

Н.П. Гончаров

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва

Значение и роль методов определения гормонов в развитии эндокринологии как общебиологической науки

В обзорной статье-лекции изложено развитие технологии и методов определения гормонов в биологических средах человека: от радиоиммунологической технологии до различных вариантов иммуноферментных методов. Охарактеризованы современные ультрачувствительные методы иммуноанализа, работающие по принципу регистрации люминесцентного и флуоресцентного сигналов. В последние годы получили развитие технологии физико-химических ультрачувствительных методов с использованием масс-спектрометров в комбинации с высокоразрешающей жидкостной хроматографией, которая в недалекой перспективе займет лидирующие позиции в определении биологически активных соединений. Изложены успехи, достигнутые благодаря использованию вышеуказанных методов определения гормонов, как для фундаментальной, так и для клинической эндокринологии.

Ключевые слова: эндокринология, методы, стероидные гормоны, пептидные гормоны, иммуноанализ.

42

До появления иммунологического анализа (1961) основной «прорыв» в становлении современной эндокринологии обеспечивали биологические, химические и физико-химические методы исследования. За 25-летний период из биологического материала были выделены и идентифицированы все основные стероидные гормоны и их метаболиты, что позволило разработать схему синтеза стероидов C₂₁, C₁₉ и C₁₈-ряда как в надпочечниках, так и в гонадах. Было раскрыто морфоструктурное зональное распределение их синтеза в стероид-секретирующих железах. Изучены пути метаболизма стероидных гормонов, что имело огромное значение для понимания биологической роли отдельных метаболитов в развитии дисгормонального рака молочной железы, а также рака предстательной железы. На первоначальном этапе была проделана титаническая работа по выделению стероидов в микрограммовых количествах из сотен килограммов надпочечников крупных животных с использованием трудоемких химических методов. Не случайно несколько групп ученых в Европе и США были удостоены за эти фундаментальные работы Нобелевской премии. На основе структуры нативных стероидных гормонов были синтезированы их производные с лучшей фармакокинетикой, что обеспечивало более высокую биологическую активность. Это относится к производным кортизола, а также к синтезированным аналогам тестостерона и эстрадиола. В настоящее время трудно представить поло-

жение клинических эндокринологов без доступных препаратов стероидного ряда целенаправленного действия. В определении их специфической активности сыграли и продолжают играть важную роль биологические методы тестирования синтезированных стероидных препаратов, в создании которых принимают участие большие группы химиков-синтетиков, как в академических институтах, так и в фармацевтических компаниях. В это же время были достигнуты принципиальные успехи в понимании процессов образования и метаболизма катехоламинов — адреналина и норадреналина. Эта работа также удостоена Нобелевской премии. Аналогичные результаты были получены и для гормонов щитовидной железы.

Параллельно шли интенсивные работы по выделению и расшифровке химической структуры пептидных и гликопротеиновых гормонов. Была расшифрована структура пролактина, соматотропного и адренокортикотропного гормонов и др. Раскрыта химическая структура хорионического гонадотропина, лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) и тиреотропного гормонов. Успех обеспечило бурное развитие химии белков и «вооруженность» химическими методами при исследовании белковых соединений. Биологические методы позволили охарактеризовать их специфическую активность на железы-мишени. Был открыт универсальный механизм их регуляции на основе положительной и отрицательной обратной связи. Приоритет этого открытия принадлежит выдающемуся

N.P. Goncharov

State Budgetary Institution «Scientific centre of endocrinology» Ministry of Healthcare and Social development of the Russian Federation, Moscow

Significance and role of hormone detection methods in the development of endocrinology as a biological discipline

This review covers the development of technology and methods of hormone detection in the human biological environment: from radioimmunological technique to various immune-enzyme methods. Modern ultrasensitive methods of immunanalysis, which function on the principle of luminescent or fluorescent signal detection, are described in the article. In the recent years physicochemical ultrasensitive methods of detection using mass-spectrometry in combination with high resolution liquid chromatography are being more acknowledged and in perspective will become the leading technique of biological detection. This article also lists main achievements reached using aforesaid methods of hormone detection both in fundamental and in clinical endocrinology.

Key words: endocrinology, methods, steroids, peptide hormones, immunanalysis.

русскому ученому М.М. Завадовскому, который обозначил механизм как «плюс–минус»–взаимодействие между тропными гормонами гипофиза и гормонами периферической эндокринной железы. К сожалению, в биологии имя ученого практически не упоминается.

Долгое время шли поиски биологически активных соединений гипоталамической области мозга, которые контролируют синтез гормонов передней доли гипофиза. Гистологическими и иммуногистохимическими методами в гипоталамусе были обнаружены крупноклеточные и мелкоклеточные ядра, вырабатывающие нейросекреторные гранулы. Нейросекреторным образованиям были посвящены сотни исследований, включая работы отечественных ученых. Наконец, в 1969 г. две независимые группы ученых — R.B. Guillemin и A. Shelli — впервые выделили и расшифровали их структуру: нейропептиды просты по своему строению и обладают избирательной способностью активировать тропные функции аденогипофиза. Работы ученых также были удостоены Нобелевской премии. В результате было окончательно сформулировано основополагающее представление о единой функциональной системе гипоталамус – аденогипофиз – периферические железы мишени. Нейроэндокринология оформилась как самостоятельный сегмент в общей эндокринологии. Одновременно получила свое развитие и репродуктивная эндокринология мужского и женского организма.

Схематично и кратко изложенные успехи в развитии и становлении эндокринологии как общебиологической науки были достигнуты благодаря фундаментальным исследованиям, созданию и тиражированию адекватных методов определения гормонов. Вне всякого сомнения, методы молекулярной эндокринологии и генетики сыграли и продолжают играть важную роль в развитии современной эндокринологии. Позже были накоплены данные об образовании биологически активных соединений с паракринными и дистанционными механизмами действия вне желез внутренней секреции. К ним относится, прежде всего, головной мозг, подкожная и висцеральная жировая ткань. Это сравнительно новая, быстро развивающаяся область исследований, результаты которых могут изменить классические представления об эндокринологии. Но уже сейчас можно утверждать, что нервная и гормональная системы функционируют в единстве и обеспечивают как регуляцию всех процессов жизнедеятельности организма, так и его адаптацию к постоянно меняющимся условиям внешней среды обитания на протяжении длительного периода времени.

Методы определения биологической активности гормонов

В современной эндокринологии широко применяется определение содержания гормона в крови по его иммунологической активности. Однако часто в клинической практике встречается ситуация, когда клиническая картина заболевания не соответствует уровню гормона в крови, определенного с помощью иммунологического метода. Именно поэтому возникает необходимость в более точных методах тестирования уровня гормона в крови. На протяжении многих лет развивались и совершенствовались методы определения уровня гормона по его биологической активности — биометоды. Как различаются между собой био- и иммунометоды? Биометоды измеряют функциональное влияние и характеризуют гормональную активность. Иммунометоды измеряют антигенные детерминанты и характеризуют гормональную концентрацию гормонов.

Что собой представляет биометод и как он соотносится с иммунометодом? Существует большое количество биометодов, каждый из которых характеризует различные функции гормона, но ни один из них полностью не дает характеристику молекуле. Различные биометоды основаны на количественном специфическом биологическом ответе организма, органа-мишени, клеток и/или части клеток к гормону по сравнению со стандартным препаратом того же гормона. Может ли считаться эта определяемая гормональная активность клинически важной или нет, зависит от того, как полученный ответ соотносится с основными знаниями о физиологическом влиянии гормона.

Иммунометоды основаны на узнавании антигенов специфическими антителами, которые выработаны против гормона и измерены против референсного препарата (обычно не того же самого). Следовательно, выбор гормонального препарата, используемого для получения антисыворотки, качество и специфичность антител, иммунологическое и биологическое соответствие стандартного референсного препарата нативному гормону будут влиять на то, насколько точно данные, полученные таким методом, отражают нормальную или патофизиологическую картину.

Биометоды, следовательно, основаны на функциональном влиянии и дают информацию о биологической мощности гормона, в то время как иммунометоды основаны на определении антигенных мест и дают информацию о концентрации этой структуры.

Для измерения гормональной биологической активности идеально служили бы клеточные системы, выделенные из соответствующего органа-мишени. Эти системы должны сохранить всю нормальную биологическую картину той же клетки *in vivo*. Измеряемые гормон-индуцированные проявления должны отражать известные функции этого органа *in vivo*. Применяемый биометод должен соответствовать следующим характеристикам:

- обладать достаточной чувствительностью для измерения более низкого уровня гормона в плазме по сравнению с нижней границей, характерной для здоровой популяции;
- обладать стабильной воспроизводимостью при стандартизированных условиях выполнения анализа (точность метода);
- быть специфичным для молекул или их фракций, интересующих исследователей;
- быть технически несложным, не требовать специального оборудования и легко тиражироваться.

Особенно большие требования предъявляются к стандарту, используемому в методе. Материал, отобранный для стандартного гормона, должен быть природным и иметь высокую активность в классических *in vivo* биометодах.

Различия показателей методов био- и иммуноанализа

При измерении уровня гормона в плазме было бы оптимальным, чтобы результаты, полученные с помощью иммунометода, совпадали с результатами биометода, которые соотносятся с физиологическим или патологическим состоянием. Однако на практике наблюдаются различия. Так, при определении содержания иммуноактивного и биологически активного ЛГ (имЛГ и биоЛГ) в плазме у детей и взрослых величина соотношения биоЛГ/имЛГ, по данным разных авторов, колеблется в широком интервале значений.

Чем же может быть обусловлена такая диссоциация? Причин несколько.

1. **Стандарты гормонов**, применяемые в методе. Большинство стандартов охарактеризованы как клас-

сические *in vivo* биометоды против ранее используемого стандарта (полученного не от человека, либо охарактеризованного при использовании неадекватных биометодов). Вся полученная любыми биометодами информация касается биологической мощности гормона, но не отражает его иммунологических характеристик. Оценка этих свойств, вероятней всего, будет зависеть от специфичности применяемых антител. Следовательно, отношение био/им уровней гормона может изменяться от стандарта к стандарту; отражать в плазме биологические и иммунологические характеристики стандарта, но не какие-либо диссоциации между био- и иммуноактивностью гормона в крови. В исследованиях некоторых авторов показано, что в нормальной плазме человека соотношение био/им изменяется от 0,8 до 7 в зависимости от используемого стандарта. Однако если один и тот же стандарт применяется в течение всего времени исследования, то все вариации отношения био/им после лечения или при изменении эндокринного статуса могут быть использованы при анализе результатов.

2. *Биологически неактивные молекулы.* Основной разницей между био- и иммунологическими уровнями гормонов в плазме является то, что молекула гормона может иметь антигенные детерминанты, но не обладать биологической активностью. Например, антитело против антигенного фактора в пределах молекулы адренотропного гормона (АКТГ) может определять как нормальный биологически активный АКТГ, так и «big»-АКТГ, который секретируется клетками карциномы легких. Фрагменты, на которые расщепляется АКТГ, не обладающие биологической активностью, также могут содержать антигенные детерминанты, которые соединяются с антителом. Исследования с меченым кортикотропином свидетельствуют, что в первое время после инъекции имеет место очень быстрая внеклеточная деградация молекулы гормона с отщеплением по обоим N- и C-концам, и было показано, что радиоиммунные методы для АКТГ не определяют целую (C_{1-39}) молекулу гормона. В настоящее время эта проблема преодолевается с использованием новых иммунометрических методов, в которых используются 2 моноклональных антитела против разных областей молекулы АКТГ. В другом гормоне — гастрине — удаление амидной группы С-концевой аминокислоты приводит к полной потере биологической активности, но иммунологическая активность сохраняется.

3. *Различия в полупериоде биологической жизни* биологически и иммунологически активной молекулы гормона. Примером может служить секреция АКТГ в условиях гипогликемии. Показано, что при увеличении секреции имеются близкие уровни био- и имАКТГ. Однако, как только секреция начинает снижаться, диссоциация между показателями био- и иммуноактивностью становится очевидной, поскольку иммунологические формы более устойчивы, чем биологически активные.

Кроме того, диссоциация может быть обусловлена скоростью метаболического клиренса гормональных фрагментов. С-концевой фрагмент паратгормона (ПТГ) почти удаляется из циркуляции почками. Когда функция почек с возрастом снижается, уровень иммуноактивного ПТГ увеличивается и не коррелирует с показателями биологической активности гормона. Это также свидетельствует, что период полужизни биологически активных форм короче, чем иммуноактивных.

При исследовании импульсной секреции ЛГ у мужчин был выявлен комплекс биоактивных импульсов, которым соответствовали лишь единичные импульсы с иммуноло-

гической активностью. Наиболее значимая диссоциация между показателями наблюдалась при снижении количества биоимпульсов. Это могло быть обусловлено либо степенью гликозилирования молекулы гормона, которая определяет период биологической полужизни ЛГ, либо присутствием гетерогенных форм ЛГ, которые не связываются антисывороткой, но имеют биологическую активность.

4. *Изменения биологической активности.* Изменения соотношения биоЛГ/имЛГ после лечения, или связанные с изменением эндокринного статуса при использовании одного и того же стандарта в течение исследования, могут указывать на изменения в типе или биопотенции гормона и даже отражать дифференцировку функций на уровне конечного органа. В этом случае изменения биоЛГ/имЛГ зависят от состояния третичной структуры. Такие изменения либо не оказывают влияния на места с антигенными детерминантами, либо изменяют центр, ответственный за биологическую активность. Также возможно, что изменения в третичной структуре могут маскировать активные антигенные локусы молекулы гормона. Обе эти альтернативы будут приводить к изменению отношения биоЛГ/имЛГ и демонстрировать изменения в качестве секретируемой молекулы гормона.

5. *Наличие молекул, которые мимикрируют или ингибируют действие гормона.* Другие молекулы, обладающие структурой, сходной с исследуемым гормоном, способны проявлять биологический эффект, но не определяются иммунометодом. Например, при болезни Грейвса, обусловленной присутствием антител к ТТГ-рецептору, с помощью радиоиммунного анализа (РИА) количество ТТГ ниже нормы или не определяется. Однако биометод демонстрирует высокую ТТГ-подобную биоактивность, которая четко ассоциируется с фракцией IgG в сыворотке.

Кроме того, диссоциация отношения био/им иногда обусловлена присутствием в плазме крови веществ, которые ингибируют развитие биологического эффекта. Блокирование антителами гормонального мембранного рецептора показано для некоторых заболеваний. Это могут быть антитела к инсулину или рецептору инсулина, например при инсулинонезависимом диабете. Врожденный гипотиреоз бывает результатом присутствия материнских тиреоид-блокирующих антител, ингибирующих щитовидную железу плода.

Современные методы гормонального анализа

Одним из определяющих достижений современной биологии и медицины является создание во второй половине XX века методов радиоиммунологического определения гормонов и других биологически активных соединений в различных средах и тканях организма, что позволило адекватно оценить функциональное состояние эндокринной или любой другой физиологической системы.

Появление радиоиммунологических методов относится к 1960-м годам прошлого века, когда две независимые группы исследователей — Ualow и Bergson (США) и R.R. Ekins (Великобритания) впервые описали, соответственно, метод определения инсулина и тироксина с помощью сатурационного анализа, основанного на принципе радиоиммуноанализа. В первом случае в качестве связывающего компонента использовались антитела к инсулину, во втором — специфический транспортный белок к тироксину. Эта работа также была удостоена Нобелевской премии.

Впоследствии были созданы и другие методы иммуноанализа. В отличие от ранее использовавшихся биологи-

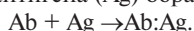
ческих и химических методов, иммунологические методы обладают значительными преимуществами.

В настоящее время радиоиммунологические и родственные им неизотопные методы образуют в совокупности единую биотехнологическую систему, позволяющую определять практически неограниченный спектр веществ. Доступность и широкое использование этих методов в виде коммерческих стандартизованных наборов приобретает определяющее значение для развития многих направлений в биологии, медицине и ветеринарии. Различные методы иммуноанализа позволяют определять некоторые биологически активные вещества с чувствительностью в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до 10^{-12} М и выше.

Общие принципы иммуноанализа

Как известно, основополагающим компонентом любого метода иммуноанализа являются антитела — поликлональные и моноклональные, получаемые «*in vivo*». Антитела, присутствующие в антисыворотке, обычно имеют молекулярную массу более 150 кДа и принадлежат к классу иммуноглобулинов (Ig). Обычно в антисыворотке доминируют IgG, IgA и IgM. Варианты в структуре аминокислотных остатков Ig определяют различия в местах связывания антигена. Теоретически считается, что таких мест связывания может насчитываться до 10^{10} .

Основной принцип иммуноанализа — реакция антитела с антигеном. При взаимодействии антитела (Ab) и антигена (Ag) образуется комплекс (Ab:Ag) по формуле:



Для методов иммуноанализа биологически активных соединений необходимы следующие составляющие:

- высокоочищенный антиген для иммунизации,
- антисыворотка с высокоспецифичными антителами,
- высокоочищенный меченый антиген с максимально высокой специфической активностью,
- технология разделения свободного антигена от антигена, связанного с антителами.

Краткая характеристика основных компонентов иммуноанализа

Антитела. Необходимо всегда помнить, что при разработке любых методов иммуноанализа определяющую роль играет оптимальный выбор высокоспецифических антител независимо от способа регистрации сигнала используемого меченого компонента. Нередко в коммерческих наборах выбор антител не оптимален, что может приводить к диагностическим ошибкам.

Поликлональная антисыворотка содержит несколько тысяч различных типов молекул IgG. Принципиальным отличием моноклональных антител является их идентичность. Они предпочтительнее в методе конкурентного иммуноанализа, так как меченый и определяемый антиген (вещество) конкурируют за один и тот же центр связывания. Знание специфичности их эпитопов имеет существенное преимущество при создании «сэндвич»-анализа. Моноклональные антитела легко получать в больших количествах с помощью гибридомной технологии, что обеспечивает возможность стандартизации метода и воспроизводимость полученных результатов в течение длительного отрезка времени. Применение моноклональных антител для иммуноанализа пептидных гормонов требует большой осторожности, так как их высокая специфичность может приводить к связыванию только одной изоформы того или иного гормона. Этот эффект проявляется также при аффинной очистке пептидов.

Стандарты. Для пептидных и гликопротеиновых гормонов используются международные стандарты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Работу по их созданию и обновлению координирует отдел биологических стандартов Национального института медицинских исследований в Лондоне. Систематическая информация о стандартах ВОЗ публикуется в ее докладах. Высокоочищенные стандарты для низкомолекулярных соединений, например для стероидов, можно приобрести у коммерческих фирм или из международной коллекции стандартов стероидов в Национальном институте здоровья (США).

Одной из причин несоответствия между стандартами является природная гетерогенность их молекулярной структуры, которая наблюдается в случае гликопротеиновых гормонов (ТТГ, ЛГ, ФСГ, а также пролактина [ПРЛ] и гормона роста [СТГ]). Содержание изоформ гормонов и их соотношение изменяется в зависимости от источника и технологии получения гипофизарных гормонов. Другими причинами, влияющими на качество стандартов, могут быть процесс лиофилизации, а также условия и продолжительность их хранения.

Матрикс. Для разбавления стандарта часто используют сыворотки, буферные и белковые растворы. Состав этих растворов, или «матрикс», способен влиять на реакцию антиген-антитело, в результате чего возникают серьезные систематические ошибки, которые сопровождаются нарушением воспроизводимости результатов анализа. Это довольно распространенное в иммуноанализе явление обозначают «эффектом матрикса». Принцип сопоставимости анализов заключается в том, чтобы анализируемое вещество в пробе взаимодействовало в тех же условиях, что и в стандартном растворе. Матриксные эффекты чаще всего влияют на определение ТТГ, общих трийодтиронина (ТЗ), тироксина (Т4), пролактина, ФСГ, ЛГ и стероидов, если они предварительно не выделены из пробы экстракцией.

Для диагностического мониторинга и проведения научных исследований используются следующие основные методы гормонального иммуноанализа: РИА-методы, иммуоферментные методы (ИФА); сверхчувствительные методы 3-го поколения, основанные на измерении усиленного люминесцентного сигнала или регистрации вычлененного во времени флуоресцентного сигнала; электрохимический метод иммуноанализа с использованием высокопроизводительных автоматических анализаторов ряда зарубежных фирм.

Определяющие факторы при выборе метода анализа

Выбор метода анализа прежде всего зависит от аналитической характеристики метода:

- чувствительность тест-системы, которая детерминирована аффинностью антител, а также технологической конструкцией системы и разрешающей способностью прибора при регистрации сигнала;
- диапазон концентраций соединений, который определяется калибровочной кривой;
- специфичность тест-системы, которая определяется процентом перекрестных реакций с близкородственными соединениями;
- степень линейности, или процент открытия внесенного в пробу стандарта (должна быть в пределах 90–104%);
- воспроизводимость получаемых результатов (допустимые значения — до 15% между постановками в разные дни);
- степень трудоемкости проведения анализа;

- стоимость тест-системы. К сожалению, этот фактор часто доминирует. Как правило, низкая стоимость набора не может обеспечить необходимое качество, которое определяется сбалансированными вышеперечисленными параметрами.

Методы радиоиммуноанализа

Неотъемлемым компонентом радиоиммунологического метода является применение радиоактивной метки (третий-³H или ¹²⁵I) с высокой удельной активностью.

Регистрация сигнала осуществляется с помощью специальных гамма- (для ¹²⁵I) или бета (для ³H)-счетчиков.

Наряду с достоинствами, общими для всех иммунологических методов, РИА-методы имеют также и ряд недостатков. К ним, в первую очередь, относится использование радиоактивного материала (³H или ¹²⁵I), но для персонала лаборатории наличие в наборе радиоактивности не представляет опасности. Короткий период полураспада ¹²⁵I (4–5 нед) также ограничивает время использования РИА-наборов, и тем самым снижает их диагностическую эффективность.

Неизотопные методы исследования

46

Создание в начале 80-х годов прошлого века метода включения фермента в антитело или определяемый антиген обеспечило быстрое развитие методов иммуноферментного анализа (ИФА). Наиболее широко в качестве меченого компонента используется пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. **Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).** ELISA получил наиболее широкое распространение при определении гормонов в эндокринологии. В качестве твердофазных носителей используются полистироловые микропланшеты.

В ELISA применяются конъюгаты антител с ферментом, которые, реагируя с соответствующими «хромогенными» субстратами, образуют окрашенные соединения с определенными оптическими характеристиками. Этот метод более производителен в сравнении с классическими жидкофазными методами РИА и ИФА. Однако необходимо помнить о недостатках метода. В частности, высокую точность измерений могут обеспечить только специальные анализаторы. Кроме того, свойства и качество полистироловых микропланшетов, используемых в ELISA, при недостаточно оптимальной технологии их производства могут изменяться от партии к партии и даже от лунки к лунке, что драматически влияет на качество и воспроизводимость гормонального анализа.

Высокочувствительные методы 3-го поколения

Флуоресцентный иммуноанализ. Существует несколько разновидностей данного метода. В последние 30 лет большое распространение в гормональной диагностике получил иммуноанализ с флуоресценцией, отсроченной во времени (Дельфия), где в качестве метки используется редкоземельный элемент европий. Это принципиально новый тип иммуноанализа. Дельфия позволяет определять стероидные гормоны в пикограммовых количествах, а гипофизарные гормоны в концентрациях от 0,03 мЕд/л (для ТТГ) до 0,15 мЕд/л (для пролактина). Дельфия является технологией выбора при проведении скрининга на врожденные гипотиреоз и дисфункцию коры надпочечников (ВДКН).

Люминесцентный иммуноанализ. Наиболее оптимальными методами иммуноанализа являются фотоэмиссионные или люминесцентные методы. Наибольшее при-

менение в иммуноанализе получил метод с усилением люминесцентного свечения.

Метод усиленной люминесценции. Усиление реакции люминесценции достигается добавлением люминогенного субстрата, люминола или изолюминола и специального усилителя, который резко увеличивает интенсивность и продолжительность свечения, что и обеспечивает высокую чувствительность и воспроизводимость метода. Световой сигнал регистрируется специальным анализатором (люминометры). Метод высокопроизводителен, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Наиболее оптимален при обследовании населения на гипотиреоз, так как позволяет определять свободный тироксин в концентрации 8 пмоль/л. Высокая чувствительность определения низкого уровня ТТГ (<0,1 мЕд/л) позволяет его использовать для диагностики субклинических форм гипертиреоза, а также для панели гормонов репродуктивной системы и ряда других гормонов в микрообъемах сыворотки.

Электрохимический метод иммуноанализа как прообраз биосенсорной технологии

Приблизительно одновременно с разработкой ИФА-методов были созданы и применены электроды для определения биологических молекул. Первые электроды конструировались на основе ферментов в силу их высокой специфичности с субстратами. На этом принципе были разработаны ферментные электроды для определения глюкозы, мочевины и других соединений, присутствующих в биологических жидкостях. Электрохимические методы иммуноанализа создавались с целью объединения чувствительности электрохимического детектора и специфичности, присущей реакции взаимодействия антиген-антитело.

В настоящее время в амперометрическом варианте метода наряду с ферментными метками получили многообещающее развитие неферментные электроактивные метки в виде металлоорганических соединений. Электрохимический гормональный иммуноанализ используется в диагностике эндокринных нарушений, позволяя определить широкий спектр стероидных, гипофизарных гормонов и гормонов щитовидной железы. Эти методы лишены многих недостатков, свойственных спектроскопическим методам регистрации сигнала.

Необходимо помнить, что способ лечения больного определяется клиническим диагнозом. Именно поэтому аналитические методы в первую очередь должны отвечать требованиям правильной диагностики. Не следует полагать, что неизотопные методы иммуноанализа надо использовать только потому, что они являются более современными. Зачастую по точности полученных результатов они уступают РИА-методам, а для определения ряда ключевых гормонов (АКТГ, альдостерон, ренин и др.) их не удалось адаптировать.

Биосенсорные методы

Развитие современных высокочувствительных методов иммуноанализа в СССР и в современной России на основе собственной иммунохимической составляющей данной технологии практически отсутствует. Исключение составляют отдельные группы энтузиастов, которые производят ИФА-наборы. С самого начала появления РИА-методов определения гормонов коммерческие наборы («киты») импортировались из Европы в ограниченном количестве и были малодоступны для регионов страны. В настоящее время, благодаря финансовой поддержке правительства, спектр и количество импортируемых

наборов и аппаратуры для их определения значительно расширился. Вместе с тем доступность данной технологии, особенно высокоразрешающей, позволяющей определять пикограммовые количества гормона, ограничена. Предполагаем, что в обозримом будущем в силу ряда причин, прежде всего из-за отсутствия биотехнологической промышленности в стране, наша зависимость от импорта сохранится. К тому же технология иммуноанализа мало приемлема или совсем не годится для определения целого ряда гормонов. Для преодоления отставания мы предлагаем направить наши усилия на создание в стране биосенсорной технологии, которая в ближайшие годы станет определяющей технологией определения гормонов и биологически активных соединений, как для научных целей, так и для диагностики эндокринных заболеваний. Биосенсорная технология требует для ее разработки объединенных усилий ученых — физиков, химиков, биофизиков, иммунохимиков, молекулярных биологов и эндокринологов. Такая специальная целенаправленная программа может быть создана в системе соответствующих институтов РАН как сегмент национального проекта «Нанотехнология». Эндокринологический научный центр (ЭНЦ) готов включиться в данную программу в выборе приоритетов создания биосенсоров для биологических молекул и их тестирования на различных моделях эндокринной патологии. За рубежом (в США, Германии, Японии) данное направление интенсивно развивается как в военных целях, агропромышленном секторе, так и в медицине. В настоящее время созданы сенсоры для определения пикограммовых количеств как для низкомолекулярных, так и высокомолекулярных гормонов. Для определения требуемого уровня специфичности в определении гормона в ряде случаев используются в сенсоре белки рецептора конкретного гормона. А это требует наличия высокого уровня специалистов в области молекулярной биологии. У нас в стране созданы надежные сенсорные технологии быстрого определения сахара в крови, что разительно изменило ситуацию в выявлении больных диабетом типа 2 на ранних этапах его развития.

Методы тандем масс-спектрометрии и их возможности

Любой из существующих методов иммуноанализа требует при его конструкции технологических разработок для каждого индивидуального гормона, включая моноклональные антитела с высокой специфичностью, а также повышение его чувствительности. Особую сложность при создании тест-систем представляет класс стероидных гормонов и их активных метаболитов, близких по химической структуре, многие из которых циркулируют в крови в очень низких концентрациях. Каждая диагностическая компания конструирует свой вариант метода, что затрудняет стандартизацию. Это одна из причин расхождения в результатах определения гормонов.

Появление и развитие современной технологии масс-спектрометрии в тандеме с высокоразрешающим жидкостным хроматографом, обеспечивающей высокую производительность, практически 100% специфичность, необходимую чувствительность и воспроизводимость, открывает новую эру в биохимии стероидов. В отличие от прежнего технологически трудоемкого комплекса газовый хроматограф / масс-спектрометр (GCMS) современная тандем масс-спектрометрия (MS/MS) не требует трудоемкой процедуры подготовки исследуемого биологического материала. При наличии подготовленного специалиста MS/MS может применяться и уже используется

в развитых странах для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях.

В качестве примера приводим современные возможности метода для анализа стероидных гормонов. Сравнительно недавно группа авторов из США опубликовала работу, в которой продемонстрировано, как технология MS/MS с использованием масс-спектрометра API-3000 обеспечивает возможность одновременного определения за 11 мин в 0,2 мл сыворотки 12 основных стероидных гормонов. Продемонстрирована высокая надежность метода. Технология MS/MS высокопроизводительна и экономична по сравнению с современными автоматическими анализаторами, которые требуют больших затрат на постоянное приобретение дополнительных расходных материалов (коммерческих наборов). В методе MS/MS расходные материалы сведены к минимуму. По всем вышеназванным параметрам MS/MS — технология ближайшего будущего в гормональном анализе. Один подготовленный оператор может выполнять до 200 тестов в день. В настоящее время тандем MS/MS получает широкое распространение главным образом в США для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях, и прежде всего для определения основного спектра стероидов C₂₁, C₁₉ и C₁₈-ряда, а также их многочисленных метаболитов. Уже в настоящее время в развитых странах метод MS/MS API-3000 незаменим при выполнении скрининг-программ на выявление ВДКН у новорожденных с использованием в качестве маркера 17 α -гидроксипрогестерона. Метод выступает в качестве «арбитра» при наличии ложноположительных результатов, неизбежных при определении в кровяном пятне 17 α -гидроксипрогестерона методом флуоресцентного иммуноанализа (Delfia). При скрининге на каждый истинный случай ВДКН приходится до 200 ложноположительных результатов, которые требуют внесения ясности с использованием MS/MS API-3000.

Технология MS/MS уже используется для определения различных по химической структуре гормонов, включая ТТГ, свободный (св) Т4, свТ3, метанефрины, эстрадиол и его метаболиты, а также ряд других гормонально активных соединений.

Ошибки при использовании методов гормонального анализа

Ошибки в процессе выполнения анализа могут произойти на 3 его этапах: *преаналитическом, аналитическом и постаналитическом*. По данным мировой литературы, ошибки, возникающие на преаналитическом, внелабораторном этапе, достигают 90% общего их числа.

Преаналитический этап. На этапе получения образцов и доставки их в лабораторию необходимо знать и учитывать следующие биологические параметры: возраст пациентов, пол, биологический ритм для каждого гормона, фазу менструального цикла, срок беременности, диагностические и лечебные процедуры, прием лекарственных препаратов, соблюдение диеты, стрессорные ситуации до- и во время взятия крови и др.

При взятии крови: источник крови (вены, артерии), объем крови, необходимый для анализа, периодичность забора крови, вид антикоагулянта для получения плазмы, температурный режим хранения пробы; особенно избегать гемолиза или липемии. Маркировка проб должна быть ясной, доставка их в лабораторию — не позднее 40 мин после взятия крови.

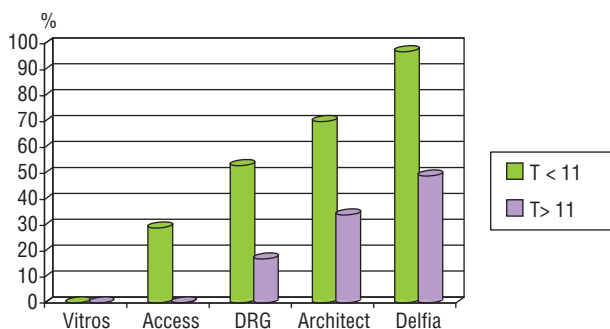


Рис. 1. Различия показателей (в %) общего тестостерона в сыворотке в зависимости от метода и диапазона концентрации гормона (данные ЭНЦ). Метод сравнения — стандартизированный РИА-метод с предварительной экстракцией.

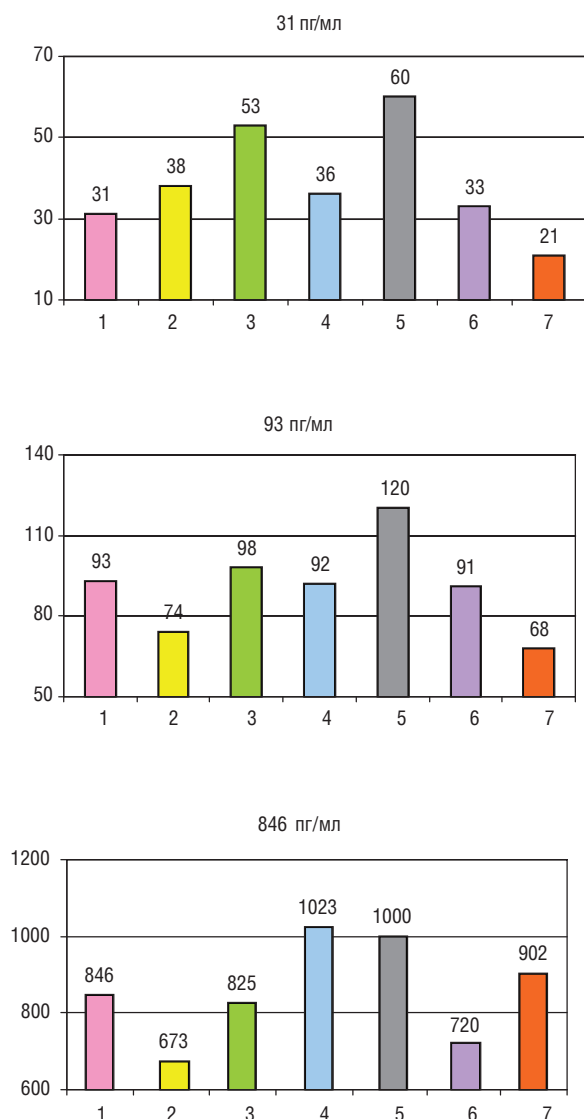


Рис. 2. Концентрация общего 17β-эстрадиола в зависимости от метода и диапазона концентрации гормона. Метод сравнения — 1 — газовая хроматография/масс-спектрометрия, 2 — Vitros, 3 — Access, 4 — Elecsys, 5 — Architect, 6 — Delfia, 7 — Immulite.

Аналитический этап. Аналитический этап заключается в правильной организации работы в лаборатории, включая конструкцию помещения, соблюдение температурного режима (18–25°C). Наличие вытяжного шкафа поможет избежать целого ряда ошибок.

Одной из наиболее частых причин, искажающих результаты анализа, являются дозирующие устройства, особенно пипетки, которые должны калиброваться ответственным сотрудником лаборатории один раз в 2 недели, а в случае применения микропипеток (5–20 мкл) — один раз в неделю. Недопустимо повторное использование наконечников.

При использовании спектрофотометров и автоматических анализаторов необходимо строго придерживаться требований по уходу за приборами и следить за качеством дистиллированной воды.

Абсолютным требованием к работе лаборатории является организация внутреннего и внешнего контроля качества, что позволит обеспечить оптимальную работу диагностической лаборатории.

Ключевым моментом точности гормонального анализа является выбор адекватных методов определения различных маркеров. Данный постулат иллюстрирован на примере тестостерона (рис. 1) и 17β-эстрадиола (рис. 2), где показан разброс в уровне гормонов в зависимости от метода определения.

За последние 5 лет опубликована серия оригинальных работ, доказывающих неадекватность определения в крови общей циркуляции эстрадиола, тестостерона и других стероидов прямыми неэкстракционными методами с использованием практически всех автоматических анализаторов. Как правило, они принципиально завышают концентрацию гормона, что входит в противоречие с клиническими проявлениями заболевания.

Количественные параметры содержания общего эстрадиола, определяемые любым современным методом иммуноанализа, не отвечают условиям лабораторной диагностики и требуют разработки альтернативных подходов для определения свободной формы эстрадиола, чем сейчас занимается лаборатория гормонального анализа ЭНЦ.

Колебания в содержании тестостерона и эстрадиола различными тест-системами требуют продуманного выбора нужного метода, что, в свою очередь, определяется диагностической и/или научной клинической задачей и ожидаемым диапазоном содержания тестостерона и эстрадиола в биологическом материале (см. рис. 1, 2).

Неудовлетворительные результаты определения общего тестостерона автоматизированными системами послужили основанием для разработки альтернативных технологий, и прежде всего прямого и доступного метода определения свободной формы тестостерона как наиболее адекватного маркера андрогенного статуса, как у мужчин, так и у женщин.

Клеточные мембраны слюнных желез — природные разделительные фильтры, и в слюнной протоке проникают соединения только с низкой молекулярной массой (< 400 Д), к которым относится тестостерон и другие стероиды, не связанные с альбумином и специфическим глобулином. Концентрация жирорастворимых свободных стероидов, таких как тестостерон, не зависит от скорости выделения слюны и соответствует уровню несвязанной формы стероида в сыворотке крови.

В лаборатории ЭНЦ был отработан такой метод определения свТ в слюне с использованием высокоразрешающей технологии люминесцентного иммуноана-

Таблица. Количественная характеристика (Ме, 10–90 процентиля) свободной формы тестостерона (свТ) у взрослых мужчин в зависимости от метода определения

Методы	Здоровые мужчины (возраст 25–52 года)	Мужчины с андрогенным дефицитом (возраст 21–54 года)
Общий Т, нмоль/л	18,8 (12,4–26,1)	6,7 (1,2–10,8)
свТ крови расчетный, пмоль/л	374 (225–544)	135 (9,3–215)
свТ в слюне, пмоль/л	380 (270–544)	215 (55–250)
свТ в крови (метод УФ), пмоль/л	230 (110–370)	85 (12–197)

лиза (IBL, Гамбург, Германия). Высокая аналитическая (6,2 пмоль/л) и функциональная (17,3 пмоль/л) чувствительность позволяет количественно определять очень низкие (3–5 пг/мл) концентрации тестостерона в слюне, что особенно важно для диагностики андрогенного статуса у женщин и детей.

Отработан также метод прямого определения свободного тестостерона в сыворотке (свТ). Для этой цели был использован метод ультрафильтрации (УФ) с помощью разделительных фильтров Amicon®Ultra-4 (MILLIPORE) с порогом отсека 30K – 30,000 NMWL.

Наши результаты сравнительного анализа определения свободного тестостерона с использованием технологий, отработанных в лаборатории гормонального анализа и общепринятого расчетного метода, предложенного А. Vermeulen и соавт., представлены в таблице.

Если при анализе результатов в качестве порогового критерия норма/андрогенный дефицит использовать нижний предел референсных значений, то, по данным расчетного метода А. Vermeulen, сниженная концентрация свободного тестостерона определялась в 15% случаев. По результатам определения в слюне — в 18% случаев, при определении общего тестостерона в сыворотке и свободного тестостерона в сыворотке с предварительной ультрафильтрацией — в 20 и 38% случаев. Иными словами, УФ-метод более чувствительный для диагностики андрогенного дефицита.

Нередко ошибки обусловлены плохим качеством используемого набора. В этом случае необходимо предъявить фирме-изготовителю рекламацию с приложением полного протокола исследования с данными по контролю качества.

Постаналитический этап. Полученные результаты проверяются и анализируются высококвалифицированным сотрудником лаборатории и поступают к лечащим врачам. Правильная трактовка и определение диагностической значимости зависят от уровня профессиональной подготовки врача. По данным зарубежных авторов, до 30–40% назначений для выполнения гормональных анализов не имеют оснований и могут дезинформировать

мировать врача в постановке диагноза. Для исключения таких ошибок необходимо тесное ежедневное взаимодействие сотрудников лаборатории и клиники при обсуждении и трактовке полученных результатов.

В заключение необходимо подчеркнуть поступательное развитие эндокринологии как общебиологической науки за последнее 50-летие. Ее успехи во многом определяются достижениями в области фундаментальных наук: химии, физики и биологии. Ключевым моментом в развитии послужили работы о гуморальной природе передачи нервного сигнала и открытие биологическими методами активных соединений, выделяемых эндокринными железами. Ученые в разных странах начали буквально «атаку» по расшифровке их химической структуры. На этом этапе большую роль сыграли физико-химические методы в комбинации с биологическим тестированием выделенных гормонов. Параллельно шли работы по их синтезу, которые увенчались созданием целого ряда гормональных препаратов, обеспечивающих прогресс в клинической эндокринологии. Дальнейший прорыв в развитии эндокринологии обеспечило открытие в 1960 г. метода гормонального иммуноанализа, который обеспечил новые возможности определения гормонов в различных биологических средах в пикограммовых количествах, недоступных для классических физико-химических методов. Параллельно шло создание и развитие методологии и технологии методов молекулярной эндокринологии с генетикой, которые позволили расшифровать взаимодействие рецепторного аппарата тканевой мишеней с гормоном, идентифицировать генетический контроль этого ключевого процесса, а также установить структуру многих рецепторов и контролируемых генов. Появление более чувствительных методов определения гормонов и их широкая доступность открыли новые возможности в диагностике субклинических форм эндокринной патологии. Однако всегда необходимо помнить неизменное правило — окончательный диагноз определяется клиническими параметрами болезни, опытом и знаниями лечащего врача, а все используемые методы важны, но носят вспомогательный характер.

REFERENCES

1. Reproductive Endocrinology. Editor Jaffe Yen. *San Francisc.* US, 1986.
2. Luminescent assays. *Editors Mario Serio and Mario Pazzagli, Italy.* 1982.
3. Alternative immunoassay. *Edited by W.P.Collins. London,* 1986.
4. Gormonal'nyi analiz v diagnostike boleznei endokrinnih jelez / pod red. N.P. Goncharova. *Moskva.* 2009.
5. Hormone assays and their clinical application (Fourth Edition) *Edited by L.A. Loraine, E. Trevor BELL, Edinburgh London and New York.*
6. Testosterone. Edited by Eberhart Nieschlag and Hermann M. Behra. *Cambridge Academ.* 2004. P. 641 – 664.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Гончаров Николай Петрович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории гормонального анализа ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздравсоцразвития России
Адрес: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11
Тел.: (499) 126-44-58
E-mail: GoncharovN@endocrincentr.ru