

УДК 57.083.3

А. М. Маймакова, к.м.н., *А. Д. Нурахова*, к.м.н., доцент,
Г. А. Косдаулетова, к.м.н.

Алматинский государственный медицинский институт
усовершенствования врачей
г. Алматы

К ВОПРОСУ О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

АННОТАЦИЯ

В статье освещены существующие на сегодняшний день серологические и иммунологические биомаркеры тканевой активности, исследуемые в том числе методом непрямой иммунофлуоресценции, которые способствуют улучшению ранней диагностики и мониторинга терапии у больных аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: биомаркеры тканевой активности, аутоиммунные заболевания.

Для развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ) необходимо наличие двух факторов: генетической предрасположенности и неблагоприятных условий окружающей среды. Практически все изученные АИЗ ассоциированы с тем или иным гаплотипом HLA. При органоспецифических заболеваниях особенно часто встречается гаплотип В8-DR3, хотя тиреоидит Хашимото чаще ассоциирован с DR5, а ревматоидный артрит (РА) - с DR4. Это подтверждает представление об участии нескольких генетических факторов в развитие АИЗ:

– во-первых, генов, определяющих общую предрасположенность к аутоиммунной патологии;

– во-вторых, генов, определяющих конкретную мишень для развития аутоиммунной реакции.

Тот факт, что в пределах одной семьи могут регистрироваться разные клинические формы АИЗ, свидетельствует о передаче по наследству лишь предрасположенности к аутоиммунизации. В настоящее время в связи с высокой частотой бактериально-вирусных инфекций их роль в развитии аутоагрессии является лидирующей. Инфекции могут вызывать развитие АИЗ через 2 механизма: молекулярную мимикрию и избыточную активацию аутореактивных лимфоцитов.

К АИЗ соединительной ткани (ревматические заболевания) относят более 120 нозологических форм, наиболее распространенными среди которых являются:

- миастения гравис,
- полимиозит (ПМ) или дерматомиозит (ДМ),
- ревматоидный артрит (РА),
- рассеянный склероз,
- синдром Шегрена (СШ),
- СКВ,
- системная склеродермия,
- смешанные заболевания соединительной ткани (СЗСТ),
- иногда антифосфолипидный синдром (АФС) и узелковый периартериит, хотя в большинстве публикаций последнего времени эти заболевания "открывают" группу системных васкулитов.

Из всех перечисленных заболеваний в мире наиболее распространен РА (около 1 % населения, среди женщин – около 3 %). На каждые 100 случаев РА приходится 25 случаев СКВ, 15 случаев – системной склеродермии, 10 случаев – ДМ и 3 случая – узелкового периартериита. К примеру, РА представляет собой наиболее частое воспалительное заболевание суставов, которое в большинстве случаев ведет к необратимой инвалидизации заболевших.

Среди европейцев его встречаемость достигает более 1 % всей популяции. Это заболевание характеризуется неумолимым прогрессирующим течением, хотя периоды ярких клинических проявлений чередуются с периодами относительного улучшения [1,2]. Последствиями РА является дегенерация суставного хряща с последующей эрозией кости, приводящая к значительному разрушению сустава и потере его функции.

Основной характеристикой одного из наиболее распространенных АИЗ – РА является воспаление сустава, приводящее к его повреждению и потере функции. Пациент попадает к ревматологу в среднем на 21-м месяце болезни, до этого он обращается к врачам других специальностей. К этому моменту у 60 % пациентов развиваются необратимые повреждения суставов, т.е. лучшее время для терапии упущено. Диагностика осложняется тем, что на ранних стадиях клинические признаки неспецифичны: слабость, усталость, апатия, депрессия, ночное потоотделение, повышенная чувствительность к изменениям погоды, утренняя скованность и боль в суставах, напряженность в мышцах. Ранняя диагностика РА и немедленное соответствующее лечение очень важны для предупреждения полного повреждения сустава. Диагностика РА в первую очередь основывается на клинической манифестации. До настоящего момента серологические исследования были ограничены определением аутоантитела (аутоАТ) к ревматоидному фактору (РФ).

Хотя диагноз РА устанавливается прежде всего на основании клинических данных, иммунологические тесты включены в качестве одного из 7 пунктов клинических критериев РА Американского колледжа ревматологов 1987 г.

Основными методами лабораторной диагностики АИЗ являются: непрямая иммунофлуоресценция (НИФ), иммуноферментный анализ и иммуноблот. На практике для точного описания спектра аутоАТ, присутствующих в биологической жидкости, используется несколько методов, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. В итоге интерпретация результатов исследования одного лабораторного показателя зависит от метода, с помощью которого он определен.

Выделяют прямую и непрямую иммунофлуоресценцию. Метод прямой иммунофлуоресцен-

ции используется для обнаружения отложений Ig и факторов комплемента в биоптатах кожи и почек. НИФ применяется для обнаружения АТ в сыворотке крови и других биологических жидкостях. При этом сыворотка больного в серийных разведениях инкубируется с клетками или тканью-мишенью на предметном стекле. После связывания аутоАТ с мишенями комплексы выявляют с помощью флуоресцентных антисывороток, направленных против Ig человека. Лучшим объектом для НИФ признана клеточная линия HEp-2, которая существенно улучшает чувствительность теста за счет яркой флуоресценции даже при значительных разведениях сыворотки больного, а большое, богатое эухроматином ядро позволяет точно описать тип свечения. Результат оценивается с помощью люминесцентного микроскопа. При обнаружении антиядерного фактора (АНФ) окрашиваются ядра клеток. При выявлении антинейтрофильных АТ свечение локализуется в цитоплазме нейтрофилов. Преимуществом НИФ является возможность оценки одновременного связывания аутоАТ со всем разнообразием АГ, которое имеется в тканевом субстрате. Следует отметить, что этот метод требует очень высокой квалификации лаборанта. Недостатками метода являются субъективность учета результатов и трудоемкость.

На сегодняшний день существуют определенные приборы, позволяющие улучшить процесс диагностики АИЗ. В том числе аппарат "AKLIDES" фирмы "MEDIPAN", который представляет собой автоматическую систему анализа результатов непрямого иммунофлуоресценции, основанную на клеточном строении. Данное оборудование приобретено Алма-тинским государственным институтом усовершенствования врачей (АГИУВ). AKLIDES обеспечивает: полностью автоматизированный скрининг; количественное определение; архивирование результатов; воспроизведение и отражение образцов в отчетах; изображение картины в живом режиме; подключение к ЛИС(LIMS). Модулярная система прибора состоит из следующих компонентов: флуоресцентного микроскопа; светодиодного источника света; подвижного стола с пробями; камеры. Аппарат имеет следующие технические данные: длина – 65 см, ширина – 67 см, высота – 32 см, вес – 76,6 кг, ПК с программным

обеспечением AKLIDES. Флуоресцентный микроскоп - фокусировка (z-оси), смена объектива и фильтра происходит полностью автоматически при помощи компьютера. Стол проб - при помощи полностью автоматизированного компьютерного управления происходит передвижение стола с пробами в направлении осей x и y. Стол располагает местом для 4-х планшетов-носителей объектов. Светодиодное возбуждение флуоресценции – светодиодный источник света для возбуждения флуоресценции с 2 световодами. Продолжительность эксплуатации светодиодов, не требующих сервисного обслуживания, составляет более 10 тыс. часов. Камера системы AKLIDES очень чувствительна, оснащена CCD-сенсором, управляется автоматически с помощью компьютера. Программное обеспечение AKLIDES является сердцем системы и обеспечивает оптимальное изображение и обработку картины, полученную в результате непрямой иммунофлуоресценции, которые полностью автоматически оцениваются. Сохранение изображений, во-первых, дает возможность архивирования результатов тестов и создания базы данных пациентов, а также составление и сохранение протоколов с образцами картин. Полностью автоматизированное изображение картин осуществляется за счет управления и изменения позиции проведения съемок в направлении x-оси и y-оси, фокусировки (z-направления) и приемом сигналов флуоресценции. Обработка картины - программное обеспечение AKLIDES просчитывает образцы флуоресценции, обеспечивает объективное распознавание образцов флуоресценции. На основе интенсивности специфических образцов флуоресценции определяется концентрация аутоантител. Программное обеспечение AKLIDES анализирует интенсивность и структуру сигналов флуоресценции. Необходимо решить, является ли результат положительным или отрицательным, определяется цитозольная локализация ядра и дается оценка флуоресценции АНА, сравниваемая с 5-ю базовыми моделями. При этом впервые появилась возможность стандартизации иммунофлуоресценции в обычной лаборатории. Сохранение образца картины: программное обеспечение AKLIDES автоматически сохраняет картины флуоресценции и результата каждой пробы. Таким образом, на много лет обеспечивается дигитальное архивирование и сохранение ре-

зультатов анализа, обоснованного на образцах базовых моделей. Экспорт картин тестов и образцов осуществляется в виде отчета, сохраненного как файл pdf-формата. При этом оборудование AKLIDES фирмы "MEDIPAN" обеспечивает:

- полностью автоматизированный скрининг;
- количественный подсчет согласно специфическим образцам;
- полностью автоматизированное проведение анализа с выдачей результата одного теста менее чем за 1 мин. (экономия времени и материалов);
- изображение живой картины среза тканей или образцов тканей, взятых из живых организмов (человека или животного);
- объективное распознавание образцов;
- сравнение результатов между лабораториями;
- совместимость с программным обеспечением лаборатории LIMS (стандартизация, улучшение качества и гарантия постановки наиболее вероятного и/или установки правильного диагноза);
- архивирование результатов (создание и сохранение базы данных пациентов в банке данных).

Данный прибор позволяет исследовать различные показатели, как: ANAplus; nDNA; cANCA; pANCA; AMA; ASMA; AAA; ASA; EmA; ICA; SkMA; CMA; ATA и др.

Лабораторная диагностика ревматических заболеваний включает определение аутоАТ, Ig, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), компонентов системы комплемента, белков острой фазы воспаления, показателей дисфункции/повреждения эндотелия, генетических маркеров, маркеров костного метаболизма. Основными диагностическими маркерами ревматических заболеваний в качестве первичных (скрининговых) серологических тестов, рекомендованных Международным комитетом по стандартизации методов, являются антиядерные АТ (АЯА), АТ к нейтрофильным цитоплазматическим АГ (ANCA), антифосфолипидные АТ, ревматоидный фактор, АТ к циклическому цитруллинированному пептиду. В качестве вторичных (подтверждающих) предлагаются тесты для определения АТ к ДНК, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, β 2-гликопротеину I (β 2-ГП I). При назначении лабораторных тестов, связанных с анализом аутоАТ, следует

учитывать, что скрининговые тесты должны обладать высокой диагностической чувствительностью, а подтверждающие тесты – высокой диагностической специфичностью.

Большинство аутоАТ не являются специфичными для какого-либо заболевания, они обнаруживаются в различных комбинациях. Закономерность той или иной комбинации различных присутствующих АТ и их концентрации с учётом клинической картины является полезным диагностическим средством в лечении ревматоидных АИЗ.

Согласно рекомендациям АСР по стандартизации методов лабораторной иммунодиагностики ревматических заболеваний 2004 г. основным скрининговым методом определения АЯА считается НИФ с использованием в качестве субстрата криостатных срезов мышечной или крысиной печени (почек), либо клеток линии НЕР-2 (эпителиальных клеток рака горлани человека). Применение стандартизованных НЕР-2 клеток предпочтительнее, так как позволяет существенно повысить чувствительность метода и достоверно описать различные типы свечения ядра. При тестировании АЯА методом НИФ их традиционно обозначают как АНФ. Оценка результатов НИФ проводится с указанием максимального титра обнаружения АНФ в исследуемых сыворотках, а также интенсивности и типа иммунофлуоресценции. Характер свечения отражает присутствие различных типов АЯА, в определенной степени специфичных для некоторых ревматоидных АИЗ. Описано более 40 типов свечения ядра клетки, но в практической работе обычно используется всего 6: гомогенный, периферичес-

кий, гранулярный, ядрышковый, центромерный и цитоплазматический.

Так, периферический тип свечения обнаруживается у больных с АТ к ядерной мембране и выявляется преимущественно у больных с СКВ. Негативный результат исследования АЯА методом НИФ не исключает наличия АТ к dsDNA, поскольку эти АГ могут быть замаскированы. Более того, уровень АЯА, определенный методом НИФ, имеет только слабую корреляцию с тяжестью заболевания.

Несмотря на то, что исследование АЯА методом ИФА в некоторых случаях увеличивает процент ложноположительных результатов и не может полностью заменить тестирование АНФ методом НИФ, в настоящее время этот метод получил широкое распространение в качестве первичного скринингового теста, так как ИФА доступен и прост в исполнении, а также исключает субъективный фактор, связанный с визуальной оценкой результатов. У пациентов с положительными результатами определения АЯА методом ИФА рекомендуется проведение подтверждающих тестов на специфические АЯА к отдельным ядерным и цитоплазматическим АГ (dsDNA, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, РНП), используя ИФА или иммуноблот.

Существующие на сегодняшний день литературные данные позволяют рекомендовать внедрение в клиническую практику сочетание серологических и иммунологических биомаркеров тканевой активности, исследуемые в том числе методом НИФ, для улучшения ранней диагностики и мониторинга терапии у больных аутоиммунными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1 *Беляева И. Б., Латин С. В., Созина А. В., Мазуров В. И., Тотолян А. А.* Антитела к цитруллин-содержащим антигенам в диагностике и прогнозировании течения раннего ревматоидного артрита // *Медицинская иммунология.* – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 77- 84 .

2 *Соколова В. В., Латин С. В., Москалев А. В., Мазуров В. И.* Клинико-иммунологические взаимосвязи при раннем ревматоидном артрите // *Медицинская иммунология.* – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 601-610 .

ТҮЙІН

Мақалада бүгінгі таңдағы серологиялық және иммунологиялық биомаркерлердің ұлпа белсенділігін зерттеуі оның ішінде иммунофлуоресценттік тікелей емес тәсілмен, аутоиммундық аурулардың ерте диагностикасымен емдеу мониторингін жақсарту мүмкіндігін дәлелдейді.

Түйінді сөздер: тіндік белсенділіктің биомаркерлері, аутоиммундық аурулар.

SUMMARY

The article highlights current serological and immunological biomarkers of tissue activity, which are examined by indirect immunofluorescence method, which contributes to improved early diagnostics and monitoring of therapy in patients with autoimmune diseases.

Key words: biomarkers of tissue activity, autoimmune diseases.