

Новый метод определения ДНК-связывающих аутоантител при аутоиммунном тиреоидите с использованием нанотехнологий

АНЧИКОВА Л.И., ПОДШИВАЛИНА Е.Ю., ВАГАПОВА Г.Р.,
КОНОВАЛОВА О.А., НАГУЛИН К.Ю., ВИНТЕР В.Г.,
ФАХРУЛЛИН Р.Ф., САЛАХОВ М. Х.

Казанская государственная медицинская академия
Казанский государственный университет

Проблема аутоиммунного тиреоидита (АИТ) до настоящего времени остается актуальной, так как вопросы этиологии, патогенеза, классификации, лечения не получили еще своего окончательного решения. АИТ считается одним из наиболее распространенных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) после йоддефицитных состояний (М. И. Балаболкин, 1997), колеблется с частотой 6 – 11 % (Н. А. Петунина, 1997) и является частой причиной развития первичного гипотиреоза (Э. П. Касаткина). Низкая специфичность инструментальных и лабораторных исследований затрудняет диагностику АИТ. При отсутствии одного из «больших» диагностических критериев, согласно «Клиническим рекомендациям Российской ассоциации эндокринологов по диагностике и лечению аутоиммунного тиреоидита» (И. И. Дедов и др., 2003), диагноз АИТ носит вероятный характер.

В литературе появились сведения о присутствии в сыворотке крови больных с аутоиммунными заболеваниями, в том числе ЩЖ, ДНК-связывающих антител, проявляющих ДНКазную активность, коррелирующих со степенью выраженности клинической картины болезни и лабораторных признаков аутоиммунного процесса (А. А. Белоусов и др., 2001; Л. П. Сашенко, 2001; В. Н. Бунева и др., 2003; О. А. Andrievskaya et al., 2002; G. A. Nevinsky et al., 2003).

Целью работы являлось изучение содержания аутоантител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных аутоиммунным тиреоидитом иммуноферментным методом в сравнении с использованием ДНК-иммуносенсора пьезокварцевого анализатора.

Проведено обследование 183 женщин в возрасте 18–50 лет, страдавших аутоиммунным тиреоидитом. Диагноз устанавливался на основании анализа клинической картины болезни, ультразвукового исследования (УЗИ) щитовидной железы, данных тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ, определения уровня антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО), оценки функционального состояния ЩЖ по содержанию тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (св.Т4) и свободного трийодтиронина (св.Т3) в сыворотке крови, которые определялись иммунохемилюминисцентным методом наборами «Immuline» на автоматическом анализаторе «Immuline» (США).

Определение уровня антител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови проводилось иммуноферментным методом (ИФА) на автоматическом анализаторе «EL 808 Bio-Tek Instruments, Inc.» с использованием наборов «IgG-Antibodies to double-stranded DNA», «IgG-Antibodies to single-stranded DNA» для количественного определения антител класса IgG («Orgentes», Германия).

Исследование аутоантител к нативной ДНК проводилось также новым методом с формированием ДНК-биосенсора и определением результатов на сконструированном аппарате — пьезокварцевом анализаторе на кафедрах спектроскопии и нанофотоники и общей физики Казанского государственного университета (доцентами К. Ю. Нагулиным и О. А. Коноваловой, ректор — профессор М. Х. Салахов) в газовом режиме и на кварцевых микровесах QCM — 200 фирмы Stanford Research Systems (США) в проточно-инжекционном режиме. Методики определения разрабатывались на кафедре биохимии КГУ (зав. кафедрой профессор В. Г. Винтер). Патент RU 2315313 от С2. Приоритет с 03.03.2006 года.

Статистический анализ проводился с использованием программы BIOSTATISTICA 4,03 (С. Ф. Гланц, 1999). Для описания признаков, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали структурные характеристики — медиану, 2,5 перцентиль, 97,5 перцентиль. Чувствительность критерия Стьюдента определяли, используя параметр нецентральности. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты определения антител в нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных аутоиммунным тиреоидитом. Кроме 183 пациентов с аутоиммунным тиреоидитом, обследовано 40 больных с эутиреоидным эндемическим зобом (ЭЭЗ), 15 больных с системной красной волчанкой (СКВ, положительный контроль), 30 здоровых лиц (отрицательный контроль).

Медиана содержания антител к денатурированной ДНК в группе больных АИТ в эутиреозе составила 4,7 МЕ/мл и не отличалась от показателей здоровых лиц — 4,3 МЕ/мл и больных ЭЭЗ — 5,8 МЕ/мл, но была ниже ($P < 0,05$

по критерию Дана) значений, наблюдавшихся у больных СКВ — 12,8 МЕ/мл.

При изучении уровня антител к денатурированной ДНК при АИТ в зависимости от функционального состояния щитовидной железы получено, что в состоянии субклинического и манифестного гипотиреоза этот показатель был значимо ниже (2,95 и 3,22, $P < 0,05$) по сравнению со здоровыми лицами (снижен на 34,3% и 28,4% соответственно). Чувствительность определения содержания антител к денатурированной ДНК в сыворотке крови методом ИФА для диагностики АИТ составила 50%. Следовательно, определение содержания антител к денатурированной ДНК в сыворотке крови больных АИТ методом ИФА обладает низкой чувствительностью и не может быть рекомендовано в качестве диагностического критерия данного заболевания.

Медиана содержания аутоантител к нативной ДНК в группе больных АИТ составила 6,3 МЕ/мл и была выше ($P < 0,05$ по критерию Дана) показателей здоровых лиц — 2,5 МЕ/мл и больных ЭЭЗ — 3,9 МЕ/мл, но ниже ($P < 0,05$ по критерию Дана) значений антител к нативной ДНК у больных СКВ — 25, 8 МЕ/мл.

Чувствительность определения антител к нативной ДНК для диагностики АИТ составила 94,5%. Следовательно, определение содержания антител к нативной ДНК в сыворотке крови методом ИФА позволяет дифференцировать АИТ от ЭЭЗ и от группы здоровых людей.

Поскольку известно, что относительные показатели имеют более высокую диагностическую чувствительность, то с целью повышения информативности исследования было проведено определение коэффициента отношения содержания антител к нативной ДНК и антител к денатурированной ДНК (АТ к нДНК / АТ к дДНК) в сыворотке крови. Медиана коэффициента данного отношения у больных АИТ составила 1,31 и не отличалась от значений больных СКВ — 1,62, но была выше ($P < 0,05$ по критерию Дана) показателей больных ЭЭЗ — 0,74 и здоровых лиц — 0,7.

Для оценки диагностической чувствительности определения коэффициента отношения АТ к нДНК/АТ к дДНК при АИТ использовался метод построения 95% доверительных интервалов, который показал, что в 95% случаев у больных АИТ указанный коэффициент был выше единицы, а у здоровых лиц и больных ЭЭЗ — ниже единицы ($P < 0,05$ по критерию Дана). Значимой разницы между величиной коэффициента отношения АТ к нДНК/АТ к дДНК группы больных ЭЭЗ и здоровых лиц не наблюдалось, так же как между показателями АИТ и СКВ.

Таким образом, определение коэффициента отношения содержания АТ к нДНК/АТ к дДНК в сыворотке крови является чувствительным критерием, позволяющим дифференцировать АИТ от ЭЭЗ и здоровых людей.

При изучении ДНК-связывающих антител к нативной ДНК в сыворотке крови иммуноферментным методом при АИТ в зависимости от функционального состояния щитовидной железы показано, что любые нарушения ее функции сопровождались увеличением вариабельности показателей антител к нативной ДНК в сторону повышения их значений, особенно при субклиническом и манифестном гипотиреозе.

Анализ величины отношения АТ к нДНК/АТ к дДНК выявил повышение указанного коэффициента во всех группах больных АИТ, независимо от функционального состояния ЩЖ по сравнению с больными ЭЭЗ и здоровыми лицами ($P < 0,05$ по критерию Дана). Максимальные значения указанного коэффициента отмечались у больных АИТ с субклиническим гипотиреозом — 1,92, минимальные

значения — у больных с эутиреозом — 1,31. Эти показатели сопоставимы с показателями при СКВ.

Таким образом, проведенные исследования показали наличие прямой зависимости между функциональным состоянием щитовидной железы и содержанием АТ к нДНК в сыворотке крови больных АИТ. Определение состава ДНК-связывающих антител у больных АИТ показало преобладание популяции АТ к нДНК, наиболее выраженное при субклиническом, манифестном гипотиреозе по сравнению с эутиреозом. Полученные результаты указывают на возможное участие АТ к нДНК в патогенезе аутоиммунной деструкции тиреоидной ткани с развитием гипотиреоза.

Далее были проанализированы колебания уровня ДНК-связывающих антител в сыворотке крови больных АИТ в зависимости от степени активности аутоиммунного процесса. Содержание антител к денатурированной ДНК при умеренной активности аутоиммунного процесса (титр антител к ТПО колебался от 100 до 500 МЕ/мл) составляло 3,63 МЕ/мл и не отличалось от показателей АТ к дДНК у лиц с активной стадией аутоиммунного процесса (титр антител к тиропероксидазе более 500 МЕ/мл) — 4,3 МЕ/мл. Полученные результаты исследования согласуются с предположением ряда исследователей об отсутствии патогенетического значения АТ к дДНК в развитии аутоиммунных заболеваний.

Уровень антител к нативной ДНК у больных АИТ с умеренной активностью аутоиммунного процесса составлял 5,55 МЕ/мл и был выше ($P < 0,05$ по критерию Дана) показателей здоровых лиц и больных ЭЭЗ, но не отличался от значений антител к нативной ДНК при АИТ с активной стадией аутоиммунного процесса и составлял 6,73 МЕ/мл.

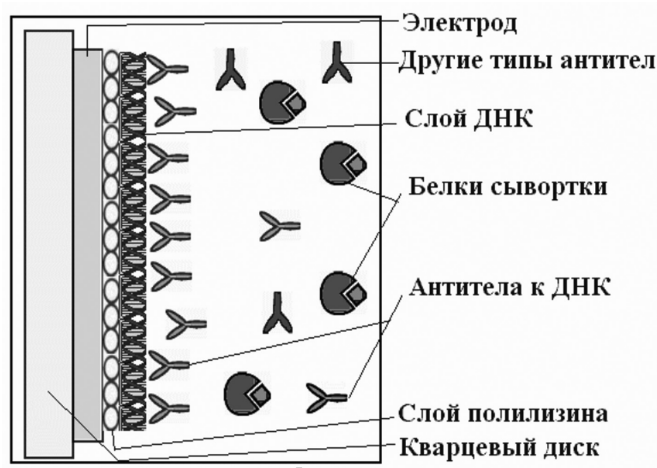


Рис. 1. Схематическое изображение пьезокварцевого ДНК-биосенсора

Корреляционный анализ показал наличие положительной, нелинейной связи между уровнем АТ к ТПО и АТ к нДНК в сыворотке крови больных АИТ (коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,99$, $P < 0,001$).

Результаты определения антител к нативной ДНК в сыворотке крови у больных АИТ, СКВ и здоровых лиц с использованием пьезокварцевого биосенсора в газовом и проточно-инжекционном режимах.

Сконструирован пьезокварцевый анализатор, разработана методика работы с ДНК-биосенсором (рис. 1) на

пьезокварцевом анализаторе в газовом, затем в проточно-инжекционном режимах.

Проведена иммунизация кроликов к нативной ДНК. Сыворотки иммунизированных кроликов протестированы на содержание антител к нативной ДНК с помощью пьезокварцевого анализатора (ДНК-иммуносенсора) в газовом режиме. Аналитическим сигналом служил сдвиг частоты колебаний пьезокварцевого резонатора при изменении массы биосенсора вследствие образования на электроде комплекса ДНК-антитело. Сдвиг частоты ДНК-биосенсора при анализе сывороток крови кроликов (разведение 1:50) после иммунизации составил $24,2 \pm 1,3$ Гц, что выше ($P < 0,01$) по сравнению с сыворотками до иммунизации — $6,1 \pm 2,2$ Гц. Таким образом, предварительные исследования сывороток иммунизированных кроликов показали возможность использования пьезокварцевого биосенсора для определения антител к нДНК в сыворотке крови.

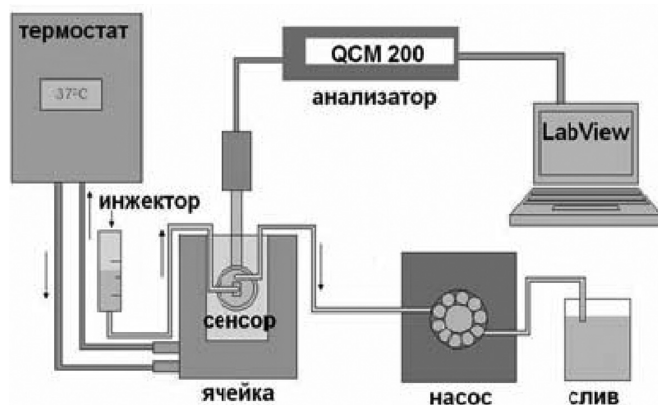
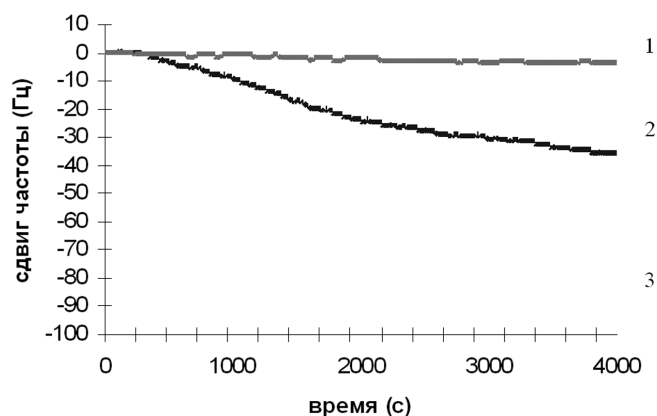


Рис. 2. Кварцевые микровесы для проведения анализа с использованием ДНК-биосенсора в проточно-инжекционном режиме

Следующим этапом проведены исследования с помощью ДНК-иммуносенсора на пьезокварцевом анализаторе в газовом режиме АТ к нДНК в сыворотке крови больных АИТ (15 пациентов), СКВ (5 больных) и здоровых лиц (10 человек). Все больные АИТ имели клинические и лабораторные подтверждения гипотиреоза и антитела к ТПО в сыворотке крови были более 500 МЕ/мл. Сдвиг частоты колебаний резонатора пьезокварцевого иммуносенсора после инкубации ДНК с сывороткой крови больных АИТ составил 122,1 Гц, с сывороткой крови СКВ — 168,7 Гц и в группе здоровых — 74,1 Гц. При этом сдвиг частоты колебаний резонатора в группе больных АИТ был выше ($P < 0,05$) значений, наблюдавшихся у здоровых лиц, но ниже показателей в группе больных СКВ ($P < 0,05$). Полученные результаты показали, что пьезокварцевый иммуносенсор обладает большей чувствительностью при определении антител к нативной ДНК в сыворотке крови больных, показывает больший диапазон показателей при различной аутоиммунной патологии по сравнению с группой здоровых и может использоваться для дифференциальной диагностики между АИТ, СКВ и здоровыми лицами.

Проточно-инжекционный режим работы (рис.2) является более перспективным и активно развивающимся направлением внедрения в клиническую практику нанотехнологий (Marx, 2003).

ДНК-иммуносенсор был апробирован в проточно-инжекционном режиме у 15 больных АИТ, страдающих гипотиреозом, у 5 больных СКВ и у 10 здоровых доноров. Титр антител к ТПО у больных АИТ был выше 500 МЕ/мл. Сдвиг частоты колебаний резонатора ДНК-биосенсора в группе больных АИТ составил 34,1 Гц и был выше ($P < 0,001$) по сравнению с показателями группы здоровых — 4,2 Гц, но ниже ($P < 0,01$) по сравнению с больными СКВ — 87,5 Гц. В процессе анализа различия в сдвиге частоты колебания резонатора пьезокварцевого иммуносенсора в зависимости от уровня антител к нативной ДНК становятся значимыми уже в течение первых 5 – 10 минут исследования (рис. 3).



1 — показатель АТ к нДНК в сыворотке крови здорового человека
2 — показатель АТ к нДНК в сыворотке крови больного АИТ
3 — показатель АТ к нДНК в сыворотке крови больного СКВ

Рис. 3. Сдвиг частоты колебаний ДНК-иммуносенсора пьезокварцевого анализатора (Гц) в проточно-инжекционном режиме:

Таким образом, результаты исследования антител к нативной ДНК в сыворотке крови больных АИТ и СКВ с использованием пьезокварцевого иммуносенсора подтверждают результаты исследования, полученные иммуноферментным методом. Однако, установлена более высокая чувствительность ДНК-иммуносенсора по сравнению с ИФА.

Выводы:

1. Истинная чувствительность определения содержания антител к нативной ДНК в сыворотке крови иммуноферментным методом и отношения АТ к нДНК/ АТ к дДНК для диагностики аутоиммунного тиреоидита составляет 94,5% и 100% соответственно, что делает возможным использование указанных показателей в качестве дополнительных лабораторных показателей для верификации диагноза заболевания.

2. Содержание антител к нативной ДНК в сыворотке крови аутоиммунным тиреоидитом положительно коррелирует с содержанием антител к ТПО, что позволяет использовать

определение антител к нДНК для оценки степени активности аутоиммунного процесса и риска развития аутоиммунного гипотиреоза.

3. Установлена более высокая чувствительность ДНК-иммуносенсора пьезокварцевого анализатора по сравнению с иммуноферментным методом.

4. Определение антител к нативной ДНК с использование ДНК-биосенсора пьезокварцевого анализатора является высоко чувствительным, высоко специфичным методом, экономичным во времени (экспресс-анализ), позволяющий дифференцировать АИТ с заболевания щитовидной железы неаутоиммунной природы и системную красную волчанку от показателей здоровых лиц. Исследование содержания антител к нДНК в сыворотке крови в динамике позволит контролировать течение заболевания и оценивать адекватность проводимого лечения.

5. У здоровых людей в сыворотке крови антитела к нативной ДНК содержатся в значительно меньшем количестве, чем при аутоиммунных заболеваниях, таких как АИТ и СКВ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Балаболкин М.И. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний: Руководство / М.И.Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Кремская. – М.: Медицина, 2002. – 752 с.
2. Добродеева Л.К. Аутоантитела у практически здоровых людей /Л.К. Добродеева, Г. А. Сулонова // Иммунология . – 1990. - № 2. – С. 52 – 55.
3. Madaio M. P. Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implication and applications / M. P. Madaio, K. Yanase // J Autoimmun. – 1998. – V. 11. – P. 535 – 538.
4. Zouali M. The structure of human lupus anti-DNA antibodies / Zouali M. // Methods. – 1997. – V. 11. – P. 27 – 35.

Роль тиреокальцитонина и паратиреоидного гормона в сохранении фосфатно-кальциевого гомеостаза

Н. Н. АРХИПОВА

Казанская государственная медицинская академия

Обсуждение функциональных взаимоотношений между тиреокальцитонином и паратиреоидным гормоном имеют почти вековую историю. Чаще всего эти гормоны упоминаются в контексте проблемы рахита детей раннего возраста, где одна из главных ролей в патогенезе патологического процесса отводится, как правило, витамину D.

Паратиреоидный гормон (ПТГ) — один из главных гормонов, регулирующих фосфатно-кальциевый гомеостаз. Основная функция ПТГ и в то же время важный стимулятор его секреции — концентрация ионизированного кальция (Ca^{2+}) в сыворотке крови. Механизм действия ПТГ складывается из нескольких моментов: усиление реабсорбции кальция в почках и, как следствие, снижение его выведения с мочой; повышение активности ренальной α -гидроксисилазы и стимуляция синтеза $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (таким образом ПТГ опосредовано оптимизирует всасывание кальция в тонком кишечнике); увеличение потери фосфата с мочой и снижение уровня фосфата крови. В экстремальных условиях гипокальциемии ПТГ стимулирует резорбцию костной ткани, что обуславливает выход «костного» кальция в кровь.

Сегодня считается, что быстрые и кратковременные изменения концентрации кальция компенсируются за счет действия гормона на костную ткань и в меньшей степени на выведение кальция почками. Долговременное сохра-

нение баланса кальция осуществляется за счет действия ПТГ на синтез $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ и, следовательно, на всасывание кальция в кишечнике. При прерывистом (квантовом) выделении ПТГ в кровь в физиологических условиях действие гормона имеет иную направленность: он стимулирует синтез коллагеновых белков кости и усиливает процесс ее формирования. В этом эффекте ПТГ принимает участие инсулиноподобный фактор роста-I (ИПФР-1), синтез которого он увеличивает.

Определяющим секреторную активность паратиреоидных желез (ПЩЖ) является Ca^{2+} , гипокальциемия стимулирует секрецию ПТГ, повышение Ca^{2+} в крови приводит к торможению его выработки. Влияние Ca^{2+} опосредуется цитозольным кальцием при участии кальций-чувствительного рецептора цитоплазматической мембраны. Кальций-чувствительный рецептор играет ключевую роль в поддержании гомеостаза кальция. Он был обнаружен не только в ПЩЖ, но и в других органах, в том числе и в почках, где он обеспечивает подавление реабсорбции кальция и гидрокарбоната в почечных канальцах при повышении Ca^{2+} в крови.

Роль ингибитора активности ПЩЖ наряду с внемочным кальцием выполняет также $1,25$ -дигидроксикальциферол, метаболит витамина D, специфические рецепторы к которому обнаружены в паратиреоцитах.