и к рецептору ТТГ – АТ-рТТГ) и оценку их принадлежности к подклассам IgG1 – IgG4, что позволяло не только выявить аутоиммунное поражение ЩЖ, но и определить степень его выраженности.

Внедрение разработанной системы донологического скрининга и мониторинга скрытых нарушений функции ЩЖ в медицинскую практику позволяет повысить эффективность диагностики скрытых нарушений функции ЩЖ, своевременно организовать проведение соответствующих лечебно – профилактических мероприятий в группах риска на основе разработанных медицинских рекомендаций и тем самым снизить их уровень, сократить затраты на потерю трудоспособности и организацию лечебных мероприятий (госпитализация, диспансеризация и др.), что и обосновывает экономическую эффективность данной методологии.

Большой объем получаемой информации при проведении скрининговых обследований диктует необходимость привлечения средств современной информатики и вычислительной техники, которые позволяют не только оптимизировать диагностику выявленных нарушений, но и осуществлять стандартизованный контроль за функцией ЩЖ в динамике. Продолжением работ в этом направлении является разработка «Автоматизированной информационной системы комплексной оценки функции ЩЖ (АИС-ЩЖ)» в рамках задания программы перспективных научно-исследовательских работ Национальной академии наук Беларуси по сотрудничеству с РУП «ПО «Беларуськалий» [54].

Возможности АИС-ЩИТ позволяют осуществлять:

- автоматическую диагностику нарушений функции ЩЖ; ввод, хранение и выдачу результатов обследования и индивидуальных медицинских рекомендаций по коррекции выявленных нарушений (на электронных и бумажных носителях);
- классификацию различных форм гипер- и гипотиреоза; формирование групп риска на основе показателей тиреоидного статуса;
- анализ и статистическую обработку результатов по различным признакам (район, город, производственный участок, возраст, пол, профессия и др.);
- создание банка данных всех обследованных лиц;
- сравнительный анализ результатов в динамике наблюдения и т.д.

3.4. Иммунохимический анализ в диагностике и изучении патогенеза гипотиреоза

Задачей этого раздела исследований была оценка клинико-диагностической, патогенетической и прогностической значимости показателей тиреоидного статуса и целого ряда иммуномодулирующих молекул при гипотиреозе различных стадий. Для этих целей были использованы методы РИА и ИФА: тиреоидных гормонов - ТТГ, Т4, Т3 и белков - ТСГ и ТГ; аутоантител к тиреоглобулину (АТ-ТГ), микросомальной фракции тироцитов (АТ-МСФ) и тиреопероксидазе (АТ-ТПО); подклассов IgG, формирующих АТ-ТГ и АТ-ТПО; концентрации γ -интерферона; концентрации FasR – маркера апоптоза; и оценка пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови в присутствии неспецифического митогена (фитогемагглютинаина) и антигенов ЩЖ - ТГ и ТПО.

В результате выполнения этой работы получены новые сведения, сущность которых можно представить в виде нескольких заключений. У здоровых лиц с помощью ИХА выявлены в 55,3% случаев различные нарушения в функционировании системы “гипофиз - щитовидная железа”. При этом субклинический гипотиреоз был обнаружен в 11,8%, а субклинический гипертиреоз – в 13,2% случаев от общего числа обследованных.

Обнаружено повышение уровня аутоантител различной специфичности (АТ-ТГ, АТ-ТПО/АТ-МСФ, АТ-ТГ + АТ-ТПО/АТ-МСФ) у лиц с субклиническим и клинически выраженным гипотиреозом. Выявление АТ-ТГ и АТ-ТПО при доклинической форме гипотиреоза подтверждает развитие аутоиммунного синдрома уже на ранней стадии заболевания. По мере развития гипотиреоза повышается процент сочетанного содержания аутоантител (АТ-ТГ + АТ-ТПО/АТ-МСФ) с 29% случаев при субклиническом до 72% случаев при клинически выраженном гипотиреозе, что доказывает необходимость проведения ИХА двух и более типов аутоантител в целях повышения эффективности диагностики аутоиммунного поражения ЩЖ. Прямая корреляция между концентрациями АТ-МСФ и АТ-ТПО (коэффициент корреляции – 0,9) подтверждает взаимозаменяемость этих двух тестов и доказывает возможность использования для диагностики аутоиммунных нарушений одного из двух типов аутоантител (АТ-

МСФ или АТ-ТПО) [55, 56]. Иммунохимический анализ общего IgG и подклассов IgG1-IgG4, формирующих АТ-ТГ и АТ-ТПО, показал, что при субклиническом гипотиреозе большая часть IgG представлена АТ-ТПО, которые обладают более выраженным деструктивным воздействием на ткань ЩЖ по сравнению с АТ-ТГ. Обнаружены значительные различия и в распределении аутоантител по подклассам: среди АТ-ТГ преобладали IgG2, в то время как среди АТ-ТПО – IgG4. Нарастание явлений гипотиреоза приводило к перераспределению этих аутоантител по подклассам: среди АТ-ТГ преобладали IgG2 и IgG4, а АТ-ТПО - IgG1 и IgG4. Выявленные различия в распределении аутоантител по подклассам IgG могут являться одним из патогенетических механизмов аутоиммунных нарушений из-за различного повреждающего действия подклассов IgG на ткань ЩЖ [57]. Обнаружено повышение индекса пролиферации лимфоцитов периферической крови под влиянием антигенов ЩЖ (ТГ и ТПО) в 4,1 и 4,2 раза у лиц с субклиническим гипотиреозом, а у лиц с клинически выраженным гипотиреозом - в 3,9 и 5,1 раза соответственно по сравнению со здоровыми лицами, что подтверждает возможность использования этих антигенов в качестве специфических митогенов для оценки степени выраженности аутосенсibilизации и иммунореактивности при гипотиреозе различных стадий [58].

С помощью разработанного нами метода ИФА обнаружено повышение концентрации FasR/CD95 – маркера апоптоза при субклиническом ($1035,69 \pm 202,6$ УЕ) и клинически выраженном гипотиреозе ($763,6 \pm 46,2$) и снижение ее при раке ЩЖ ($106,0 \pm 4,79$) по сравнению со здоровыми лицами ($356,9 \pm 47,7$), что доказывает участие механизмов апоптоза в развитии патологии ЩЖ и обосновывает возможность использования этого теста в качестве дифференциально-диагностического, патогенетического и прогностического критерия при патологии ЩЖ различного генеза [41].

На основе полученных результатов были сформулированы следующие рекомендации для медицинской практики:

- Методы современного ИХА (РИА, ИФА и др.) тиреоидных гормонов и белков рекомендуется включать в комплексное клинико-лабораторное обследование при проведении скрининга здоровых лиц с целью выявления ранних донозологических нару-

- шений функции ЩЖ, достоверного разграничения состояний эу-, гипо- и гипертиреоза и формирования на основе выявленных нарушений групп риска для последующего динамического слежения за развитием патологии и разработки индивидуальных лечебно-профилактических рекомендаций;
- с целью диагностики и оценки степени выраженности аутоиммунных нарушений рекомендуется проводить сочетанный ИХА двух и более аутоантител к антигенам ЩЖ;
 - ИФА концентрации Fas-рецептора рекомендуется в качестве дополнительного критерия при дифференциальной диагностике патологии ЩЖ различного генеза.

3.5. Иммунопатогенетические аспекты аллергических ринитов у детей

В последние годы отмечается рост заболеваемости поллинозом – аллергической патологией, обусловленной пыльцевой сенсибилизацией. Сезонный аллергический ринит (САР) является наиболее частым проявлением поллиноза. Чаще всего поллиноз развивается в возрастной группе 3 – 4 года, занимая по распространенности второе место после бронхиальной астмы (БА) и составляя до 30% всей совокупности аллергических заболеваний у детей. Кроме того, отмечено, что у пациентов с САР более чем в трети случаев впоследствии развивается БА [59, 60].

Необходимость изучения молекулярно-генетических механизмов развития этих заболеваний обосновывается, прежде всего, тем, что только на их основе возможно развитие точных и своевременных методов диагностики, с одной стороны, а с другой – проведение патогенетического лечения заболевания, которое позволяет влиять на течение заболевания и корректировать его проявления. Знание патогенеза позволяет проводить организацию целенаправленных и эффективных профилактических мероприятий. Разработка и использование для этих целей высокочувствительных и специфичных методов ИХА, доступных для широкого применения в практике, позволяет приблизиться к решению этой проблемы.

Полученные нами результаты по изучению молекулярных механизмов аллергического ринита выявили дисфункции иммунной системы в виде Th2-поляризации Т-хелперного звена иммунитета с преобладанием продукции IL-4 над продукцией IFN- γ , повышения содержания растворимых форм низкоаффинных рецепторов IgE (sCD23) и молекул адгезии эндотелия

сосудов (sVCAM-1), что обуславливает повышенную продукцию IgE [61-64]. Кроме того, развитие аллергического ринита у детей сопровождается нарушением функционирования системы «гипофиз-щитовидная железа» в виде субклинического гипотиреоза, что проявляется изменением значений концентраций регуляторов тиреоидного статуса, а это, в свою очередь, может являться одним из патогенетических звеньев этого заболевания [65, 66].

Нами обоснована целесообразность использования разработанного нового метода иммуноферментного анализа sFasR для выявления нарушений функционирования механизмов апоптоза и оценки их роли в патогенезе аллергического ринита. Существование корреляционной зависимости между содержанием sFasR и продукцией IL-4 и IFN- γ доказывает участие названных цитокинов в регуляции механизмов FasR-опосредованного апоптоза, а повышение синтеза IgE при аллергическом рините, вероятно, является следствием нарушения продукции sFasR – пускового сигнала апоптоза [39].

Было показано, что эффективность специфической иммунотерапии АР обусловлена ее иммунорегулирующим воздействием на продукцию цитокинов (IL-4 и IFN- γ), растворимых форм низкоаффинных рецепторов IgE (sCD23), молекул адгезии эндотелия сосудов (sVCAM-1) и синтез IgE. На основе анализа полученных результатов сделан вывод о том, что концентрации IL-4 и IFN- γ , оцененные методом ИФА, являются количественными маркерами оценки эффективности СИТ и показателями восстановления соотношения популяций Th1/Th2-лимфоцитов [67, 68].

Разработанная нами научно-обоснованная методология использования средств современного иммунохимического анализа при аллергическом рините у детей может быть использована в медицинской практике не только для изучения патогенеза аллергического ринита, но и для целей диагностики, оценки эффективности терапии и прогнозирования течения заболевания.

Таким образом, современный иммунохимический анализ является высокоинформативным и адекватным средством для разработки количественных критериев оценки функционирования различных звеньев иммуноэндокринного гомеостаза и использования их в медицинской практике с целью диагностики, изучения иммунопатогенеза заболеваний, оценки эффективности проводимой терапии и прогнозирования течения заболеваний различного генеза.

Литература

1. Пивень Н.В., Вигдорович И.П. Специфические антигена в методах радиоиммуноанализа. Мед. радиология. 1986; 12: 87-93.
2. Чашин В.Л., Мороз И.Н., Пивень Н.В. и соавт. Способ очистки инсулина. А.С. СССР, № 1312779. 1987.
3. Пивень Н.В., Корень Н.А., Цыбовская В.В. Получение антител к инсулину для целей радиоиммуноанализа. М.: Химиотерапия опухолей в СССР. 1987; 45: 182-187.
4. Пивень Н.В., Мороз И.Н., Вигдорович И.П. Получение антител к плацентарному лактогену для радиоиммунологического анализа. Проблемы эндокринологии. 1989; 35 (2): 77-81.
5. Пивень Н.В., Вигдорович И.П., Корень Н.А. Получение антител к раково-эмбриональному антигену для целей радиоиммуноанализа. М.: Химиотерапия опухолей в СССР. 1987; 45: 177-182.
6. Пивень Н.В., Шолькина Л.В., Щербань А.И. и соавт. Радиоиммунологическая тест-система для определения концентрации тиреоглобулина в сыворотке крови человека. Мед. радиология. 1986; 4: 71-74.
7. Пивень Н.В., Вигдорович И.П., Гончарик А.В. Специфические антигена для иммунохимического анализа белковых антигенов. Известия АН Беларуси, сер. хим. наук. 1990; 2: 97-101.
8. Пивень Н.В., Вигдорович И.П., Гончарик А.В. Получение антител к стероидным и тиреоидным гормонам для их радиоиммуноанализа. Известия АН Беларуси, сер. хим. наук. 1990; 1: 76-79.
9. Naegele W, Drohovskiy M. Radioimmunoassay of Steroid Hormones. Basel, 1980: 35-72.
10. Giovanni E, Talesa V, Palumbo R. Short time production in the rabbit of anti-T3 antibodies at high titer to be used in the radioimmunoassay (RIA) practice. Ann Sclavo 1982; 24 (5): 443-455.
11. Пивень Н.В., Карпова Т.В., Вигдорович И.П. и соавт. Способ получения антисыворотки к гормонам. А.С. СССР, №1264428. 1986.
12. Пивень Н.В., Карпова Т.В., Гончарик А.В. и соавт. Способ получения антисыворотки к кортизолу. А.С. СССР, №1324134. 1987.
13. Пивень Н.В., Чашин В.Л., Корень Н.А. и соавт. Способ получения антисыворотки к раково-эмбриональному антигену. А.С. СССР, № 1361763. 1987.
14. Пивень Н.В. Радиоиммуноанализ в оценке гормонального гомеостаза. Автореф. дис. д-ра мед. наук (в форме научного доклада), М., 1993; 68 с.
15. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E et al. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J Clin Endoc Metab 1971; 33 (6): 988-991.
16. Пивень Н.В., Чашин В.Л. Способ получения антисыворотки к инсулину. А.С. СССР, № 1349046. 1987.
17. Пивень Н.В., Марцев С.П., Лепешева Г.И. и соавт. Способ получения ферритинспецифических антител. А.С. СССР, № 1503508. 1989.
18. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атаулаханов Р.И. Иммуногенетика и искусственные антигены. М.; 1983; 292 с.
19. Пивень Н.В., Ткачева Г.А., Соколов А.В. и соавт. Модификация радиоиммунологического метода измерения концентрации РЭА. Мед. радиология. 1983; 28 (8): 61-65.
20. Пивень Н.В., Ткачева Г.А. Возможности и перспективы использования радиоиммунологического метода для диагностики в онкологии. Тезисы докл. IV Межд. симпозиума стран-членов СЭВ по РФП и РИА-наборам. Шверин, 1983: 52.
21. Пивень Н.В., Мороз И.Н., Вигдорович И.П. и соавт. Радиоиммунологическое определение плацентарного лактогена человека набором реактивов РИА-ПЛ¹²⁶I. Проблемы эндокринологии. 1990; 36 (3): 33-37.
22. Крупенко С.А., Бабынина А.Д., Пивень Н.В. и соавт. Состав для радиоиммунологического определения тироксина в сыворотке крови человека. А.С. СССР № 1256750. 1986.
23. Крупенко С.А., Деркач Т.А., Пивень Н.В. и соавт. Состав для радиоиммунологического определения три-йодтиронина в сыворотке крови. А.С. СССР № 1256749.
24. Свиридов О.В., Ермоленко М.Н., Пивень Н.В. и соавт. Состав для радиоиммунологического определения тироксинсвязывающего глобулина. А.С. СССР № 1338603. 1987.
25. Ахрем А.А., Аметов А.С., Пивень Н.В. и соавт. Разработка научных основ, создание технологии, организация опытного производства и внедрение в практику здравоохранения радиодиагностических наборов. Госуд. Премия БССР в области науки и техники. Минск. 1988; 220 с.
26. Пивень Н.В., Гончарик А.В., Шкуматова Г.А. Радиоиммунологическая тест-система для определения противoinsулиновых антител. Мед. радиология и рад. безопасность. 1998; 4 (43): 37-41.
27. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Гончарик А.В. и соавт. Нонилфенол как маркер загрязнения объектов окружающей среды и методы его иммунохимической детекции. Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2005; 4: 35-44.
28. Piven NV, Starodub NF, Orlova EE et al. Quantifying anti-insulin antibodies by means of their immunobiosensor analysis development. Materials of XXIV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Vienna, 2006: 167.
29. Piven NV, Starodub NF. Biosensoric control of insulin autoantibodies. Materials of the Conference on Biosensing and Biodynamics, Bucharest, 2006: 27-28.
30. Пивень Н.В., Вигдорович И.П., Резников Ю.П. Свободные легкие цепи иммуноглобулинов: интерпретация их появления в организме. Иммунология. 1990; 4: 16.
31. Piven N, Reznikov J, Goncharuk A et al. Development of quantitative enzyme immunoassay and radioimmunoassay of I-free chains of immunoglobulins. Applied Biochemistry Microbiology 2002; 5 (38): 493-499.
32. Drayson M, Tang LX, Drew R et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood 2001; 97 (9): 2900-2902.
33. Bradwell AR, Carr-Smith P, Meal GP et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin Chem 2001; 47 (4): 673-676.
34. Piven N, Goncharuk A, Reznikov J. Double-centre immunoradiometric method for the determination of immunoglobulin free light chains based on monoclonal antibodies. In Advanced Technology for the Clinical Laboratory and Biotechnology, Milan, 1995; 6 (2): 75.
35. Piven N, Vigdorovich I, Bukovich L. Immunoradiometric test for quantitation of human immunoglobulin free light chains. J Nuclear Medicine 1992; 19 (8): 169.
36. Пивень Н.В., Гончарик А.В., Резников Ю.П. Двухцентровый иммунорадиометрический метод определения свободных легких цепей иммуноглобулинов на основе моноклональных антител в биологических жидкостях. Иммунология. 1997; 1: 59-63.
37. Пивень Н.В., Гончарик А.В., Резников Ю.П. и соавт. Разработка иммуноферментного и радиоиммунного анализа I-свободных легких цепей иммуноглобулинов. При-