

## Современный иммунохимический анализ в выявлении доклинических форм патологии щитовидной железы

Н.В. Пивень, Л.Н. Лухверчик, Н.П. Денисевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

## Modern immunochemical analysis in diagnostic of pathology subclinical forms of thyroid gland

N. Piven, L. Luchverchyk, N. Denisevich

Institute of Bioorganic Chemistry of NAS, Minsk, Belarus

### Аннотация

Приводятся сведения о научных основах, преимуществах, новых форматах и областях применения различных методов современного иммунохимического анализа (радиоиммунного, иммуноферментного, иммунофлуоресцентного, иммунобиосенсорного и др.). Представлены результаты собственных исследований по разработке научно обоснованной методологии выявления доклинических форм патологии с помощью иммунохимического анализа на примере скрытых (субклинических) форм нарушения функции щитовидной железы.

### Ключевые слова

Иммунохимический анализ, доклиническая патология, щитовидная железа, диагностика, патогенез.

### Summary

In the present report are listed data about scientific basics, preferences, new formats and using areas of modern immunochemical analysis (radioimmune, immunoenzyme, immunofluorescence, immunobiosensor and other methods). Presented proper research results on development of scientific-ground methodology of pathology subclinic forms diagnostic with help immunochemical analysis an example latent (subclinical) forms of thyroid gland functional disorders.

### Key words

Immunochemical analysis, subclinical pathology, thyroid gland, diagnostic, pathogenesis.

Методы современного иммунохимического анализа (ИХА) относятся к методам связывания - группе родственных методов, отличительной особенностью которых (по сравнению их с биологическими) является возможность определять количество анализируемого вещества (антигена) не по биологической (функциональной) активности, а по количеству комплекса, образовавшегося при взаимодействии этого вещества со связывающим агентом - лигандом. Разновидности методов связывания представлены на рис. 1.

В методах ИХА связывающим агентом являются антитела, а в качестве детектирующих меток могут быть использованы радиоактивные изотопы, флуоресцирующие

соединения и ферменты. В зависимости от типа используемых в анализах меток их подразделяют на радиоиммунологический анализ - РИА (в качестве метки выступают радиоизотопы), флуороиммунный анализ - ФИА (в качестве метки - флуорохромы), иммуноферментный анализ - ИФА (в качестве метки - ферменты).

Преимущества методов современного ИХА:

- высокая клиническая информативность;
- строгая специфичность;
- высокая чувствительность (до  $10^{-9}$ -  $10^{-16}$  моль/л);
- высокая воспроизводимость результатов;
- существование методов экспрессного анализа;
- возможность идентификации и анализа концентраций широкого круга соединений [1].

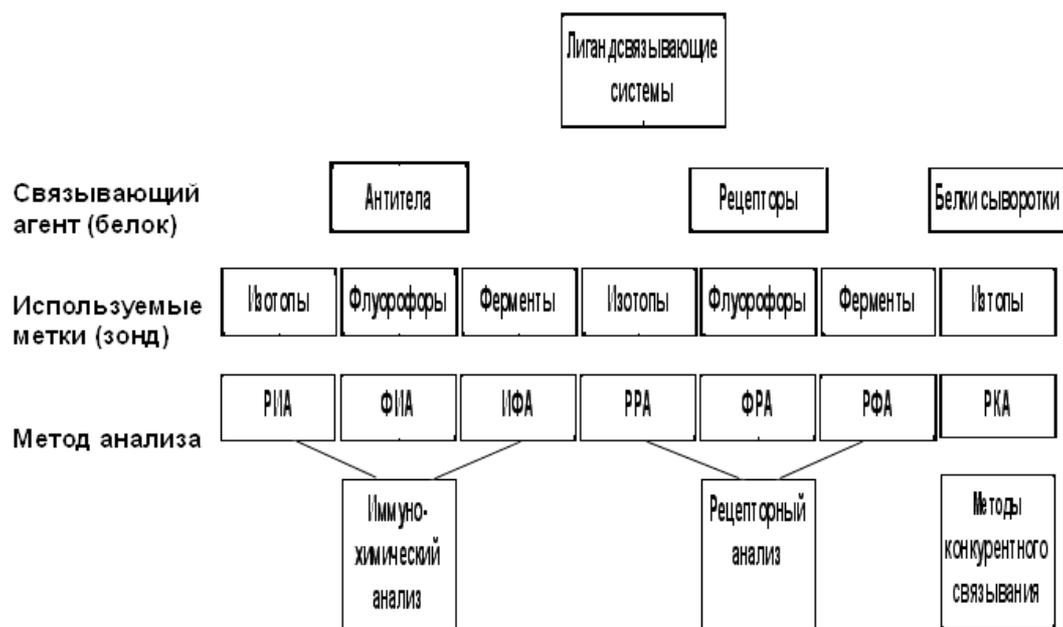


Рис. 1. Разновидности методов связывания

Модификации методов современного ИХА и их применение:

- Методы *in vitro* предназначены для:
  - анализа концентраций различных соединений в сыворотке крови и других биологических жидкостях, водных средах и т.п.
  - обнаружения поверхностных антигенов – маркеров иммунокомпетентных клеток (иммунофенотипирование, метод проточной цитофлуориметрии)
  - Методы иммуноморфологии (на фиксированных и замороженных срезах, живых клетках, в клеточных культурах и т.д.)
- Методы *in vivo*:
  - иммуносцинтиграфия с помощью меченых радиоизотопами моноклональных антител (назначение - поиск первичного очага опухоли и метастазов, зон инфаркта, тромбозов и др.)

Одной из современных тенденций развития ИХА является разработка новых форматов и биотехнологий иммунобиосенсорного анализа, который обладает целым рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами ИХА:

- высокой экспрессностью (время проведения анализа до 10 минут);
- высоким уровнем чувствительности, сопоставимой с традиционными методами ИФА и РИА;

- широким диапазоном определяемых концентраций;
- возможностью многократного использования сенсорного чипа.

С помощью различных методов ИХА можно проводить идентификацию и количественный анализ широкого круга тестируемых молекул и субстанций:

- различные биорегуляторы (гормоны, их предшественники, транспортные и ядерные белки, рецепторные молекулы, антитела и их фрагменты и др.);
- иммуномодулирующие молекулы (цитокины, ростовые факторы, адгезивные молекулы, антигены главного комплекса гистосовместимости);
- аллергены, инфекционные агенты, вирусы, онкологические маркеры и др. патологические субстанции;
- поверхностные антигенные маркеры различных клеточных популяций, в том числе CD – антигены;
- лекарственные соединения и их метаболиты;
- наркотические вещества, пестициды, ксенобиотики и др. загрязняющие факторы внешней среды, продукты питания и т.д.

В медицинской практике методы ИХА могут быть использованы для:

- диагностики заболеваний различного генеза;

- изучения молекулярно – генетических основ патогенеза;
- оценки эффективности проводимого лечения и прогнозирование течения заболеваний;
- выявления доклинических (скрытых) стадий заболевания;
- проведения лекарственного мониторинга;
- контроля качества питьевой воды, продуктов питания и экологической ситуации и т.д.

Таким образом, современный ИХА является надежным адекватным высокочувствительным методом для количественной оценки нарушений функционирования регуляторных систем организма в норме и при патологии, изучения их роли в патогенезе заболеваний различного генеза, позволяющим контролировать течение болезни, целесообразность проводимой терапии и прогнозировать исход заболеваний.

В настоящем сообщении будут изложены результаты наших исследований, связанных с разработкой научно – обоснованной методологии использования методов ИХА для выявления доклинических стадий заболевания на примере патологии щитовидной железы (ЩЖ).

ЩЖ является одним из важных регуляторных звеньев единой метаболической нейроиммунноэндокринной системы, существование которой в мире общепризнано, и обеспечивает структурное и функциональное единство организма – гомеостаз.

Нарушения функции ЩЖ в виде снижения (гипотиреоз) или повышения (гипертиреоз), в свою очередь, вызывает серьезные нарушения в организме (рис.2). Среди нарушений функции ЩЖ особое место занимает гипотиреоз в силу его воздействия на формирование интеллекта и деятельность центральной нервной системы у взрослых и детей.

В настоящее время наблюдается тенденция к росту числа заболеваний ЩЖ среди взрослого и детского населения как во всем мире, так и среди населения Республики Беларусь. Так за последние пять лет заболеваемость гипотиреозом у взрослых возросла почти в 2 раза, гипертиреозом – в 1,8 раза, а количество тиреоидитов – в 1,5 раза [2]. Возрастающая частота заболеваний ЩЖ привела к тому, что по своей распространенности они (включая и скрытые фор-

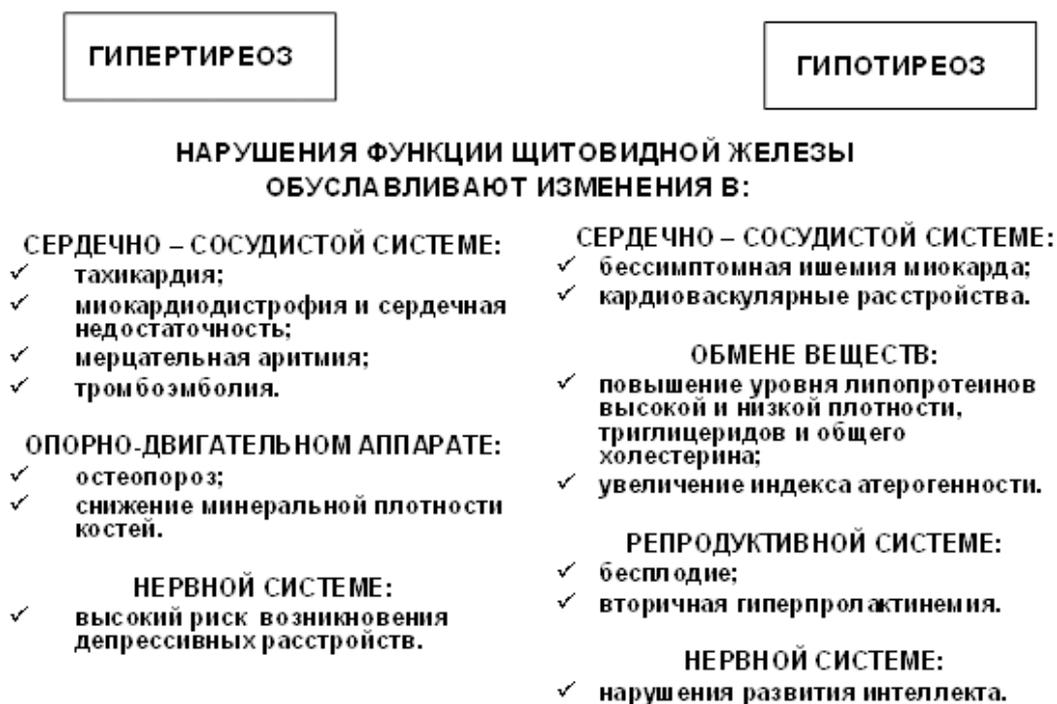


Рис. 2. Патологические изменения в организме, обусловленные нарушениями функции ЩЖ

мы) превосходят по частоте нарушения углеводного обмена, сопровождающие сахарный диабет, который принято считать в эндокринологии проблемой номер один. Учитывая специфическую зависимость ментальных процессов от уровня тиреоидных гормонов в крови трудно даже оценить вред, наносимый тиреоидной патологией интеллектуальному потенциалу общества и здоровью нации в целом [3]. При этом ежегодно 5% субклинического гипотиреоза переходит в клинически выраженный. Распространенность субклинического гипертиреоза колеблется от 0,8% до 3,9%. Аутоиммунный тиреоидит является основной причиной развития гипотиреоза. Особое место в этой проблеме занимают донозологические (скрытые, субклинические) формы нарушения функции ЩЖ, которые часто остаются вне поля зрения специалистов в силу отсутствия клинически выраженных проявлений патологии.

Признание клинической значимости субклинических форм гипер- и гипотиреоза закономерно поставило вопрос о необходимости их активного выявления. Выявление доклинических стадий заболевания тесно связано с проведением скрининговых обследований здорового населения трудоспособного возраста, несмотря на то, что до сих пор нет единого мнения о целесообразности такого рода исследований (рис.3).

Несмотря на большой объем проводимых в нашей республике исследований по проблемам ЩЖ чаще всего предметом изучения являются лица с клинически выраженной патологией ЩЖ. Для выявления ранних форм нарушений в эндокринном звене «гипофиз – щитовидная железа» необходимо привлечение современных высокочувствительных и информативных методов исследования.

Создание универсальных специфичных и высокочувствительных средств ИХА, среди которых достойное место заняли иммуноферментный и радиоиммунный анализ (ИФА и РИА), позволило проводить изучение концентраций различных биорегуляторов, гормонов, транспортных белков, опухолевых маркеров, эффекторных молекул и др. с высоким уровнем чувствительности ( $10^{-9}$ -  $10^{-12}$  моль/л) - и тем самым оценивать состояние гомеостаза организма человека в норме и при различных формах патологии, а также контролировать эффективность проводимой терапии и прогнозировать развитие патологии [4]. 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-, ау- 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» [5].

На Опытном Производстве Института биорганической химии НАН Беларуси серийно выпускаются отечественные диагностические наборы, доступные для медицинской практики, позволяющие определять концентрации тиреоидных гормонов, белков и целого ряда аутоантител (тиреотропного гормона – ТТГ, общего и свободного тироксина – Т4 и трийодтиронина – Т3, тиреоглобулина – ТГ, аутоантител к тиреоглобулину – АНТИ - ТГ, к тиреопероксидазе - АНТИ – ТПО) и тем самым оценивать функциональное состояние системы «гипофиз – щитовидная железа». Таким образом, именно в Беларуси есть все условия для организации и проведения донозологического скрининга здоровых лиц на основе иммунохимического анализа с помощью отечественных, серийно выпускаемых и доступных для здравоохранения диагностических наборов реактивов.

Сущность методического подхода для оценки функции ЩЖ состоит в проведении комплексного клиничко – лабораторного обследования, включающего сбор анамнеза, осмотр специалиста-эндокринолога, ультразвуковое исследование (УЗИ) ЩЖ и количественный ИХА концентрации 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 рекомендаций (рис. 4).

Характер выявленных нами доклинических форм нарушений функции ЩЖ (обследовано 3 240 чел.) приведен на рисунке 5.

Для лиц, отнесенных в сформированные группы риска (субклинический гипо – и гипертиреоз, риск развития злообразования (онко-

- ЗА**
- Зависимость развития различных форм патологии от функции ЩЖ;
  - Высокий процент ежегодного перехода субклинических стадий в клинически выраженную патологию ЩЖ;
  - Влияние на формирование интеллекта и состояние гомеостаза
  - Высокий риск развития онкопатологии
  - Потеря здоровья и финансовые затраты на лечение, госпитализацию и др.



- ПРОТИВ**
- Финансовые затраты на диагностические и профилактические мероприятия.

Рис. 3. Нужен ли донозологический скрининг функции ЩЖ?

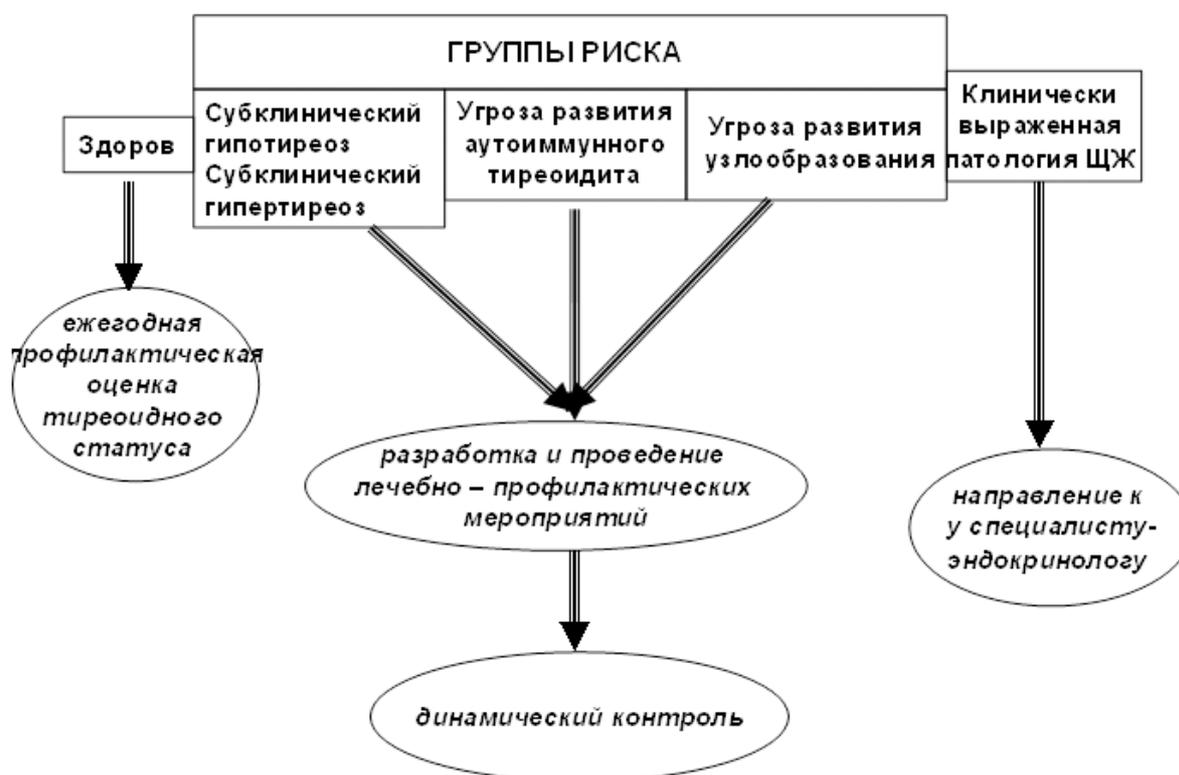
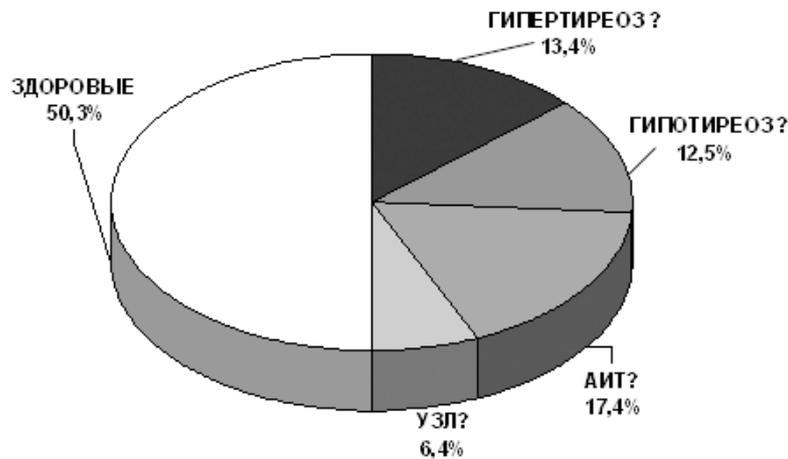


Рис. 4. Схема проведения донозологического скрининга и мониторинга нарушений функции ЩЖ



**Рис. 5. Характер выявленных доклинических нарушений функции щитовидной железы у обследуемых лиц**

патологии), аутоиммунного тиреоидита) были разработаны соответствующие лечебно – профилактические мероприятия по коррекции выявленных нарушений, организовано динамическое слежение за развитием патологии и сформирована база данных по результатам обследования.

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 (рис. 6). Таким образом, полученные результаты обосновывают целесообразность проведения донозологического скрининга в нашем регионе прежде всего у лиц молодого возраста (20-39 лет).

Сравнительный анализ выявленных нарушений тиреоидного статуса у мужчин и женщин (рис.7) показал, что удельный вес числа здоровых лиц у женщин (49,9%) и мужчин (48,3%) различался, но незначительно. 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 узлообразования, наоборот, был выше у женщин – 7,4%, по сравнению с мужчинами – 4,1%.

Полученные результаты 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 клиничко – лабораторного обследования;
- оценку тиреоидного статуса с дополнительным анализом концентраций свободных форм Т4 и Т3;
- оценку содержания различных типов аутоантител (к тиреопероксидазе – АТ-ТПО, микросомальному антигену – АТ-МСА и к рецептору ТТГ – АТ-рТТГ);
- оценку их принадлежности к подклассам IgG1 – IgG4, что позволяло не только выявить аутоиммунный тиреоидит, но и определить степень его выраженности и стадию аутоиммунного поражения ЩЖ.

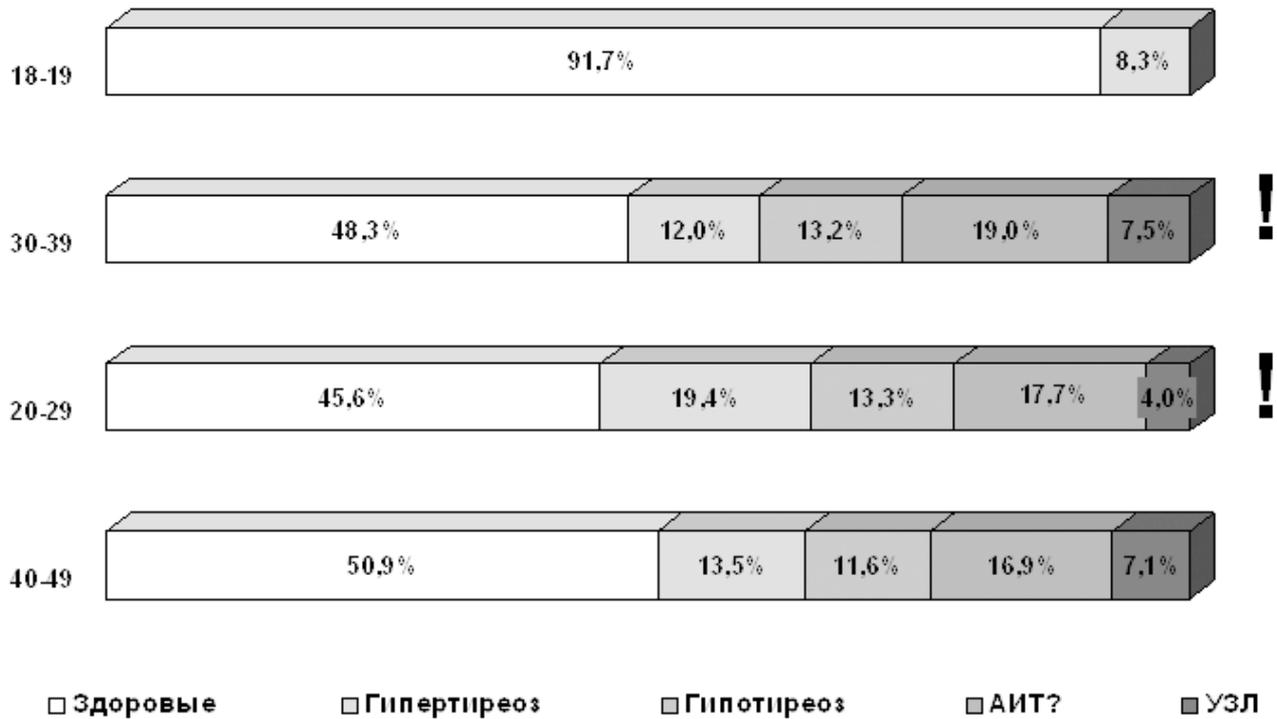


Рис. 6. Распределение выявленных доклинических нарушений функции ЩЖ по возрастным группам



Рис. 7. Распределение выявленных нарушений функции ЩЖ среди обследованных мужчин и женщин

Основой такой методологии мониторинга послужили результаты проведенных нами ранее исследований по изучению иммунопатогенеза различных форм патологии ЩЖ с привлечением целого ряда новых средств ИХА для оценки концентраций перечисленных выше аутоантител, Fas/CD95-рецептора (FasR) - маркера апоптоза, свободного Т3 (св.Т3) и свободного Т4 (св.Т4).

Сочетанный ИХА двух и более типов аутоантител к антигенам ЩЖ позволил нам не только выявить поражение ЩЖ аутоиммунного генеза, но и оценить степень выраженности его: выявление антитиреоидных аутоантител при субклинической форме гипотиреоза доказало развитие аутоиммунного синдрома уже на ранней стадии заболевания, по мере прогрессирования гипотиреоза повышался процент сочетанного содержания аутоантител. Сделан вывод о том, что ИХА различных типов антитиреоидных аутоантител существенно повышает эффективность лабораторной верификации диагноза [6,7] (рис.8). Обнаруженные нами различия в распределении антитиреоидных аутоантител по подклассам IgG (G1-G4), являются, вероятно, одним из патогенетических механизмов аутоиммунных нарушений в силу различного повреждающего действия подклассов IgG на ткань ЩЖ (рис.9) [8].

ИФА концентрации FasR – маркера апоптоза у здоровых лиц и лиц с различными формами гипотиреоза показал зависимость повышения уровня FasR от стадии гипотиреоза (если при субклиническом гипотиреозе экспрессия FasR достаточно высока, то при клинически выраженном она снижалась, однако, оставалась существенно выше, чем у здоровых лиц). В то же время у больных раком ЩЖ (группа сравнения) уровень FasR в крови был значительно снижен по сравнению со здоровыми лицами [9]. Таким образом, концентрация FasR может служить важным патогенетическим маркером глубоких нарушений механизмов апоптоза при гипотиреозе и, вероятно, прогностическим критерием риска возникновения опухолевого поражения ЩЖ. В связи с этим мы склонны рекомендовать проведение ИХА концентрации FasR в динамике развития гипотиреоза: появление тенденции к снижению уровня FasR, вероятно, требует, более тщательного обследования таких пациентов на предмет исключения онкопатологии [10] (рис. 10).

Своевременная организация проведения соответствующих лечебно-профилактических

мероприятий в группах риска на основе разработанных медицинских рекомендаций позволила снизить уровень скрытых нарушений функции ЩЖ, сократить затраты на потерю трудоспособности и организацию лечебных мероприятий (госпитализация, диспансеризация и др.), что и обосновывает экономическую эффективность данной методологии. Увеличение числа здоровых лиц с 45% до 55,3% среди обследуемых, снижение числа лиц с риском развития аутоиммунного тиреоидита с 25% до 13,8% и риском развития узлообразования с 10% до 5,9% - все эти факты подтверждают эффективность своевременного выявления доклинических нарушений функции ЩЖ и проведенных лечебно – профилактических мероприятий и, тем самым, обосновывают целесообразность проведения донозологического скрининга среди населения нашей республики.

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 [11]. Продолжением работ в этом направлении явилась разработка «Автоматизированной информационной системы комплексной оценки функции ЩЖ (АИС-ЩЖ)», в которой приняли участие лаборатория медицинского микроанализа ИБОХ НАН Беларуси, специалисты – эндокринологи из ведущих медицинских учреждений и специалисты по информатике и вычислительной технике Института прикладных программных систем НАН Беларуси.

Функционирование системы состоит из последовательной деятельности ее неавтоматизированной и автоматизированной частей, причем первая включает комплексное клинко-лабораторное обследование и определение в сыворотке крови обследуемых лиц концентраций регуляторов тиреоидного статуса с помощью средств современного ИХА, а вторая - проведение анализа взаимоотношений перечисленных функциональных характеристик, на основе которых производится автоматизированная диагностика нарушений функции ЩЖ, формирование групп риска, выдача индивидуальных медицинских рекомендаций по коррекции выявленных нарушений и создание банка данных всех обследованных лиц.



Рис. 8. Распределение % антител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе при субклиническом и клинически выраженном гипотиреозе

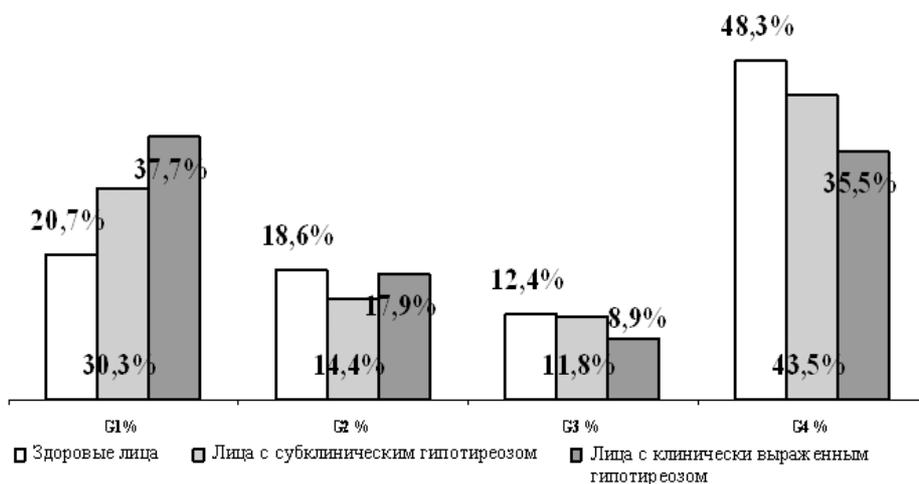


Рис. 9. Распределение аутоантител к тиреопероксидазе по подклассам IgG (G1 -G4, %) у здоровых лиц и лиц с различными формами гипотиреоза

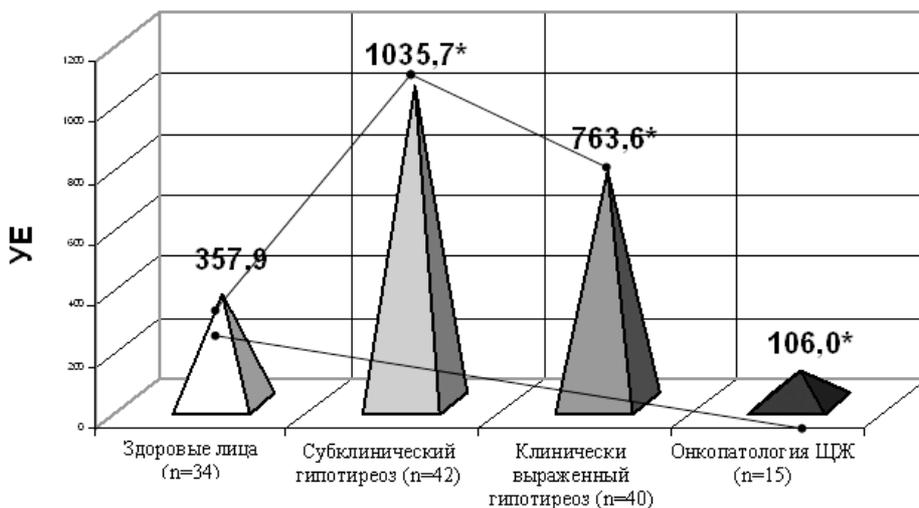


Рис. 10. Концентрация Fas-рецептора – маркера апоптоза у лиц с патологией ЩЖ

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.

Преимущества АИС – ЩЖ:

- стандартизация клинических показателей и показателей оценки тиреоидного статуса, исключение «субъективизма» при трактовке получаемых результатов;
- минимизация затрат по времени получения результатов;
- повышение качества и эффективности диагностики скрытых нарушений функции ЩЖ;

- оптимизация интерпретации получаемых результатов;
- создание динамического компьютерного банка данных по тиреоидному статусу;
- осуществление стандартизированного контроля за функцией ЩЖ в динамике наблюдения.

Разработка и внедрение в практику «Автоматизированной информационной системы комплексной оценки функции ЩЖ (АИС-ЩЖ)» позволяет обеспечить: возможность проведения массовых обследований населения с целью выявления ранних нарушений функции ЩЖ на современном методическом уровне на основе точных иммунохимических количественных критериев; осуществление стандартизированного контроля изучаемых параметров в динамике наблюдения; разработку и проведение индивидуальных лечебно – профилактических мероприятий по коррекции выявленных нарушений; снижение уровня заболеваемости; сокращение затрат на потерю трудоспособности и организацию лечебных мероприятий (госпитализация, диспансеризация и др.); сохранение интеллектуального потенциала и здоровья населения республики в целом.

## Литература

1. Пивень Н.В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования. Иммунопатология, аллергол., инфектол. 2007; 2: 6-22.
2. Здоровоохранение в Республике Беларусь: Офиц. стат. сб. за 1997-2004 гг. Мн.: ГУ РНМБ; 2004.
3. Кандор В.И. Молекулярно-генетические аспекты тиреоидной патологии. Пробл. эндокринологии. 2001; 47(2): 3-10.
4. Пивень Н.В., Мрочек А.Г. Возможности радиоиммунного анализа для оценки эндокринного гомеостаза при аутоиммунной патологии. Мед. радиология и рад. безопасность. 2000; 5:20-28.
5. Hefland M., Redfern C. C. Screening for thyroid disease: an update. Ann. Intern. Med. 1998; 129: 144 - 158.
6. Piven N.V., Luchverchik L.N., Kuzmenkova E.I. et al. Reveal of autoantibodies to thyroglobulin and thyroperoxidase in people with latent and clinically obvious hypothyroidism, resulted from autoimmune pathology of thyroid gland. Int. J on Immunorehabilitation. 2001; 3(1): 109.
7. Лухверчик Л.Н. Иммунохимические маркеры аутоиммунного поражения щитовидной железы при гипотиреозе. Вести НАН Беларуси, сер.мед.науки. 2006; 3:86-7.
8. Luchverchik L., Piven N. IgG subclass distribution antithyroid-peroxidase and antithyroglobulin antibodies in different forms of hypothyroidism. Abstract Book of XXII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology; Paris< France, 2003, P. 48.
9. Пивень Н.В., Новиков В.В., Лухверчик Л.Н., Кузьменкова Е.И. Иммуноферментный анализ Fas-рецептора (CD95) у лиц с патологией щитовидной железы. Иммунопатология, аллергол., инфектол. 2001; 3: 15-20.
10. Пивень Н.В., Лухверчик Л.Н., Орлова Е.Е., Гончарик А.В. Fas/CD95 – опосредованный апоптоз в патогенезе различных заболеваний. Сб. «Биорегуляторы: Использование и применение». Мн.:УП «Технопринт», 2003, 53-61.
11. Пивень Н.В., Лухверчик Л.Н., Мохорт Т.В. и соавт. Донозологический скрининг и мониторинг – основа профилактики заболеваний щитовидной железы. Наука и инновации. 2007;4 (50):32-38.