ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАДРЕНКОРТИКОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ И КОРТИЗОЛОБРАЗУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Ю.М.Досин

Выявление антиадренкортикоцитарных антител (АКА) в крови человека свидетельствует о вовлечении в аутоиммунный процесс клеток коры надпочечников. Обладая специфичностью связывания с различными компонентами адренкортикоцитов, АКА не представляют собой абсолютно однородную популяцию.

Антиадренкортикоцитарные антитела против цитоплазматических компонентов клеток коры надпочечников, выявляемые у больных, являются маркерами, определяющими органоспецифичность поражения надпочечников при болезни Аддисона и связанную с ним функциональную недостаточность коры надпочечников.

Можно предположить, что при аутоиммунных заболеваниях с неорганоспецифической направленностью патологического процесса локализация мест связывания АКА может совпадать и с ядерным материалом клеток, т.е. с соответствующими регионами генного аппарата адренкортикоцитов, контролирующими синтез рецепторов и кортикоидных гормонов.

Разумеется, что это одно из предположений, оно схематично, но вполне обосновано, так как снижение функциональной активности коры надпочечников наблюдается при многих аутоиммунных заболеваниях, в частности при системных заболеваниях соединительной ткани (СЗСТ), что является доказанным фактом.

В связи с вышеизложенным, нами была поставлена задача исследовать АКА в крови больных СЗСТ, в частности при системной красной волчанке (СКВ), смешанном заболевании соединительной ткани (СзСТ) и первичном синдроме Шегрена (ПСШ), при которых они мало изучены [1], а также сравнить в указанных группах больных уровень сывороточного кортизола, отражающего функциональную активность надпочечников.

Решение данной задачи должно способствовать дифференцированному подходу в оценке иммунологического статуса больных СЗСТ, а также разработке схем гормональной терапии, сберегающей глюкокортикоидную функцию надпочечников при данной патологии.

Материал и методы исследования.

В качестве объекта исследования была взята сыворотка больных СЗСТ, в частности, СКВ (n=30), СзСТ (n=16), ПСШ (n=10) и здоровых людей (n=44).

При определении АКА в сыворотке крови больных СЗСТ использовалась технология непрямой иммунофлюоресценции, для выполнения которой требуются 1) коммерческие наборы фирма The Binding Site LTD (Англия), в которых в качестве субстрата используются гистологические срезы коры надпочечников обезьян (слайды) и 2) люминисцентный микроскоп типа МБИ 15У4.2 (Россия).

Метод включает обработку гистологических срезов коры надпочечников обезьян (слайдов) сывороткой больных и лиц контрольной группы (доноров). При наличии соответствующих антител в тестируемой сыворотке происходит взаимодействие антиген-антитело. После первой инкубации слайды промываются от несвязавшихся антител и вторично инкубируются с моноклональными антителами Ig G человека, мечеными FITC (флюоресцеин изотиоцианатом). Оценка результатов производится с помощью микроскопии в люминисцентном

режиме. Для определения типа свечения и спектра аутоантител используют соответствующие контрольные сыворотки.

Учет реакции производится по характеру морфологической картины свечения (ядерного, цитоплазматического, смешанного) клеток трех зон коркового слоя надпочечников:

- клубочковой зоны (zona glomerulosa), клетки которой группируются в округлые образования, секретируют минералокортикоиды
- пучковой зоны (zona fasciculata), клетки которой образуют систему тяжей перпендикулярно к капсуле надпочечников и являются источником выработки глюкокортикоидов
- сетчатой зоны (zona reticularis), представленной скоплениями небольших клеток в виде рыхлой сети, продуцирующих половые гормоны.

Метод непрямой иммунофлюоресценции – качественный и полуколичественный.

Оцениваются интенсивность свечения, тип флюоресценции и титры. Выраженность свечения определяется 1+, 2+, 3+, 4+ по шкале интенсивности (4+ - положительный контроль набора).

Наличие АКА в сыворотке крови больных СЗСТ (положительный результат), выражается в ярком яблочно-зеленом ядерном и цитоплазматическом свечении клеток одной из зон коркового слоя надпочечников или их сочетания, выраженность которого была сравнима с положительным коммерческим контролем. Интенсивность иммунофлюоресцентного свечения в группе больных СЗСТ была – 4+ – 3+ и выше.

В контрольных сыворотках (болезнь Аддисона) наблюдалось только цитоплазматическое свечение клеток.

Полуколичественная оценка получается в результате серии разведений тестируемой сыворотки до конечной точки, при которой флюоресценция не наблюдается.

Отсутствие в сыворотке крови АКА характеризовалось тусклой морфологической картиной грязно-зеленого цвета без иммунофлюоресценции. В группе контроля АКА не были обнаружены.

Для характеристики уровня кортизолобразующей функции коры надпочечников у больных СЗСТ использовались 1) коммерческие реактивы отечественного производства (ИБОХ НАНБ) для определения кортизола крови и 2) счетчик радиоактивности.

В основе метода лежит реакция иммунологического связывания исследуемого гормона с моноклональными специфическими антителами. Количество исследуемого в сыворотке крови кортизола определяют с помощью стандартной кривой, построенной по результатам конкурентного связывания гормонов в исследуемой сыворотке и гормона меченного радиоактивной меткой.

Результаты исследования.

При проведении исследований выявлялась различная частота определения АКА при различных формах СЗСТ, уровень их содержания в крови и выраженность связывания с различными зонами коры надпочечников (пучковой, клубочковой и сетчатой).

Антиадренкортикоцитарные антитела направлены против различных компонентов клеток коры надпочечников (ядерных и цитоплазматических антигенов), выявляются по нашим данным у больных системными заболеваниями соединительной ткани (СЗСТ) в 53,3 % случаев, причем наиболее часто у больных системной красной волчанкой СКВ (68,6 %), ПСШ (66,7%).

Согласно исследованиям базальный уровень кортизола при СЗСТ был снижен: при СКВ он составил $245,9 \pm 9,8$ нмоль/л ($n=23$), при ПСШ – $328,5 \pm 30,0$ нмоль/л ($n=30$), при СзСТ – $314,0 \pm 45,5$ нмоль/л ($n=10$), в отличие от дноров, у которых содержание кортизола в крови составило $461,7 \pm 16,9$ нмоль/л.

Приводим результаты исследования, устанавливающего взаимосвязь между наличием АКА в крови больных СЗСТ и состоянием кортизолобразующей функции коры надпочечников. Она характеризуется наиболее пониженной активностью при наличии в крови АКА, что выражается по сравнению с АКА–негативными сыворотками у больных и дноров достоверными различиями.

Таблица 1

Взаимосвязь выявления АКА крови и выработки надпочечниками кортизола у больных системными заболеваниями соединительной ткани

Исследуемые группы	АКА-позитивные	АКА-негативные
СКВ	$311,25 \pm 39,8$; $n = 16$; $p_1 < 0,02$; $p_2 < 0,05$	$445,7 \pm 47,65$; $n = 14$; $p_1 > 0,1$
СзСТ	$314,03 \pm 45,5$; $n = 10$; $p_1 < 0,02$; $p_2 < 0,05$	$426,98 \pm 9,5$; $n = 6$; $p_1 > 0,1$
ПСШ	$360,82 \pm 35,8$; $n=10$; $p_1 < 0,01$	–
Доноры	–	$461,7 \pm 16,9$; $n = 44$

Примечание:

1. p_1 - достоверные различия уровня кортизола при сравнении исследуемой группы и группы контроля;
2. p_2 - достоверные различия уровня кортизола у АКА- негативных и у АКА-позитивных больных

При отсутствии АКА в сыворотке больных СЗСТ уровень кортизола крови не отличался от данных контрольной группы.

Таким образом, определение содержания АКА в сыворотке крови больных СЗСТ является методом диагностики тяжести заболевания и выделения из числа заболевших группы пациентов с пониженной глюкокортикоидной функцией надпочечников для более активной базисной терапии.

В тоже время тактика лечения больных с отрицательными результатами выявления АКА должна учитывать имеющиеся естественные компенсаторно-приспособительные возможности коры надпочечников.

В связи с вышеизложенным, предлагается способ сочетающий непрямую иммунофлуоресценцию выявления АКА с радиоиммунным гормональным анализом, позволяющим исследовать в крови больных СЗСТ содержание кортизола.

Диагностический поиск может быть продолжен в направлении оценки компенсаторно-приспособительных возможностей коры надпочечников, проведения кортикотропинового (синактенового теста) и определения чувствительности центрального звена гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы к назначению преднизолон (преднизолоновый тест).

Предлагаемый способ направлен на улучшение диагностики (расширение представлений об аутоиммунном поражении, органов и систем при СЗСТ) и контроль за возможным развитием побочного действия ГК, в частности, развитием гипокортицизма.

Предлагаемая технология включает 2 этапа обследования больных СЗСТ:

1-й этап.

Оценка исходного уровня показателей предлагаемого лабораторного комплекса (определение содержания в сыворотке крови больных АКА с целью диагностики поражения коры надпочечников, определение содержания в крови кортизола и АКТГ).

2-й этап.

Исследование динамики аутоиммунной перестройки организма и глюкокортикоидной функции коры надпочечников по уровню в крови показателей АКА, АКТГ, кортизол и других гормонов крови у больных СЗСТ в процессе длительной терапии глюкокортикоидами (3 месяцев и более).

Таким образом, исследование антиадренокортикоцитарных антител при системных заболеваниях соединительной ткани расширяет клинико-лабораторные возможности характеристики аутоиммунного процесса и выбора адекватной глюкокортикостероидной терапии.

Литература

1. Дубень С.А. Диагностика аутоиммунного поражения коры надпочечников при системных заболеваниях соединительной ткани// Реценз. Сб. науч. Работ молодых ученых МГМИ – Минск, 2001.– с.146–150.