

Тест-система для определения тиреотропного гормона в сухом пятне крови новорожденных методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа

Дубовская Л.В.¹, Вашкевич И.И.¹, Гусина Н.Б.², Зиновик А.В.², Свиридов О.В.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск,

²Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», г. Минск

Dubovskaya@iboch.bas-net.by

Тиреотропный гормон (ТТГ), продуцируемый передней долей гипофиза, стимулирует синтез и секрецию главного гормона щитовидной железы – 3,3',5,5'-тетрайод-L-тиронина (тироксин; T₄) и его высокоактивного аналога – 3,5,5'-трийод-L-тиронина. Низкомолекулярные тиреоидные гормоны действуют как регуляторы развития центральной нервной системы, и их дефицит приводит к неврологическим нарушениям и задержке психического развития ребенка. При врожденной недостаточности щитовидной железы уровень T₄ в крови падает, что по принципу обратной связи вызывает увеличение содержания ТТГ. Повышенная концентрация ТТГ в крови является надежным диагностическим показателем развития первичного гипотиреоза у новорожденных, который встречается с частотой 1 случай на 3500 – 4000 родов. Ранняя диагностика и своевременно начатое лечение врожденного гипотиреоза позволяет избежать развития инвалидности у ребенка. Определение ТТГ в сухом пятне крови при неонатальном скрининге имеет ряд преимуществ: простота сбора, подготовки, транспортирования и хранения образцов крови, минимальная инвазивность. В то же время ограничение объема анализируемого образца крови (~ 3 мкл) и, как следствие, количества определяемого вещества (менее 10⁻¹⁶ молей) предъявляет определенные требования к выбору метода детекции. Использование в качестве метящих реагентов хелатных комплексов ионов редкоземельных металлов (лантанидов), характеризующихся долгоживущей интенсивной флуоресценцией в ближней области видимого спектра и большим сдвигом Стокса (~ 300 нм), позволяет производить определения с высокой чувствительностью и в широком диапазоне концентраций. Измерение содержания ТТГ с помощью разработанной нами тест-системы, осуществляется в одну стадию с использованием пары моноклональных антител (МАТ) к двум независимым антигенным детерминантам на молекуле белкового гормона. В ходе анализа ТТГ, элюированный из бумажного диска, который высекается из сухого пятна крови, взаимодействует по одному из эпитопов с биотинилированным МАТ, иммобилизованным через биотинсвязывающий белок авидин (или стрептавидин) на стенках лунок полистирольного микропланшета. Одновременно протекает реакция связывания по второму эпитопу с другим МАТ, меченным хелатом Eu³⁺, в составе аналитического буферного раствора. Несвязавшиеся компоненты анализируемых проб удаляются промыванием. Добавление специального усиливающего раствора способствует высвобождению ионов европия из иммунного комплекса с последующим образованием сильно флуоресцирующих хелатов с компонентами раствора. Концентрация ТТГ в анализируемых пробах пропорциональна интенсивности измеряемой флуоресценции. Медико-аналитические исследования с использованием проб крови новорожденных с подтвержденным нормальным и гипотиреоидным статусом показали, что разработанная тест-система позволяет правильно определять ТТГ в диапазоне концентраций от 2 до 250 мкМЕ/мл крови.