

ДОСТУПНОСТЬ ЭПИТОПОВ ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ В ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ДИАГНОСТИКУМАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ

© 2019 г. Н. С. Кузьмина*, А. В. Зубков, В. В. Свиридов

*E-mail: ns_kuzim@mail.ru

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И. И. Мечникова», Москва, Россия

Поступила: 01.03.2019. Принята: 12.03.2019

Оценка циркулирующих аутоантител (ауто-Ат) к тиреоидной пероксидазе (ТПО) широко используется в клинике для выявления/подтверждения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Несмотря на значительные успехи в создании тестов для детекции ауто-Ат, вопросы их валидации, стандартизации методов привлекают пристальное внимание как разработчиков, так и пользователей. Сравнительные исследования уровня антител в сыворотке крови пациентов с диффузным токсическим зобом, аутоиммунным тиреоидитом при использовании наборов разных производителей показало, что расхождения связаны с эпитопной структурой ТПО, сорбированной на твердой фазе. Предлагается использование моноклональных антител для контроля антигенной структуры ТПО как процессе выделения нативного белка, так и изготовления тестов для анализа Ат к ТПО.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, аутоантитела, тиреоидная пероксидаза, моноклональные антитела

DOI: 10.31857/S102872210006626-3

Адрес: 105064 Москва, Малый Казенный пер., дом 5А, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», лаборатория иммунологической диагностики эндокринных заболеваний

Кузьмина Нина Сергеевна, Тел: +74959175242

E-mail: ns_kuzim@mail.ru

Авторы:

Кузьмина Н. С., к.б.н., в.н.с. лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Зубков А. В., к.м.н., заведующей лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Свиридов В. В., к.м.н., заведующей лабораторией клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение этиологии и патогенеза аутоиммунных заболеваний (АИЗ) щитовидной железы (ЩЖ) — одна из актуальных задач современной эндокринологии. По данным литературы наиболее значимыми в развитии аутоиммунных нарушений признаются антигены ЩЖ: тиреоглобулин (ТГ), тиреопероксидаза (ТПО) и рецептор

тиреотропного гормона (рТТГ). Аутоантитела (ауто-Ат) к ним в сыворотке крови пациентов с болезнью Грейвса, тиреоидитом Хашимото, послеродовым тиреоидитом, выявляются у большинства обследованных, а у лиц без видимых нарушений функции ЩЖ — у 5–26% [1]. Оценка циркулирующих ауто-Ат к ЩЖ используется в клинике для выявления/подтверждения аутоиммунной природы заболевания. Несмотря на значительные успехи в создании тестов для детекции ауто-Ат, вопросы их валидации, стандартизации методов привлекают пристальное внимание как разработчиков, так и пользователей [2].

В данной работе мы сфокусировали свое внимание на оценке эпитопной структуры тиреоидной пероксидазы, как возможного источника ошибок при количественном определении аутоантител к ТПО методом иммуноферментного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТПО выделяли из ткани щитовидной железы больных ДТЗ после оперативного её удаления.

Очистку препарата проводили аффинной хроматографией с использованием иммуносорбентов на основе полученных моноклональных антител (МкАТ) в качестве лигандов [3, 4]. Препараты ТПО контролировали методами ИФА с использованием сформированной панели МкАтк ТПО (36 гибридом-продуцентов); электрофореза в ПААГ, иммуноблоттинга. Препарат ТПО не содержал примесей ТГ. Ауто-АТ к ТПО определяли в иммуноферментном анализе. В качестве твердой фазы использовали полистироловые планшеты, сенсibilизированные высокоочищенной ТПО. Связавшиеся с антигенами сывороточные ауто-Ат выявляли конъюгатом меченых пероксидазой моноклональных антител к IgG человека, взятых в рабочем разведении. Калибровочные пробы готовили на основе пула образцов сыворотки крови человека и оценивали по международному стандарту Ат к ТПО – № 66/387. Чувствительность методов составляла 10 МЕ/мл, диапазон определяемых концентраций от 25 до 1000 МЕ/мл; коэффициент вариации не более 8%, линейность и открытие в пределах 90–110%.

Сыворотки крови доноров и больных с различными заболеваниями щитовидной железы были получены из различных клинико-диагностических лабораторий г. Москвы. Всего в исследовании проанализировано 100 образцов сыворотки крови практически здоровых лиц в возрасте 20–25 лет (50 образцов лица женского пола и 50 – мужского), 300 – сыворотки пациентов и АИТ и ДТЗ.

В сравнительных опытах использовали коммерческие иммуноферментные диагностикумы для определения Ат к ТПО ($n=3$), а также контрольные образцы сыворотки: № 1 – отрицательная сыворотка, уровень Ат к ТПО, соответствовал нормальным значениям (до 50 МЕ/мл), № 2 – положительная, содержащая Ат к ТПО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке диагностической значимости теста показано, что содержание антител в сыворотке крови здоровых лиц в группе женщин составлял $40,0 \pm 8,9$ МЕ/мл, у мужчин $25,1 \pm 5,93$ МЕ/мл. При этом референтные диапазоны концентрации антител для разных наборов варьируют от 10 до 50 МЕ/мл. В сыворотке крови больных в ДТЗ ($n=60$) Ат к ТПО выявлялись в 80% случаев и их концентрация составляла от 100 до 5000 МЕ/мл, Ат к при АИТ в 90% случаев (от 70 до 3000 МЕ/мл). Сравнение полученных данных при анализе контрольных образцов сы-

воротки показало, что при использовании всех наборов, в том числе и разработанного нами, в контрольной сыворотке № 1 было зарегистрировано нормальное содержание антител к ТПО, в сыворотке № 2 – обнаружены Ат к ТПО. Однако абсолютные значения содержания антител в сыворотках варьировали в широких пределах, несмотря на применение для стандартизации всеми производителями одного международного стандарта 66/387. Значение концентрации Ат к ТПО в отрицательной контрольной сыворотке варьировало от 0 до 47,3 МЕ/мл, а в положительной – от 66 до 606 МЕ/мл. Это может быть обусловлено различными причинами: методом выделения антигена (его чистотой, сохранностью пространственной структуры), чувствительностью метода, свойствами материала, используемого для иммобилизации антигена. Всё это, несомненно, сказывается на конформации сорбированного материала, свойствах и доступности эпитопов комплементарных паратопам антител. В работе [5] описано, при использовании силиконированных поверхностей меньше повреждается функциональная активность Ag и Ат.

Установлено, что наличие в белке ТПО незначительных примесей ТГ (до 2,5%) приводит к ложным результатам при оценке уровня антител к ТПО: к снижению уровня выявляемых Ат к ТПО в сыворотке с высокой концентрацией антител к ТГ (более 1000 МЕ/мл). Можно полагать, что примесь ТГ чисто стерически ограничивает возможность связывания анти-ТПО аутоантител с эпитопами, сорбированной на планшете ТПО. При сравнении результатов определения антител к ТПО разработанным набором с данными, полученными при использовании трех коммерческих тест-систем ИФА-Ат-ТПО коэффициент корреляции варьировал от 0,8 до 0,98. Тестирование 36 моноклональных антител к ТПО, полученных из среды культивирования гибридом, на планшетах из иммуноферментных наборов реактивов для определения Ат к ТПО показало, что 32 МкАт к ТПО определяли антигенные детерминанты, представленные на различных образцах пероксидазы щитовидной железы. Четыре МкАт (3, 27, 61 и 71), распознающие конформационные эпитопы тиреоидной пероксидазы, по-разному реагировали с иммобилизованной ТПО на планшетах разных наборов. С сорбированной на пластике ТПО из набора, с которым корреляция достигала 98%, реагировали все изученные МкАт, что позволяет сделать вывод о сходстве антигенной структуры ТПО в этих тестах. Причем, наименьшая сходимость результатов

(не более 70%) отмечена для иммуносорбента, с которым не реагировало МкАт 3. При изучении эпитопной специфичности аутоантител методом конкурентного ИФА с использованием коллекции МкАт к ТПО было показано, что МкАт 3 является уникальным: аутоантитела, присутствующие в сыворотке больных АИЗЖЖ, подавляли связывание МкАт к эпитопу3 на 80–100%. Полученные расхождения в результатах анализа аутоантител к ТПО, на наш взгляд, обусловлены несколькими факторами: свойствами МкАт и ТПО, сорбированной в лунках планшетов, и доступностью сайтов связывания Ат с Аг в пространстве. Выявленные с использованием МкАт различия в структуре ТПО, иммобилизованной на твердой фазе, могут объяснить расхождения в данных количественного определения аутоантител в ТПО в сыворотке крови при использовании реагентов разных производителей. Анализ литературных данных показывает, что коэффициент корреляции при определении аутоантител к ТПО разными диагностикумами не превышает 0,93 при сравнении данных по наличию/отсутствию Ат.

Весьма целесообразным и перспективным представляется использование моноклональных антител для контроля сохранности значимых

эпитопов ТПО в процессе её выделения и оценки их доступности на твердой фазе в изготовленных иммуноферментных диагностикумах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Czarnocka D., Eshler D. C., Godlewska, Nomer Y. Thyroid autoantibodies: thyroid peroxidase and thyroglobulin antibodies. In: Shoenfeld Y, Meroni PL, Gerswin MT (eds) Autoantibodies, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, 2014, 365–373.
2. Tozzoli R., Villalta D., Bizzaro N. Challenges in the Standardization of Autoantibody Testing: a Comprehensive Review. Clin. Rev. Allergy Immunol., 2017, 53(1), 68–77.
3. Кузьмина Н. С., Кузнецова Г. И., Яковлева И. В., Свиридов В. В., Буркин М. А., Мартынов А. И. Иммуноферментный метод определения аутоантител к пероксидазе щитовидной железы. Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2000, 1, 135–137.
4. Кузьмина Н. С., Яковлева И. В., Свиридов В. В., Зубков А. В., Кузнецова Г. И., Кириллова Г. А., Сергиенко О. В., Лукин В. Г., Буркин М. А., Летаров А. В., Лаврова Н. В., Рязанова Е. М. Моноклональные антитела к человеческой пероксидазе щитовидной железы. Биотехнология, 2005, № 1, 51–57
5. Butler J. E., Navarro P., Sun J. Adsorption-induced antigenic changes and their significance in ELISA and immunological disorders. Immunol. Invest. 1997, 26(1–2), 39–54.

THE STERIC AVAILABILITY OF THYROID PEROXIDASE EPITOPES IN ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE DETERMINATION OF AUTOANTIBODIES

© 2019 N. S. Kuzmina*, A. V. Zubkov, V. V. Sviridov

*E-mail: ns_kuzim@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Received: 01.03.2019. Accepted: 12.03.2019

Evaluation of circulating autoantibodies (auto-At) to thyroid peroxidase (TPO) is widely used in the clinic to identify / confirm autoimmune diseases of the thyroid gland. Despite significant progress in creating tests for auto-At detection, the issues of their validation, standardization of methods attract close attention of both developers and users. Comparative studies of the level of antibodies in the blood serum of patients with diffuse toxic goiter, autoimmune thyroiditis using diagnosticum of different manufacturers showed that the discrepancies are associated with the TPO epitope structure immobilized on the solid phase. It is proposed to use monoclonal antibodies to control the antigenic structure of TPO as the process of isolation of the native protein, and the production of tests for the analysis of At to TPO.

Key words: enzyme immunoassay, autoantibodies, thyroid peroxidase, monoclonal antibodies

Authors:

Kuzmina N. S., Ph.D., leading research worker, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia. E-mail: ns_kuzim@mail.ru;

Zubkov A. V., Ph.D., Head of the Laboratory for Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Sviridov V. V., Ph.D., Head of the Laboratory of Cell Hybrids, Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia.