

Государственное бюджетное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Применение метода иммуноферментного анализа для диагностики
заболеваний эндокринной системы»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы

Медико-биологического факультета

Направления подготовки Биология

Профиль Биохимия

Бердникова Анастасия Александровна

Золотых Мария Александровна

Осьмакова Дарья Валерьевна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной
медицины и биологии

Толкачев Борис Евгеньевич

Лерамо (84 балла)

Основные замечания:

- 1) отсутствовали ссылки на лит. источники*
- 2) отсутствовали тематические иллюстрации в тексте*
- 3) недостаточная полнота раскрытия темы*

ББз (Толкачев)

20.07.16

Волгоград 2016

Оглавление:

1. Список сокращений.....	3
2. Введение.....	4
3. Гормоны эндокринной системы (ЩЖ и ПЖ).....	5
4. Заболевания эндокринной системы (ЩЖ и ПЖ).....	11
5. Условия взятия и хранения материала для проведения ИФА.....	20
6. Применение метода ИФА для диагностики эндокринной системы (ЩЖ и ПЖ).....	23
7. Методы ИФА, используемые при определении гормонов.....	28
8. Инструкция по применению наборов реагентов для ИФА.....	3
9. Заключение.....	41
10. Список литературы.....	42

Список сокращений:

- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ЩЖ – щитовидная железа;
- ПЖ – половые железы;
- Т3 – трийодтиронин;
- Т4- тироксин;
- ТГ – тиреоглобулин;
- ТТГ – тиреотропный гормон;
- Общ. Т4/Т3 - общий Т4/Т3;
- Св. Т4/Т3 – свободный Т4/Т3;
- Ат-ТГ – антител к ТТГ-рецепторам;
- Ат-ТПО – антител к тиреопероксидазе;
- ТПО – тиреопероксидаза;
- ЛГ – лютеинизирующий гормон;
- ХГ – хронически гонадотропин;
- ССГ – стероидсвязывающий глобулин;
- ФСГ – фолликулостимулирующий гормон.

Введение.

Гормоны - органические соединения, вырабатываемые определенными клетками и предназначенные для управления функциями организма, их регуляции и координации. У высших животных есть две регуляторных системы, с помощью которых организм приспосабливается к постоянным внутренним и внешним изменениям. Одна из них – нервная система, быстро передающая сигналы (в виде импульсов) через сеть нервов и нервных клеток; другая – эндокринная, осуществляющая химическую регуляцию с помощью гормонов, которые переносятся кровью и оказывают эффект на отдаленные от места их выделения ткани и органы. Химическая система связи взаимодействует с нервной системой; так, некоторые гормоны функционируют в качестве медиаторов (посредников) между нервной системой и органами, отвечающими на воздействие. Таким образом, различие между нервной и химической координацией не является абсолютным.

Гормоны есть у всех млекопитающих, включая человека; они обнаружены и у других живых организмов. Хорошо описаны гормоны растений и гормоны линьки насекомых.

Физиологическое действие гормонов направлено на: 1) обеспечение гуморальной, т.е. осуществляемой через кровь, регуляции биологических процессов; 2) поддержание целостности и постоянства внутренней среды, гармоничного взаимодействия между клеточными компонентами тела; 3) регуляцию процессов роста, созревания и репродукции.

Метод иммуноферментного анализа – является универсальным чувствительным иммунобиологическим методом анализа. Методом иммуноферментного анализа проводят качественное и количественное определение различных веществ, обладающих свойствами антигена, гаптена (неполноценного антигена) или антитела. Сущность метода заключается в реакции специфического взаимодействия антиген – антитело и последующей

детекции полученного комплекса с использованием таких методов, как спектрофотометрия, хемилюминесценция и других соответствующих методов. Наиболее часто метод иммуноферментного анализа используется для подтверждения качества иммунобиологических лекарственных препаратов, то есть для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфическими антителами и последующей детекции. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью, либо помечено ферментативной меткой), так и косвенной (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с антителами, мечеными ферментативной меткой). Качественный анализ позволяет получить положительный или отрицательный результат содержания антигена или антитела в исследуемом веществе. При проведении количественного анализа определяют содержание того или иного антигена или антитела в исследуемом веществе с использованием калибровочного графика.

Актуальность: «Эндокринная система в организме человека выполняет важную роль, в частности, гормоны щитовидной и половых желез. Они отвечают за основные обмены веществ и поддержания нормальной жизнедеятельности. Малейшие изменения концентрации гормонов в крови влияют на нарушения функционирования всех систем организма.

Существует множество методов, с помощью которых можно наблюдать изменение концентрации гормонов в крови. Однако, одним из самых распространенных и достоверных методов исследования является - метод иммуноферментного анализа.»

Цель: изучить методы ИФА применяемые для диагностики заболевания эндокринной системы.

Гормоны щитовидной и половых желез.

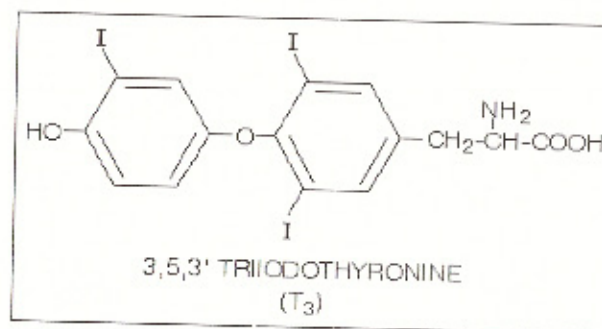
Гормоны щитовидной железы:

Трийодтиронин (Т3)- гормон щитовидной железы, один из двух ее основных гормонов и самый активный ее гормон.

Молекула гормона Т3 содержит в себе 3 атома йода, поэтому и возникает в названии и сокращенном наименовании гормона цифра «три». Гормон Т3 – это конечный, наиболее активный гормон щитовидной железы, образующийся в основном при распаде гормона Т4 с отщеплением от него одного атома йода. После подобного отрыва атома, молекула гормона активизируется – не очень сильно действующий Т4 превращается в мощный, в 10 раз более активный, гормон Т3.

Гормон Т3 отвечает за управление энергетическим обменом человеческого организма. Он стимулирует процессы распада энергии и доставки ее в места, где она необходима. Проникая в клетки мозга, гормон Т3 активизирует обменные процессы в них, ускоряя развитие мозга у ребенка и усиливая нервную деятельность у взрослого.

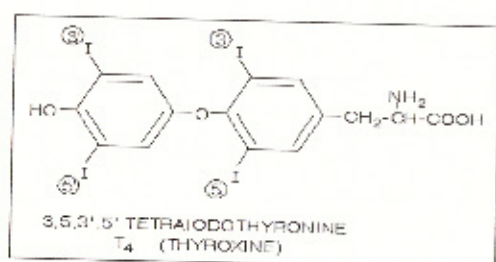
Гормон Т3 также активизирует обменные процессы в сердце, учащает пульс. В костной ткани Т3 также способен усиливать обмен веществ. Влияет гормон и на общую нервную возбудимость, повышая ее.



Тироксин (Т4)- это гормон из группы йодтиронинов, построенный на основе двух остатков аминокислоты тирозина и четырех атомов йода. Именно из-за количества атомов йода гормон Т4 и получил свое числовое обозначение.

Строение гормона – очень простое, он достаточно просто может быть синтезирован искусственным путем и так же легко выявлен в крови лабораторными анализаторами.

T4 – гормон щитовидной железы, вырабатываемый ее клетками. Клетки щитовидной железы (тироциты) захватывают аминокислоты и йод и синтезируют из них предшественник тироксина – тиреоглобулин, который запасается в ткани щитовидной железы в особых хранилищах – фолликулах. При возникновении потребности в гормоне T4, тиреоглобулин разрезается на короткие фрагменты и выделяется в кровь – уже в виде готового гормона T4. Основное действие гормона T4 – катаболическое, т.е. высвобождающее энергию из энергетических субстратов, накапливаемых в организме (жира, гликогена и т.д.).



Тиреотропный гормон (ТТГ) – гликопротеин с молекулярной массой 28 000 дальтон. Его молекула состоит из двух пептидных цепей (субъединиц), связанных нековалентно. Биологическая активность и специфичность ТТГ обусловлена его бета-субъединицей. Альфа- цепь ТТГ фолликулостимулирующего, лютеинизирующего, хорионического гонадотропинов и пролактина идентична.

Нормальное функционирование фолликулярной клетки происходит благодаря постоянной стимуляции ТТГ, реализуемой через рецепторы на клеточной мембране.

Тиреотропный гормон вырабатывается базофилами передней доли гипофиза под контролем тиреотропного гипоталамического релизинг-фактора, а также соматостатина, биогенных аминов и тиреоидных гормонов. Таким образом, продукцию гормона осуществляет система гипоталамус – гипофиз – щитовидная железа.

Основной функцией ТТГ является регуляция синтеза и секреции тиреоидных гормонов. Когда система гипоталамус – гипофиз – щитовидная железа

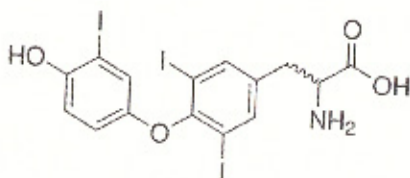
функционирует нормально, то снижение уровня тиреоидных гормонов приводит к повышению концентрации ТТГ и увеличению секреции Т3 и Т4, и, наоборот, при избыточном количестве тиреоидных гормонов происходит подавление секреции ТТГ по принципу обратной связи.

Тиреотропный гормон усиливает васкуляризацию щитовидной железы и поступление йода из плазмы крови в клетки ЩЖ, что стимулирует синтез тиреоглобулина, а также гормонов Т3 и Т4. Гипофизарная секреция ТТГ очень чувствительна к изменениям концентрации Т3 и Т4 в сыворотке крови. Снижение или повышение их содержания даже на 15–20% приводит к реципрокным сдвигам в секреции ТТГ и его реакции на экзогенный тиреотропинрилизинг-фактор.

Тиреоглобулин (ТГ) - образуется в специализированных клетках ЩЖ (тиреоцитах), из которых затем выходит в просвет фолликулов.

ТГ намеренно не секретируется, но некоторые его количества (примерно 1/10 от нарабатываемого в ЩЖ) всегда попадают в кровь в качестве побочного продукта, причем ТГ может существовать в различных состояниях – в разной степени йодирования, гликозилирования, упаковки белковой глобулы, в различной степени деградации.

Основная функция – ТГ - полипептидная основа для синтеза тироксина и трийодтиронина. ТГ является матрицей, которая путём последовательных модификаций превращается в готовые молекулы гормонов. Синтез тиреоглобулина, его транспорт и расщепление стимулирует тиреотропный гормон гипофиза (ТТГ).



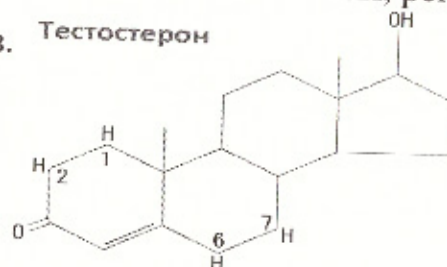
Гормоны половых желез:

Гормоны половых желез:

Тестостерон- мужской половой гормон. Тестостерон образуется в половых железах и коре надпочечников. Выработка тестостерона происходит как и в организме мужчин, так и в организме женщин.

Тестостерон у мужчин влияет на развитие вторичных половых признаков, активизирует половую функцию мужчины (либидо и потенция), стимулирует выработку сперматозоидов.

Тестостерон у женщины участвует в процессе развития фолликула в яичниках. Кроме того, тестостерон воздействует на многие органы и системы организма. Гормон тестостерон влияет на развитие скелета и мышечной массы, регулирует деятельность костного мозга, сальных желез.



Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)- это гликопротеиновый гормон, который вырабатывается и накапливается в передней доле гипофиза и влияет на функционирование половых желез.

Секреция ФСГ происходит в импульсном режиме с интервалами в 1-4 часа. Во время выброса длительностью около 15 минут концентрация ФСГ превышает средний показатель в 1,5-2,5 раза и регулируется уровнем половых гормонов по принципу отрицательной обратной связи. Низкие уровни половых гормонов стимулируют выделение ФСГ в кровь, а высокие – угнетают. Подавляет производство ФСГ также белок ингибин В, синтезирующийся в клетках яичников у женщин и клетках, выстилающих семенные каналы (клетки Сертоли), у мужчин.

У женщин ФСГ стимулирует созревание фолликулов яичников, готовит их к воздействию лютеинизирующего гормона и усиливает высвобождение эстрогенов. Менструальный цикл состоит из фолликулиновой и лютеиновой фаз. Первая фаза цикла проходит под воздействием ФСГ: фолликул

увеличивается и вырабатывает эстрадиол, а в конце резкое повышение уровней фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов провоцирует овуляцию – разрыв созревшего фолликула и выход яйцеклетки. Затем наступает лютеиновая фаза, во время которой ФСГ способствует выработке прогестерона. Эстрадиол и прогестерон по принципу обратной связи регулируют синтез ФСГ гипофизом. Во время менопаузы яичники прекращают функционировать и сниженная секреция эстрадиола приводит к увеличению концентраций фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. У мужчин ФСГ влияет на развитие семенных канальцев, увеличивает концентрацию тестостерона, стимулирует образование и созревание спермы в яичках и способствует продукции андрогенсвязывающего белка. После полового созревания уровень ФСГ у мужчин относительно постоянный. К увеличению его количества приводит первичная недостаточность яичек.

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гонадотропный гормон передней доли гипофиза, стимулирующий секрецию половых гормонов (эстрогенов и прогестеронов) у мужчин и женщин.

Лютеинизирующий гормон обеспечивает правильную работу половых желез, а также выработку половых гормонов — женского (прогестерона) и мужского (тестостерона). Гипофиз производит этот гормон у женщин и у мужчин. Если у женщины в крови уровень ЛГ высокий — это признак наступления овуляции. У женщин этот гормон выделяется в повышенном количестве примерно на 12–16-й день после начала месячных (лютеиновая фаза цикла). У мужчин его концентрация постоянна. В организме мужчин этот гормон увеличивает уровень тестостерона, который отвечает за созревание сперматозоидов.

Эндокриногенные расстройства полового развития и половой функции у лиц генетически женского пола

Половая функция женского организма (циклическое освобождение из яичника овоцита, циклическая продукция женских половых гормонов, циклические изменения слизистой оболочки маточных труб, матки, влагалища, молочных желез) определяется функционированием эндокринного контура между корой большого мозга, гипоталамусом, аденогипофизом, яичником и органами-мишенями женских половых гормонов.

К наиболее частым формам расстройств полового созревания и половой функции у лиц генетически женского пола относят:

- преждевременное половое созревание;
- задержку полового созревания;
- эндокринную гипо- и гиперфункцию яичников.

Центральный (истинный) преждевременный пубертат. 90% всех случаев преждевременного полового созревания составляет истинный (зависящий от гонадотропинов) пубертат. Истинным этот вариант пубертата называют потому, что половое созревание организма происходит хотя и преждевременно, но по обычной (как и в норме) схеме: активация гипоталамуса и синтез гонадолиберинов-секреция гонадотропных гормонов-синтез половых гормонов-формирование вторичных женских половых признаков.

Причины центрального преждевременного пубертата у лиц генетически женского пола.

- Преждевременная активация синтеза гонадолибери-на. Наблюдается при опухолях диэнцефальной области (например, гамартомах, астроцитомах, глиомах, пинеа-ломах, арахноидальных кистах), травмах головного мозга, аномалиях развития головного мозга, гидроцефалии, энцефалитах.
- Гиперпродукция гонадотропинов аденогипофизом. Встречается обычно при его новообразованиях, аденомах гипофиза, энцефалитах, менингитах, травмах головного мозга и др.

Периферический (ложный) преждевременный псевдопубертат.

Характеризуется ускорением роста тела (как и при истинном преждевременном половом развитии).

Причина ложного преждевременного полового развития — автономный избыточный синтез эстрогенов в яичниках или надпочечниках. Обусловлено это, как правило, гормональноактивной опухолью (например, эстрогенпродуцирующей гранулезоклеточной бластемой яичника, кортикостеромой, лютеомой или кистой яичника).

Неполное преждевременное половое развитие характеризуется ранним появлением какого-либо одного или отдельных вторичных половых признаков при отсутствии других.

Причины неполного преждевременного полового развития:

- преждевременное начало синтеза эстрогенов в яичниках, как правило, в избыточном количестве (вызывает преждевременное телархе);
- избыточное образование андрогенов в коре надпочечников (приводит к преждевременному лобковому и подмышечному оволосению);
- повышенная чувствительность клеток мишеней к эстрогенам (например, клеток молочной железы).

Гипофункция яичников

Эндокринную недостаточность яичников подразделяют на первичную и вторичную.

Первичная яичниковая недостаточность (первичный гипогонадизм): состояние, обусловленное патологией яичников; заключается в недостаточной продукции половых гормонов. В связи с этим в крови обычно обнаруживают компенсаторно увеличенную концентрацию ФСГ.

Вторичная яичниковая недостаточность (вторичный, или внеяичниковый гипогонадизм) является результатом дефицита либо гонадолиберина гипоталамуса, либо гонадотропных гормонов аденогипофиза. Причины развития — те же, что и при вторичном гипогонадизме.

Гиперфункция яичников

Эндокринная гиперфункция яичников характеризуется гиперандрогенией или гиперэстрогенией .

Гиперандрогения — состояние, сопровождающееся повышенной продукцией и/или эффектами действия андрогенов.

Наиболее частые причины гиперандрогении.

- Гиперпродукция люлиберина нейронами гипоталамуса и/или лютропина клетками аденогипофиза (например, при опухолях, их гипертрофии или гиперплазии). Избыток лютропина обуславливает гиперплазию внешней оболочки и зернистого слоя фолликулов, а также гиперплазию стромы яичников. Указанные изменения сопровождаются повышением интенсивности синтеза андрогенов в яичниках и появлением признаков вирилизации организма.
- Избыток андрогенных стероидов надпочечникового генеза, особенно в период полового созревания. Эти андрогены трансформируются в периферических тканях в эстрон, который активирует продукцию люлиберина. ЛГ же приводит к повышению интенсивности синтеза андрогенов яичниками. В тканях они превращаются в эстрон, что замыкает порочный круг, который нередко самопотенцируется.
- Избыток инсулина в организме активирует синтез лютеотропного гормона и далее андрогенов — как в яичниках, так и в надпочечниках.
- Опухоли яичника, продуцирующие избыток андрогенов (например, из клеток Лейдига — лейдигомы, синтезирующей тестостерон).
- Недостаточность 3 α -гидроксистероиддегидрогеназы, приводящая к избыточному содержанию в организме дегидроэпиандростерона.

Проявления гиперандрогении:

- повышенное содержание в крови андростендиона и тестостерона;
- увеличение показателя соотношения в крови гонадотропинов (лютеотропный гормон/фолликулостимулирующий гормон обычно более 3;
- гирсутизм;

- аменорея;
- бесплодие;
- ожирение.

Гиперэстрогения — состояние, характеризующееся избыточным образованием и/или эффектами эстрогенов в организме.

Наиболее частая причина гиперэстрогении — повышение содержания в крови андрогенов яичникового и/или надпочечникового генеза. Андрогены в коже и жировой ткани трансформируются в эстрогены, что ведет к увеличению их концентрации в крови.

Проявления гиперэстрогении:

- повышение содержания эстрогенов в крови и моче;
- снижение концентрации гонадотропных гормонов в крови (по механизму обратной связи);
- преждевременное половое созревание девочек по изосексуальному типу;
- ускоренный рост организма (опережающий возрастную норму);
- нарушения менструального цикла, обычно в виде меноррагии, которая обусловлена длительно повышенным уровнем эстрогенов и нарушением периодических колебаний содержания прогестерона в крови.

Эндокриногенные нарушения полового развития и половой функции у лиц генетически мужского пола

Преждевременное половое развитие — состояние, характеризующееся появлением всех или отдельных вторичных половых признаков у мальчиков до 9-летнего возраста. Нередко оно сочетается с эмоциональными и поведенческими расстройствами, а также с нарушением социальной адаптации. Различают истинное и ложное преждевременное половое развитие мальчиков.

Истинное преждевременное половое развитие мальчиков — результат гиперфункции гипоталамо-гипофизарной системы, характеризуется полным преждевременным половым развитием. Последнее включает вирилизацию и активацию сперматогенеза в яичках. Причина преждевременного полового развития мальчиков — ранняя активация секреции гонадолиберина нейронами

гипоталамуса и, как следствие, гонадотропных гормонов аденогипофиза. Обычно развивается при опухолях в области заднего гипоталамуса, серого бугра, эпифиза, при травматических повреждениях диэнцефальной области мозга, участвующей в синтезе гонадолиберинов, а также при энцефалитах, состояниях и патологических процессах, повышающих внутричерепное давление (абсцессах, новообразованиях, гидроцефалиях, нарушении оттока ликвора и др.).

Ложное преждевременное половое развитие мальчиков (ложный пубертат). В отличие от первичного причиной ложного (вторичного) преждевременного полового развития у мальчиков является автономная гиперпродукция андрогенов или хорионического гонадотропина.

Наиболее частые причины преждевременного пубертата:

- андрогенпродуцирующие опухоли яичек (например, лейдигомы, синтезирующие тестостерон, сертолиомы и арренобластомы, образующие андрогены);
- гиперплазия клеток Лейдига и синтез ими избытка тестостерона;
- увеличение содержания в крови андрогенов, секретируемых в коре надпочечников при их гиперплазии (чаще врожденной) или поражении опухолью.

Задержка полового созревания

Отсутствие у мальчиков признаков полового созревания к 14-летнему возрасту считают задержкой пубертата.

Причины задержки полового созревания:

- дефицит гонадолиберинов гипоталамуса и/или гонадотропинов аденогипофиза (при повреждении ядер гипоталамуса или гипофиза опухолями, в результате кровоизлияния или травмы, воспалительных процессов и др.);
- сниженная выработка тестостерона яичками (в результате их травмы, роста новообразований, нарушения развития, воспаления яичек — орхита и т. п.);
- пониженная чувствительность тканей мишеней к действию тестостерона.

НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОМ ЖЕЛЕЗЫ

Щитовидная железа секретирует йодсодержащие гормоны (трийодтиронин Т3 и тироксин Т4), а также пептидный гормон — кальцитонин.

Кальцитонин (тиреокальцитонин) вырабатывают светлые клетки щитовидной железы. Функциональный антагонист кальцитонина: паратиреокальцитонин (паратиреоидный гормон, ПТГ), синтезирующийся в главных клетках паращитовидных желез.

Йодсодержащие гормоны вырабатывают эпителиальные клетки стенки фолликулов. Фолликулярные клетки щитовидной железы и секретируемые ими гормоны относятся к системе «гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа».

Многочисленные болезни щитовидной железы, характеризующиеся изменением уровня и/или эффектов йодсодержащих гормонов, подразделяют на две большие группы:

- 1) гипертиреоидные состояния (гипертиреозы)
- 2) гипотиреоидные состояния (гипотиреозы).

Гипертиреоидные состояния (гипертиреозы) характеризуются избыточными эффектами йодсодержащих гормонов в организме. Нередко эти состояния называют также тиреотоксикозами.

Причины первичного гипертиреоза

Причинные факторы первичных гипертиреозов поражают саму щитовидную железу или эктопическую тиреоидную ткань.

К ним относят:

- зоб (в этом случае гипертиреоз вызван увеличением массы и размеров щитовидной железы);
- диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса): наиболее частая причина гипертиреоза;
- узловой токсический зоб (болезнь Пламмера): гипертиреоз, развивающийся при аденоме (аденомах) щитовидной железы;
- тиреоидит подострый (болезнь де Кервена): тиреотоксикоз при нем развивается вследствие разрушения фолликулов железы и поступления избытка

тиреоид-ных гормонов в кровь;

- Т3- и Т4-секретирующие эктопические опухоли (представляют собой тератомы яичника или метастазы фолликулярного рака щитовидной железы в различных органах);
- тиреотоксикоз, вызванный йодом (феномен «йод Базедов»);
- передозировку тиреоидных гормонов (наиболее часто это является либо врачебной ошибкой, либо результатом приема гормонов с целью похудения).

Причины вторичного гипертиреоза

Наиболее значимые причины вторичного гипертиреоза:

- ТТГ-секретирующая аденома гипофиза;
- селективная резистентность аденогипофиза к гормонам щитовидной железы (в крови существенно повышены уровни Т3 и Т4, но в силу низкой чувствительности и/или уменьшения числа рецепторов к Т3 и Т4 в тиреотрофах аденогипофиза не происходит адаптивного уменьшения синтеза ТТГ).

Причины третичного гипертиреоза

Причинные факторы третичного гипертиреоза воздействуют на нейроны гипоталамуса. Как правило, это наблюдается:

- при невротических состояниях, сопровождающихся избыточным образованием тиролиберина;
- состояниях, вызывающих длительную активацию норадренергических нейронов гипоталамуса. При этом происходит стимуляция синтеза Т3 и Т4 через нисходящие пути симпатической нервной системы.

Дисбаланс тиреоидных гормонов и ТТГ при гипертиреозе.

Он характеризуется:

- повышенным уровнем общей и свободной фракций Т3 и Т4 (за редким исключением, когда имеется патологически высокая чувствительность рецепторов тканей к Т3 и Т4);
- значительным снижением содержания ТТГ при первичном гипертиреозе;
- повышением содержания ТТГ (в сочетании с высокой концентрацией Т3 и Т4) при вторичном (гипофизарном) и третичном (гипоталамическом)

тиреотоксикозе.

Инициация синтеза тиреоспецифических иммуноглобулинов при гипертиреозе.

В крови пациентов с болезнью Грейвса выявляются повышенные уровни специфических иммуноглобулинов к различным антигенам щитовидной железы, что обуславливает ее дополнительное повреждение. Наиболее часто обнаруживают:

- тиреостимулирующие иммуноглобулины: маркеры диффузного токсического зоба;
- иммуноглобулины к антигенам тиреоцитов (к белкам микросом, йодидпероксидазе).

ГИПОТИРЕОИДНЫЕ СОСТОЯНИЯ

Гипотиреозы: состояния, обусловленные недостаточностью секреции и/или эффектов тиреоидных гормонов щитовидной железы.

Частота зарегистрированных случаев гипотиреоза достигает 10 на 1000 населения в общей популяции (у новорожденных — 0,025%, у лиц старше 65 лет — 3%). Преобладающий возраст пациентов: старше 40 лет.

Преобладающий пол женский (соотношение заболевших среди женщин и мужчин равно примерно 7:1).

Причины гипотиреоза

Физические, химические или биологические тиреотропные патогенные факторы обуславливают развитие разных форм гипотиреоза, действуя:

- на щитовидную железу (вызывая первичный или железистый гипотиреоз);
- гипофиз (приводя ко вторичному или гипофизарному гипотиреозу);
- гипоталамические центры (обуславливая третичный или гипоталамический, центрогенный гипотиреоз);
- механизмы транспорта, метаболизм, рецепцию тиреоидных гормонов (вызывая постжелезистый гипотиреоз).

На практике различают первичный и вторичный (гипоталамо-гипофизарный) гипотиреоз.

Первичный гипотиреоз (90% случаев гипотиреоидных состояний) развивается при поражении ткани самой щитовидной железы и сопровождается повышением уровня ТТГ.

Причины первичного гипотиреоза:

- врожденное нарушение развития щитовидной железы (раннее выявление этой патологии может предотвратить развитие существенных неврологических осложнений; в России выявление этой патологии проводится по уровню ТТГ на пятый день жизни новорожденного);
- повреждение щитовидной железы аутоагрессивными иммуноглобулинами (приводит к развитию иммунного тиреоидита — болезни Хасимото — наиболее частой причины первичного тиреоидита);
- идиопатическая атрофия щитовидной железы (при ней часто выявляют антитиреоидные антитела, повреждающие тиреоидные клетки);
- воздействие радиоактивного йода на щитовидную железу (например, при лечении препаратами йода диффузного токсического зоба; гипотиреоз при этом развивается почти у 50% больных);
- субтотальная тиреоидэктомия;
- длительное применение антитиреоидных средств;
- дефицит йода в организме;
- феномен Вольфа-Чайкоффа: гипотиреоз, вызванный введением в организм препаратов йода (обычно в большой дозе). Развивается у пациентов с гипертиреозом (например, при тиреоидите Хасимото или диффузном токсическом зобе), а также у детей, матери которых во время беременности принимали препараты йода. Патогенез феномена Вольфа-Чайкоффа включает несколько взаимосвязанных звеньев. К числу основных среди них относят:
 - подавление окисления йодидов в их более реакционно-способную форму (вследствие угнетения активности йодидпероксидазы);
 - торможение связывания йодида с тирозильными остатками в молекуле тиреоглобулина и, как следствие — образование моно- и дийодтирозина;
 - ингибирование окислительной конденсации моно-и дийодтирозина в три- и

тетраiodтиронин вследствие подавления активности йодидпероксидазы; — снижение интенсивности гидролиза тиреоглобулина в тироцитах в результате снижения кинетических свойств протеаз и пептидаз.

Вторичный гипотиреоз развивается при поражении гипоталамо-гипофизарной системы. Это обуславливает недостаточное выделение, соответственно, тиролиберина и ТТГ с последующим снижением функций щитовидной железы.

Причины гипофизарного, гипоталамического и постжелезистого гипотиреоза.

К ним относятся:

- гипопитуитаризм различного происхождения (для развития гипотиреоза существенно уменьшение секреции ТТГ);
- дефекты синтеза, транспорта или взаимодействия тиролиберина с его рецепторами (что приводит к гипо-таламическому гипотиреозу);
- инактивация циркулирующих в крови Т3 и Т4, ТТГ (иммуноглобулинами, протеазами, чрезмерной связью с транспортными белками и др.);
- низкая чувствительность тканей к тиреоидным гормонам (например, при уменьшении числа рецепторов к ним и/или их чувствительности к Т3 и Т4);
- образование гормонально-неактивного гТ3 (реверсивного Т3).

Последние три группы вызывают постжелезистый гипотиреоз.

Основными клиническими формами гипотиреоза являются:

1. Кретинизм;
2. Микседема;
3. Гипотиреоидная кома.

Условия получения и хранения крови для ИФА.

При количественном анализе гормонов в лаборатории следует помнить, что: их концентрация может повышаться после приема пищи; содержание гормонов в крови подвержено влиянию суточных колебаний; ряд лекарственных препаратов влияет на концентрацию определяемых гормонов в крови, повышая или понижая их уровень; концентрация гормонов может изменяться на 10% и

более в зависимости от горизонтального или вертикального положения тела пациента при заборе крови, а также от предшествующей физической нагрузки; на определение концентрации гормонов влияет гемолиз крови, который возможен при длительном венозном застое, энергичной аспирации крови шприцем, воздействии на кровь после забора высокой или низкой температуры. Для определения концентрации гормонов ЩЖ обычно используют сыворотку венозной крови. При получении сыворотки нельзя допускать ее длительной экспозиции над форменными элементами крови, так как ряд гормонов может поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами, что в конечном итоге может привести к изменению их концентраций в исследуемой пробе. Кроме того, биологический полураспад некоторых гормонов настолько мал, что хранение сыворотки более 24 ч при комнатной температуре может значительно повлиять на результаты их количественного определения. Образец крови рекомендуется отстаивать при комнатной температуре в течение 1 ч для образования сгустка и затем центрифугировать со скоростью вращения 500–1000 g (1500–3000 об./мин) не более 15–20 мин. Высокая скорость вращения приводит к гемолизу сыворотки. Полученную сыворотку необходимо отделить от форменных элементов крови, перенести в пробирку и плотно закрыть ее крышкой. Липемическая или гемолизированная сыворотка не должна использоваться для анализа.

Образцы сывороток следует хранить: при комнатной температуре не более 6–8 ч; при +4°C в течение недели; при минус 20°C не более 3 мес. В пробах сыворотки крови происходит огромное количество процессов. Быстро размножающиеся бактерии и ферментативный гидролиз могут кардинально изменить состояние и содержание всех компонентов. Сыворотки, имеющие антитела к ТГ или к ТПО в высоких титрах, не стабильны. В процессе хранения без замораживания в этих пробах значительно изменяется концентрация ТТГ, а также свободных Т3 и Т4. Поэтому, повторив анализ через неделю, невозможно получить те же самые значения. Вероятно, это связано со способностью данных аутоантител фиксировать комплемент. Если анализ проводится не сразу, то

наиболее эффективным средством замедления и предотвращения таких изменений является замораживание. Однако даже при минус 20°C биологическая система не стабильна, поскольку сохраняется активность ряда ферментов. Поэтому даже в замороженном виде срок хранения сыворотки ограничен. Сыворотку непосредственно после получения помещают в пробирки с плотно закрывающимися крышками и быстро замораживают. При медленном замораживании в растворе могут образоваться кристаллы льда, которые способны разорвать молекулы некоторых анализируемых веществ, в частности белков. Замораживание проб сывороток удобно проводить в пластмассовых пробирках типа Эппендорф. Образцы замороженной сыворотки необходимо хранить в хорошо закрытых пробирках, так как потеря в образце влаги в замороженном состоянии может привести к концентрированию исследуемого вещества и получению в итоге ошибочного результата анализа. При размораживании сывороток следует избегать теплового шока образцов, который может наступить при переносе пробы с 24 температурой минус 20°C в комнатную температуру. Размораживание необходимо проводить медленно и постепенно. Накануне постановки анализа исследуемые сыворотки из морозильной камеры помещают в холодильник с температурой 4°C, где они размораживаются в течение всей ночи. На следующий день совместно с диагностическим набором их прогревают 1 ч до комнатной температуры. Перед постановкой анализа необходимо тщательно перемешать анализируемый образец, так как при размораживании проб в них может образоваться градиент концентрации сывороточных белков. Для получения правильных результатов анализа важно, чтобы набор реагентов и анализируемые образцы сывороток имели одинаковую (комнатную) температуру. Нужно помнить, что в диагностическом наборе реагентов калибровочные и контрольные образцы разлиты в пластмассовые флаконы в объеме, не превышающем 1 мл. Поэтому если сыворотки, предназначенные для анализа, разлиты в стеклянные пробирки или флаконы в объеме, превышающем объем калибраторов, то для выравнивания их температуры потребуется больше времени. Температура

исследуемых проб и калибраторов значительно сказывается на результатах определения свободных фракций Т3 и Т4, так как их анализ ведется при температуре, близкой к комнатной ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Размораживание и повторное замораживание отрицательно влияет практически на все биологические пробы. Существует ошибочное мнение, что такое воздействие не сказывается на уровне концентрации тиреоидных и стероидных гормонов, так как они находятся под «защитой» транспортных белков. Однако следует помнить, что под воздействием температурных перепадов белки, разрушаясь, перестают «защищать» гормоны, которые, освобождаясь, немедленно включаются в метаболическую цепь, что в конечном итоге приводит к неточным результатам их анализа. Поэтому повторное замораживание образцов применять не следует. Рекомендуется исследуемый образец сыворотки разделить на аликвоты, чтобы в случае необходимости повторить анализ была возможность использовать для его проведения пробу с одним циклом «замораживание-оттаивание».

Применение ИФА в диагностике эндокринных заболеваний.

Для диагностики эндокринных заболеваний применяется исследование уровня гормонов. В этом случае используется количественный иммуноферментный анализ. Для количественной оценки содержания антигена иммуноферментная тест-система содержит ряд стандартных растворов определяемого вещества с известными концентрациями. По результатам анализа стандартных растворов строят калибровочную кривую, отражающую зависимость оптической плотности от концентрации антигена. По калибровочной кривой, зная оптическую плотность опытной пробы, можно рассчитать концентрацию определяемого антигена. При использовании очищенного антигена его содержание может быть выражено в единицах концентрации — массовая единица/единица объема.

Рассмотрим применение методов ИФА на примере диагностики заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). Заболевания ЩЖ являются весьма распространенными и занимают после сахарного диабета второе место среди

всех эндокринных заболеваний. Появление методов иммуноферментного анализа явилось важной вехой в эндокринологии. Методы ИФА позволяют получить важную информацию о развитии патологии на доклиническом этапе и благодаря этому значительно повысить эффективность лечения.

В арсенале лабораторных методов диагностики *in vitro* заболеваний ЩЖ сегодня насчитывается девять наиболее часто выполняемых тестов. Это определение концентрации в сыворотке крови тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), общего и свободного тироксина (общ.Т4 и св.Т4), общего и свободного трийодтиронина (общ.Т3 и св.Т3), тироксинсвязывающих белков. Помимо определения тиреоидных гормонов наиболее значимыми в лабораторной диагностике являются определение аутоантител к тканям ЩЖ: антител к тиреоглобулину (Ат-ТГ), антител к тиреопероксидазе (Ат-ТПО), антител к ТТГ-рецепторам.

Ключевыми гормональными маркерами заболеваний ЩЖ являются ТТГ и свТ4. Уровень ТТГ в сыворотке крови — стратегический маркер функционального состояния ЩЖ. Тест первого уровня, ТТГ, необходим для дифференцировки состояния эути-реоза от гипо-и гипертиреоза.

Показаниями к назначению определения в крови содержания ТТГ являются: — скрининговое исследование ТТГ (его рекомендуется проводить не только у беременных и новорожденных, но и у взрослых в возрасте старше 35 лет (женщины) и 50 лет (мужчины) с интервалом в 5 лет);

— диагностика нарушений функций ЩЖ;

— подтверждение диагноза и дифференцировка форм центрального и периферического гипо- или гипертиреоза;

— скрининг врожденного гипотиреоза.

Содержание в крови ТТГ у здоровых лиц колеблется от 0.30 до 4.0 мМЕ/л (эутиреоидный диапазон).

Клиническое значение определения уровня ТТГ в диагностике заболеваний тиреоидного статуса:

- при первичном гипотиреозе наблюдается снижение концентрации тиреоидных гормонов Т3 и Т4 и патологическая секреция ТТГ;
- при вторичном гипотиреозе прекращается секреция ТТГ гипофизом, ЩЖ получает малое количество стимулов для синтеза Т3 и Т4;
- для дифференциации первичного и вторичного гипотиреоза используется ТРГ-стимулирующий тест (определяется тиреотропин-рилизинг гормон) или используются наборы ТТГ с чувствительностью не менее 0,01 мМЕ/л;
- при гиперфункции ЩЖ частично или полностью подавляется синтез ТТГ;
- у беременных и женщин, принимающих контрацептивы, наблюдается нормальный уровень ТТГ и повышенные уровни Т3 и Т4.

Патологический уровень ТТГ (ниже 0,1 и выше 10 мМЕ/л) параллельно с повышенными уровнями Т4 и (или) Т3 явно указывает на гипертиреоз, пониженный уровень Т4 подтверждает гипотиреоз.

Тест второго уровня, св.Т4, необходим для подтверждения наличия гипо- и гипертиреоза. Тироксин (Т4) продуцируется только клетками ЩЖ. Лишь незначительная часть (0,03% Т4) находится в свободной форме, но именно он обуславливает биологическую активность гормона. Поэтому диагностически важным является определение концентрации.

Показаниями к назначению определения в крови содержания св.Т4 являются:

- диагностика гипер- или гипофункции ЩЖ;
- наблюдение за состоянием больного во время лечения.

Клиническое значение определения уровня св.Т4 в диагностике заболеваний ЩЖ:

- при гипертиреозе концентрации св.Т4 повышена, концентрация ТТГ— понижена;
- на начальной стадии гипотиреоза концентрация св.Т4 понижается раньше концентрации общего Т4. Диагноз подтверждается в случае повышения концентрации ТТГ.

На концентрацию общего и свободного Т4 могут влиять следующие факторы:

- Повышение связывающей способности тироксинсвязывающего глобулина

(ТСГ), что может наблюдаться при приеме оральных контрацептивов, беременности, в периоде новорожденности, активной форме гепатита, при редкой (1 : 40000) генетической патологии.

- Понижение связывающей способности ТСГ, что встречается при циррозе печени или редкой генетической патологии.
- Изменение концентрации альбумина при гломерулярной потере белка.
- Наличие ингибиторов связывания: диабетический кетоацидоз, голодание, лечение гепарином, ацетилсалициловой кислотой, амиодароном, фенитоином, фенобарбиталом, карбамазепином.

Трийодтиронин (Т3). Около 80% общего количества Т3 образуется в результате дейодирования Т4 в периферических тканях (печени и почках), а 20% секретируется ЩЖ. Т3 связывается с рецепторами клеток-мишеней со сродством, в 10 раз превышающим сродство Т4. Содержание св.Т3 составляет около 0,3% от общего содержания гормона в сыворотке.

Содержание в крови общего Т3 у здоровых лиц находится в диапазоне 1.8-2,8 нмоль/л (0.8-2,0 нг/мл).

Концентрация св.Т3 не зависит от концентрации связывающих белков и составляет 4,49-9,3 нмоль/л (2,5-5,8 нг/мл).

Показанием к назначению определения в крови содержания Т3 является: подозрение на гипотиреоз (при нормальном уровне т4) или при нарушениях связывающей способности белков сыворотки.

У пожилых людей (у мужчин старше 60 и у женщин старше 70 лет) уровни Т3 на 10-50% ниже, чем у молодых. Это происходит в результате снижения скорости периферического расщепления Т4 в Т3. Кроме того, причинами снижения уровня Т3 могут быть следующие факторы: тяжелые общие заболевания; принятие лекарственных препаратов (глюкокортикоидов, пропранолола, амиодарона).

Во время беременности (особенно в 3-м триместре) концентрация Т3 может превышать в 1,5 раза нормальные значения. После родов уровень нормализуется в течение недели.

При дефиците йода наблюдается компенсаторное повышение уровней Т3. При гипотиреозе уровни Т3 могут длительное время находиться в районе нижнего предела нормы, так как повышенное периферическое превращение Т4 в Т3 компенсирует потерю Т4.

Маркеры аутоиммунной патологии — тиреоид-специфические антитела.

Большинство гипер- и гипофункций ЩЖ являются аутоиммунными заболеваниями. Наиболее хорошо известными компонентами ЩЖ (антигенами), к которым развиваются подобные иммунные реакции и вырабатываются антитела, являются тиреоглобулин (ТГ), фермент тиреоидная пероксидаза (ТПО) и рецепторы к ТТГ. Многие пациенты имеют только повышенные уровни анти-ТПО, некоторые только анти-ТГ. Частота определения отдельных видов антител у здоровых людей составляет: Ат-ТГ — 1%, Ат-ТПО — 5%, Ат к рецепторам ТТГ — 2%. При аутоиммунном тиреоидите Ат-ТГ обнаруживаются у 70% пациентов, Ат-ТПО — у 95% и Ат к рецепторам ТТГ — у 10%. При диффузном токсическом зобе Ат-ТГ положительны у 30% больных, Ат-ТПО — у 70% и Ат к рецепторам ТТГ — у 90%.

Антитела к тиреоглобулину, предшественнику Т3 и Т4, связывают тиреоглобулин, нарушая синтез гормонов и вызывая тем самым гипотиреоз. Определение Ат-ТГ проводится для оценки выраженности аутоиммунных реакций при заболеваниях ЩЖ. Антитела к тиреоглобулину, как и тиреоглобулин, являются маркерами рецидива дифференцированного рака щитовидной железы у больных после тиреоидэктомии.

Антитела к ТПО. Тиреоидная пероксидаза является основным компонентом тиреоидного микросомального антигена. В настоящее время обнаружена корреляция между содержанием Ат-ТПО в сыворотке и степенью уменьшения эхогенности тканей ЩЖ при ультразвуковом исследовании, что указывает на наличие диффузной лимфоидной ткани.

Показаниями к назначению определения в крови содержания Ат-ТПО и Ат-ТГ

являются:

- хронический тиреоидит (типа Хашимото);
- гипертиреоз у новорожденных;
- гипертиреоз (Базедова болезнь);
- эутиреоидный зоб (компенсированная стадия Базедовой болезни).

Антитела к ТТГ-рецепторам (общие и стимулирующие). Причиной развития диффузного токсического зоба (болезнь Грейвса) считается появление в крови больных особых иммуноглобулинов — аутоантител, специфически конкурирующих с ТТГ за связывание с рецепторами тиреоцитов и способных оказывать на щитовидную железу стимулирующее влияние, аналогичное ТТГ. Выявление высокого уровня аутоантител к ТТГ-рецепторам в крови больных с болезнью Грейвса является прогностическим предвестником рецидива заболевания (чувствительность — 85% и специфичность — 80%).

Аутоантитела к ТТГ-рецепторам в повышенных количествах могут быть обнаружены у больных с зобом Хашимото. Уровень аутоантител прогрессивно снижается при медикаментозном лечении этого заболевания или после тиреоидэктомии, что может быть использовано для контроля эффективности проводимого лечения

Интерпретация результатов определения гормонов щитовидной железы. Результаты определения концентрации гормонов, полученные в разных лабораториях с использованием диагностических наборов различных производителей, могут значительно отличаться. Поэтому при проведении анализа в лаборатории необходимо сверять полученные результаты с нормальными диагностическими показателями, указанными для данного типа тест-системы, единицы измерения гормонов в которых могут быть различными. Для диагностики функциональной активности ЩЖ рекомендуется использовать диагностические наборы полного ряда тиреоидных гормонов, произведенные одной фирмой. Многие клиницисты рекомендуют проводить скрининговое обследование пациентов по поводу патологии щитовидной железы, назначая им анализ на ТТГ, свободный Т4 и антитела к

ТГ. Но результатов этих анализов для надежного выявления наличия патологии ЩЖ у обследуемых лиц, как правило, недостаточно. Прежде всего потому, что скрининговым обследованием принято считать обследование большого количества условно здоровых лиц. В диагностических центрах нашей страны в основном проводят обследование лиц, обратившихся к специалистам по поводу того или иного недомогания. Поэтому такое скрининговое обследование может не выявить патологию ЩЖ.

Методы ИФА, используемые при определении гормонов.

Создание 30 лет назад метода включения фермента в антитело или определяемый антиген обеспечило быстрое развитие иммуноферментных методов иммуноанализа. Наиболее широко в качестве меченого компонента используются пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) получил наиболее широкое распространение при определении гормонов в эндокринологии. В качестве твердофазных носителей наиболее широко используются полистироловые микропланшеты. В ELISA используются конъюгаты антител с ферментом, которые, реагируя с соответствующими «хромогенными» субстратами, образуют окрашенные соединения с определенными оптическими характеристиками. Этот метод более производителен по сравнению 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 микропланшет, 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.

Чувствительность иммуноферментного анализа позволяет определять минимальные компоненты вещества (нанограммы). При использовании неконкурентного ИФА в системе присутствуют фиксированные на твердой

фазе антитела и соответствующие ему центры связывания (АГ) анализируемого соединения. После инкубации не прореагировавшие компоненты реакции удаляются отмыванием, после чего добавляется избыток меченых антител, специфичных этому же антигену. Продукт ферментативной реакции представляет собой тройной иммунный комплекс типа «сэндвич», иммобилизованный на твердой фазе. Количество продукта соответствует интенсивности получаемого окрашивания и прямо пропорционально количеству исследуемого соединения. «Сэндвич»-метод может быть использован для связывания только тех АГ, на поверхности которых имеется не менее 2 антигенных детерминант. Если на первой стадии иммуноферментного исследования одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (исследуемое соединение, меченное ферментом и фиксированное на твердой фазе), конкурирующий за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является конкурирующим. Среди конкурирующих методов возможны две схемы: прямой и непрямой метод. В прямом конкурирующем методе используются иммобилизованные на твердой фазе специфические АТ, к которым добавляют определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченных ферментом АГ, конкурирующие за связь с АТ. После инкубации и отмывки носителя определяют ферментативную активность образовавшихся иммунных комплексов. В непрямом конкурирующем анализе на твердой фазе фиксированы меченные ферментом АТ (конъюгат АГ-белок), к которому добавляют исследуемое вещество и фиксированную концентрацию немеченых специфических АТ. После инкубации и отмывки определяют ферментативную активность иммунных комплексов, образовавшихся на твердой фазе. Величина регистрируемого сигнала в прямом и непрямом конкурирующем анализе находится в пропорциональной зависимости от концентрации исследуемого вещества. Преимуществами прямого конкурирующего метода является минимальное количество этапов и возможность максимальной автоматизации исследования.

Но необходимо учитывать возможность влияния других компонентов образца на активность фермента.

В непрямом конкурирующем исследовании анализируемый образец и меченный реагент вводятся в систему на разных этапах, что исключает нежелательное искажение каталитических свойств ферментативной метки.

Сложности в клинической интерпретации результатов гормональных исследований обусловлены разнообразием коммерческих тест-систем, использованием калибраторов и контрольных материалов различных производителей. При сравнении референтных интервалов, представленных в инструкциях к тест-системам производителей, обнаруживаются существенные различия. Референтные интервалы часто не учитывают физиологические периоды изменения функциональной активности эндокринных желез.

В случае исследования половых гормонов иммуноферментный анализ крови в норме для женщин считается, если в организме выделяется лютеинизирующий гормон (ЛГ) в таких пределах: фолликулярная фаза цикла (с первого дня месячных до двенадцатого-четырнадцатого) – 2-14 мЕд/л; овуляционная фаза цикла (с двенадцатого дня по четырнадцатый день) – 24-150 мЕд/л; лютеиновая фаза цикла (с пятнадцатого-шестнадцатого дня и до начала следующих месячных) – 2-17 мЕд/л. Иммуноферментный анализ крови в норме для мужчин принимается, если половой гормон вырабатывается в пределах 0,5-10 мЕд/л. При исследовании хронического гонадотропина (ХГ) референтные значения зависят от пола человека. У взрослых мужчин и небеременных женщин при иммуноферментном анализе крови нормой считается уровень ХГ ниже 5 мЕд/мл. У беременных женщин результат зависит от срока беременности и может колебаться в пределах 25-49000 мЕд/мл. Иммуноферментный анализ крови исследует множество онкологических показателей. К ним можно отнести наличие пролактина, эстрадиола, прогестерона, тестостерона, стероидсвязывающего глобулина (ССГ) и других маркеров. Но интерпретация результата иммуноферментного анализа крови и норм этих показателей должна

проводиться только лечащим врачом. Кроме того, данный метод диагностирует инфекционные (например, краснуха, корь, туберкулез, герпес, сифилис, гепатит, псевдотуберкулез) и аутоиммунные заболевания разного вида, а также устанавливает иммунный статус человека. Но все показатели и полученные результаты должны расшифровываться квалифицированным специалистом.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ИммуноФА-ТТГ-плюс)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике Минздрава РФ (протокол №1 от 21 января 2002 г.).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИммуноФА-ТТГ-плюс предназначен для количественного определения содержания тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) при дифференциальной диагностике эутиреоидных и гипертиреоидных состояний щитовидной железы.

Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемого образца, 6 калибровочных проб и одной пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

Набор ИммуноФА-ТТГ-плюс может быть использован для уточнения концентрации ТТГ в диапазоне значений ниже границы нормы, наблюдения за эффективностью проводимой терапии гипертиреоза.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Принцип метода основан на двуцентровой схеме твердофазного иммуноферментного анализа с использованием двух типов моноклональных антител. На первой стадии анализа ТТГ связывается со специфическими к β -субъединице гормона антителами, иммобилизованными на твердой фазе; в процессе второй стадии моноклональные антитела к α -субъединице, конъюгированные с пероксидазой, реагируют с молекулами ТТГ, образовавшими иммунный комплекс с антителами на поверхности лунок. Количество связавшегося конъюгата выявляют с помощью субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Интенсивность окраски продуктов ферментативной реакции окисления субстрата прямо пропорциональна концентрации ТТГ, содержащегося в анализируемом образце. Концентрацию ТТГ в анализируемых пробах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания ТТГ в калибровочных пробах.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты :

- планшет 96-луночный полистироловый, стрипованный, покрытый моноклональными антителами к ТТГ, готовый для использования - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови теленка, содержащие известные количества ТТГ: 0; 0,15; 0,75; 1,1; 2,2; 4,4 мкМЕ/мл; концентрация ТТГ в калибровочных пробах может незначительно изменяться от серии к серии, точные значения концентраций указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 фл. (по 0,5 мл).

Калибровочные пробы ТТГ откалиброваны по Второму международному стандарту для ТТГ человека IRP 80/558;

- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови теленка с известным содержанием ТТГ, готовая для использования - 1 фл. (0,5 мл);

- конъюгат анти-ТТГ моноклональных антител с пероксидазой из корня хрена, готовый для использования - 1 фл. (12,5 мл);
- фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением твин-20, рН 7,0±0,5, концентрированный - 1 фл. (15 мл);
- раствор субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с добавлением перекиси водорода, готовый для использования - 1 фл. (12,5 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования - 1 фл. (15 мл);
- пленка для заклеивания планшета - 1 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Специфичность. Использование высокоаффинных моноклональных антител к ТТГ обеспечивает высокую специфичность анализа. Процент перекрестных реакций с лютеинизирующим, фолликулостимулирующим и хоригонадотропным гормонами не превышает 0,05 %. Система не реагирует с какими-либо другими компонентами сыворотки крови.

Чувствительность. Минимальная концентрация ТТГ, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,01 мкМЕ/мл.

Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации результатов определения содержания ТТГ в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 8 %.

Тест на «открытие». Процент открытия составляет 90 – 110 %.

Линейность. Линейность определения в диапазоне концентраций 0,15 – 4,4 мкМЕ/мл составляет 90 – 110 %.

Клиническая проверка набора. Концентрация ТТГ, исследованная с помощью набора ИммуноФА-ТТГ-плюс, в сыворотке крови 93 здоровых лиц в возрасте от 20 до 50 лет составила 0,25 – 3,5 мкМЕ/мл.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИммуноФА-ТТГ-плюс уточнить значения концентраций тиреотропина, соответствующие нормальным для обследуемого контингента.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-реагент действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы его следует немедленно тщательно смыть большим количеством проточной воды.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат суховоздушный на температуру $+37\pm 1^{\circ}$
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50-200 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объем жидкости 50-250 мкл;
- секундомер;
- шейкер;
- стакан химический или колба мерная вместимостью 300 мл;

- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная или салфетки марлевые;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре $+(20-25^{\circ}\text{C})$ в течение времени не менее 30 минут.

7.1. Приготовление промывочного буферного раствора (ФСБР).

Содержимое флакона с концентратом фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР) перенесли в мерный стакан вместимостью 300 мл, дважды ополоснули флакон дистиллированной водой, все промывные воды объединили с разведенным ФСБР и довели общий объем раствора до 300 мл дистиллированной водой.

Полученный рабочий раствор ФСБР может храниться в закрытой емкости не более 7 дней при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$.

Примечание. При хранении ФСБР могут образовываться кристаллы, поэтому перед отбором аликвоты ФСБР необходимо слабо подогреть флакон с буферным раствором, поместив его в водяную баню или термостат на температуру $+37^{\circ}\text{C}$ до полного растворения кристаллов.

8. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Внесение реагентов следует проводить согласно схеме на рис. 1.

8.1. В два ряда лунок планшета внесли в дубликатах по 100 мкл калибровочных проб (КП), начиная с минимальной концентрации.

8.2. В две лунки планшета внесли по 100 мкл контрольной сыворотки (КС).

8.3. В оставшиеся лунки внесли в дубликатах по 100 мкл исследуемых образцов сывороток крови (ИС).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КП1	КП1	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
B	КП2	КП2	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
C	КП3	КП3	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
D	КП4	КП4	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
E	КП5	КП5	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
F	КП6	КП6	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
G	КС	КС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС
H	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС	ИС

Рис. 1. Схема заполнения лунок планшета.

8.4. Плотно закрыли планшет крышкой или пленкой для заклеивания планшета и выдержали в течение 1 часа при комнатной температуре $+(20-25)^{\circ}\text{C}$ при постоянном перемешивании на шейкере.

8.5. Содержимое лунок удалили декантированием. Затем отмыли планшет. Для этого в каждую лунку планшета внесли по 250 мкл рабочего раствора ФСБР (см п. 7.1), оставили планшет на 1-2 мин, после чего удалили его содержимое декантированием. Процедуру повторили еще 2 раза. После этого тщательно удалили остатки влаги из лунок, несколько раз резко вытряхнув планшет о марлевую салфетку или фильтровальную бумагу.

8.6. Во все лунки планшета внесли по 100 мкл раствора конъюгата. Конъюгат вносили в лунки планшета в той же последовательности, что и калибровочные пробы, контрольную сыворотку и исследуемые образцы.

8.7. Плотно закрыли планшет крышкой или пленкой для заклеивания планшета и выдержали в течение 1 часа при комнатной температуре $+(20-25)^{\circ}\text{C}$ при постоянном перемешивании на шейкере.

8.8. Содержимое лунок удалили декантированием. Затем отмыли планшет согласно п. 8.5.

8.9. Внесли во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата в той же последовательности, что и конъюгат. Выдержали планшет в течение 10-15 минут при комнатной температуре в темноте.

Примечание. При внесении раствора субстрата рекомендуется всегда использовать новые наконечники.

8.10. Внесли во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата, по 100 мкл 0,2 М серной кислоты. Тщательно перемешали содержимое лунок, поместив планшет на шейкер при комнатной температуре в течение 1-2 минут.

8.11. Измерили оптическую плотность в лунках планшета при длине волны 450 нм. Процедура измерения оптической плотности не должна превышать 15 минут. Окраска в лунках планшета стабильна в темноте в течение 1 часа при комнатной температуре.

9. РАСЧЕТЫ

9.1. Построили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации ТТГ в калибровочных пробах. Образец калибровочного графика приведен на рис. 2.

9.2. Рассчитали средние арифметические значения показателей оптической плотности контрольной сыворотки и анализируемых образцов и по калибровочному графику определили концентрацию ТТГ.

9.3. При построении калибровочного графика и определении содержания ТТГ в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора иммуноферментных реакций рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

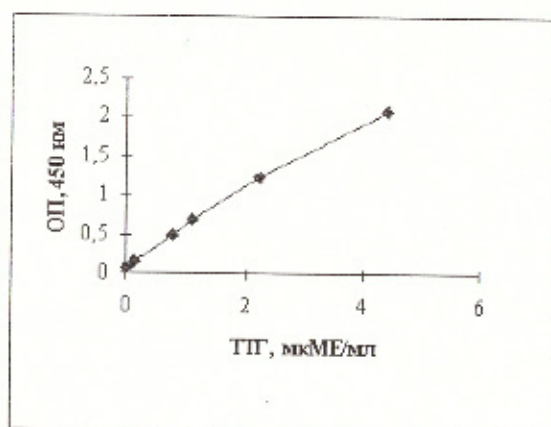


Рис. 2. Типичный калибровочный график, полученный с помощью набора ИммуноФА-ТТГ.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов ИммуноФА-ТТГ-плюс должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности - 12 мес. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 3 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре $+(20-25^{\circ}\text{C})$ в течение времени не менее 30 минут.

10.3. Калибровочные пробы, контрольную сыворотку и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора.

10.4. Промывочный буферный раствор (ФСБР) можно хранить в закрытой емкости при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

10.5. При использовании набора реагентов ИммуноФА-ТТГ-плюс построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.6. До проведения анализа возможно хранение образцов сывороток крови не более 3 дней при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ или в замороженном состоянии при температуре минус 20°C не более 2 мес.

Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сывороток крови.

10.7. Исключается использование для анализа гемолизированных и мутных образцов сывороток крови.

10.8. Для отбора и добавления реагентов необходимо использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

10.9. Не допускается использование стоп-реагента из наборов, производимых другими фирмами.

10.10. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Заключение:

В ходе проведенной научно-исследовательской работы была изучена эндокринная система, в частности, гормоны ЩЖ и ПЖ, заболевания данных желез, негативно воздействующих на остальные системы организма. Были изучены основные методы диагностики, и выявлено, что ИФА является наиболее высокочувствительным и специфичным методом для количественного определения гормонов в крови.

Список литературы:

1. Литвицкий П.Ф. Патофизиология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006. С. 383-386.
2. Gould B. Pathophysiology for the health profession. 3th Ed. Elsevier. 2006. R 690-694; 699-706.
3. Copstead L.-E., Banasik J. Pathophysiology. 4th Ed. Elsevier. 2010. R 31-733; 905-914; 922-925.
4. McCance K., Huenter S. Pathophysiology. The biologic basis for disease in adults and children. 5th Ed. Elsevier. 2006. R 735-862.
5. www.medicalj.ru/diacrisis/d-immunology/1025-ifa
6. Нечаев В.Н. Лабораторная диагностика заболеваний щитовидной железы // Справочник заведующего. — КДЛ, 2010. — № 6.
7. Долгов В.В., Шабалова И.П., Гитель Е.П. Лабораторная диагностика заболеваний щитовидной железы. — М.: Триада, 2002.
8. Дедов И.И. Диагностика заболеваний щитовидной железы. — М.: Видар-М, 2013.
9. <http://pmarchive.ru/prakticheskoe-primenenie-immunofermentnogo-analiza-v-diagnostike-zabolevanij/> (сайт со статьей) авторы статьи :Л.М. АНЦИЛЕВИЧ, Л.А. ЯГУДИНА Научно практический медицинский журнал "Практическая медицина" Учредителями издания являются ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» МЗ РФ и медицинский издательский дом ООО «Практика»
11. http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/GORMONI.html
12. <http://www.alkorbio.ru/funktsiyashchitovidnoyzelezi>
13. http://www.megamedportal.ru/articles/endokrinologiya/gormoni_shhitovidnoj_zhelezi.html
14. http://www.mediasphera.ru/uppic/Problems%20of%20endocrinology/2011/1/12/PEKR_2011_01_86.pdf
15. Самойленков П.В. Принципы иммуноферментного анализа, основные виды ИФА, применение в диагностике. — Москва, 2009, РГМУ.

16. Долгов В.В., Ракова Н.Г., Колупаев В.Е., Рытjikова Н.С. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. — М.-ТВЕРЬ: Триада. — 2007. — 320 с.
17. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Пронин В. Клиника и диагностика эндокринных нарушений. — М.: Триада, 2006.
- 18.. Таранов А.Г. Диагностические тест-системы (радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики). Новосибирск: НГУ, 2000. С. 146–156.
19. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Булатов А.А. и др. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М.: Наука, 1976. С. 171–222.
20. Клинова Т.В., Таранов А.Г. Диагностика заболеваний щитовидной железы. Актуальные вопросы современной медицины: Тезисы докладов VII науч.-практич. конф. врачей. Новосибирск, 1997. Т. 2. С. 66.
21. Клиническая эндокринология / Под ред. Н.Т. Старковой. М.: Медицина, 1991. С. 512.
22. Клиническая оценка лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица. М.: Медицина, 1986. С. 146.