

С.В.МИХАЙЛЮК,
Е.Н.ШАВРОВА,
Т.В.ВОРОНЦОВА,
О.О.ЯНОВИЧ

Научно-исследовательский
клинический институт
радиационной медицины
и эндокринологии,
г. Минск, Беларусь

УДК 616.153.96-097-078.33:543.426

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ВСТРЕЧНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ

Предложено определять аутоантитела к эпителиальным клеткам тимуса с помощью метода встречной иммунодиффузии в геле. В основе метода лежит образование иммунопреципитата вследствие реагирования аутоантител, находящихся в испытуемой сыворотке, и тимическим антигеном, полученным из тимуса погибшего новорожденного. Были определены уровни аутоантител к эпителиальным клеткам тимуса у детей и подростков с тиропатологией и у практически здоровых детей (контроль). Установлено, что 80,1 % детей с аутоиммунным тиреоидитом; 41,7 % - с тиреоидной карциномой; 12,7 % - с эндемическим узловым зобом и 3,2 % практически здоровых детей имели аутоантитела к эпителиальным клеткам тимуса в диагностических титрах (1:16 и >)

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутоантитела, тимус, тиропатология, методы определения. Иммунопатология, аллергол., инфектол. 2000, 4: 27 стр.

DETERMINATION OF AUTOANTIBODIES TO ANTIGENS OF THYMIC EPITHELIAL CELLS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH THYROPATHOLOGY BY THE METHOD OF IMMUNODIFFUSION IN GEL.

*S.V. Mikhailiuk, E.N.Shavrova, T.V. Vorontsova, O.O. Janovich
Research and Clinical Institute of Radiation Medicine & Endocrinology, Minsk, Belarus*

The authors propose determination of autoantibodies interacting with epithelial cells of the thymus by the method of immunodiffusion in gel. The method is based on immunoprecipitation evaluation of interaction between the serum autoantibodies examined in different dilutions, and thymic antigen from thymus of children. Autoantibodies to thymic epithelial cells were studied in children and adolescents with thyroid pathology and healthy children (control group). The results showed that 80,1% children with autoimmune thyroiditis; 41,2% - with thyroid carcinoma; 12,7% - with endemic goiter, and only 3,2% children of the control group had autoantibodies to thymic epithelial cells in diagnostic titres (1:16 and more).

KEY WORDS: autoantibodies, thymus, thyropathology, methods of determination. Immunopathol., allergol., infectol. 2000, 4: 27 p.

Увеличение титров аутоантител к эпителиальным клеткам тимуса выявлено при многих аутоиммунных болезнях и процессах: ревматизме [8, 9, 12), генерализованной миастении [4, 7, 16), диабете [4), аутоиммунном хроническом гепатите [4, 16), а также у лиц, подвергшихся воздействию радиационных факторов [2, 5, 6, 13).

Предполагается, что повреждение эпителиальных структур тимуса под влиянием антител является первым этапом возникновения различных аутоиммунных болезней и процессов, так как при этом нарушается эндокринная и иммунорегуляторная функция тимуса [4, 8, 16). В конечном итоге это ведет к развитию транзиторных или вторичных иммунодефицитов [6, 8, 13]. Факт выявления аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса может служить ранним признаком или критерием аутоиммунизации; частота выявления и уровни аутоантител указывают на их роль в этиопатогенезе различных заболеваний, а также служит основанием для назначения и проведения курсов иммуномодулирующей терапии [4, 13, 14, 16]. Следует отметить также, что частота аутоиммунных болезней и возникновение процесса аутоиммунизации при заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы, в том числе и при тиропатологии, в последние годы неуклонно возрастает [4]. Последнее связано с ухудшением экологической обстановки, длительным воздействием на организм химических, радиационных и других неблагоприятных факторов, вызывающих различного рода дисфункции и со стороны тимуса [4, 7, 16].

Целью данного исследования была разработка метода для выявления аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса и определение их уровней при ряде заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) у детей и подростков.

Материалы и методы. В работе использованы: реакция преципитации, метод встречной иммунодиффузии в геле [15]; определение концентрации белка по методу Лоури [3]; статистические методы (определение средней арифметической, ее ошибки, *t*-критерия) [11]. Уровни антител к эпителиальным клеткам тимуса определены у 51 ребенка с раком ЩЖ, у 60 детей с аутоиммунным тирозитом (АИТ), у 47 пациентов с эндемическим эутиреоидным узловым зобом и у 31 практически здорового ребенка и подростка (контроль).

Антитела к эпителиальным клеткам тимуса определяют путем непрямой иммунофлюорес-

ценции, методом проточной цитофлюориметрии или иммуноферментного анализа [1, 5] с использованием дорогостоящей аппаратуры и реактивов. Нами для титрования антител к антигенам тимуса использован феномен преципитации и, в частности, метод двойной иммунодиффузии в геле. Предварительно был получен тимический антиген человека (ТАЧ) и наработаны специфические антитимические сыворотки.

1. Получение тимического антигена человека.

Использовали тимус погибших новорожденных детей. Секционный материал был предоставлен кафедрой патологической анатомии Минского государственного медицинского института и хранился при температуре - 50 °С. Тимус разрезали на кусочки, тщательно промывали в проточной воде, а затем трехкратно в стерильном физиологическом растворе. Затем ткань гомогенизировали в стеклянном механическом гомогенизаторе на льду до получения однородной массы. Полученный гомогенат фильтровали через двойной капроновый фильтр, количество клеток в гомогенате составляло 11млн/мл; концентрация белка по методу Лоури - 19,8 мг/мл.

Полученный фильтрат подвергали 3-х разовому замораживанию-оттаиванию при температуре -50 °С с интервалом в 15 минут с последующим центрифугированием в течение 15 минут при 1000 об/мин. В супернатанте измеряли концентрацию белка по методу Лоури, которая составила 12 мг/мл. Данную фракцию приняли за тимический антиген (ТАЧ), который хранили при температуре - 50 °С.

2. Получение мышинной антитимической (анти-ТАЧ) сыворотки.

Для получения антитимической сыворотки беспородных мышей массой 18-20 г иммунизировали препаратом ТАЧ [10]. Провели 5 внутрибрюшинных еженедельных инъекций антигена (по 0,2 мл). ТАЧ для инъекций предварительно последовательно разводили до концентрации 640 мкг/мл, пропустили через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Для первичной иммунизации брали 60-70 мкг белка ТАЧ на мышь; при последующих иммунизациях доза составляла 30-40 мкг белка. Иммунные антисыворотки получали из крови животных общепринятым методом [15]. Полученные сыворотки хранили при температуре - 20 °С.

Определение уровня специфических аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тиму-

са проводили посредством реакции преципитации методом двойной встречной иммунодиффузии в геле. Для приготовления 2% геля использовали агар Дифко. В качестве растворителя использовали 0,15 М NaCl. Полученный агар распределяли на предметных стеклах толщиной 1,5 мм. В агаре металлическим пробойником пробивали лунки диаметром 2 мм на расстоянии 5 мм друг от друга. В центральную лунку помещали 5 мкл раствора ТАЧ в концентрации 300 мкг/мл, а в боковые лунки разведения специфической сыворотки от 1:2 до 1:128 в объеме 5 мкл. Интенсивность преципитации оценивали в плюсах. Определяли наибольшее разведение сыворотки, вызывающее преципитацию на ++, которое принимали за титр аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса. Титр антител к антигенам эпителиальных клеток тимуса человека в мышинных специфических сыворотках составил 1:32, а в сыворотках интактных мышей он колебался от 1:2 до 1:8.

Результаты и обсуждение.

При титровании сывороток детей из контрольной группы установлено, что титры антител к антигенам эпителиальных клеток тимуса у 80,6% обследованных колебались от 1:2 до 1:4; у 16,2% - 1:8 и только у 3,2% - 1:16 (табл.1, рис.1). Средний уровень антител (\bar{X} (m)) у детей

этой группы составил 4,7(0,5 у.ед. Поскольку в контрольной группе максимально определяемый титр аутоантител к антигенам тимуса составил 1:16 и был выявлен только у 3,2% практически здоровых детей, (а также в связи с тем, что в сыворотках интактных мышей он составил 1:8) мы приняли этот уровень (1:16) аутоантител за диагностический. В группе детей с раком ЩЖ антитела к ТАЧ выявлялись в титрах от 1:2 до 1:32, при этом 41,3% обследованных детей имели титр антител к ТАЧ 1:16 - 1:32. Средний уровень антител к ТАЧ в этой группе (11,8(0,97 у.ед.) значительно ($p(0,001)$) превышал контрольный уровень. Но самый высокий уровень антител к ТАЧ был зарегистрирован у детей с АИТ. У 80,1% обследованных из этой группы титр антитимических антител составил 1:16 - 1:64. Средний титр аутоантител у детей этой группы (20,6(1,4 у.ед.) существенно ($p(0,001)$) превышал аналогичный показатель не только в контрольной группе, но и у детей с раком ЩЖ. У детей с зобом как средний уровень антитимических аутоантител (7,1(0,54 у.ед.), так и индивидуальные максимальные и минимальные титры (от 1:2 до 1:16) были самыми низкими в сравнении с детьми, страдающими другой тиропатологией. Однако по сравнению с контрольной группой средний уровень антитимических антител у детей с зобом был также существенно ($p(0,001)$) выше.

Таблица 1

Частота встречаемости антитимических антител у детей при заболеваниях ЩЖ

Разведение сывороток	Рак (%)	АИТ (%)	Эндем. Эутир. узловой зоб (%)	Контроль (%)
1/2	1,9	1,6	6,4	22,6
1/4	15,6	-	36,2	58
1/8	41,3	18,3	44,7	16,2
1/16	35,3	43,4	12,7	3,2
1/32	5,9	33,4	-	-
1/64	-	3,3	-	-

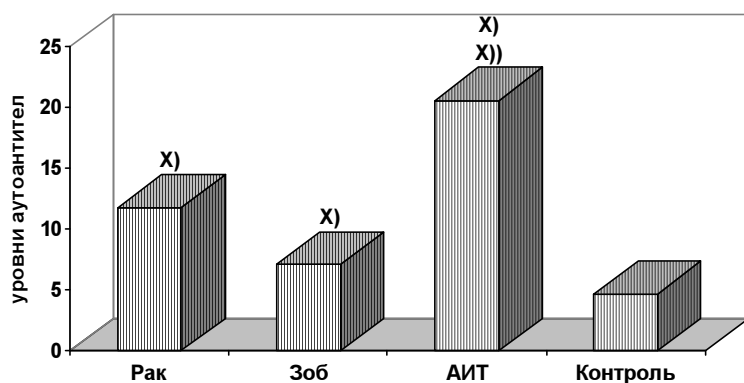


РИС. 1.

Уровни антитимических антител* у детей с заболеваниями ЩЖ.

ПРИМЕЧАНИЕ: x - средняя арифметическая величин, обратных титру x) - различия достоверны ($p(0,001)$) в сравнении с контролем x)) - различия достоверны ($p(0,001)$) в сравнении с другими видами тиропатологии

Таким образом установлено, что у детей с АИТ антитимические антитела в диагностическом титре (1:16 и выше) выявляются у большинства обследованных (80,1%) и при наиболее высоком среднем уровне (20,6(1,4 у.ед.). У детей с раком ЩЖ аутоантитела к антигенам тимуса определяются в 2 раза реже (у 41,2% обследованных) и при существенно более низком среднем уровне (11,8(0,97 у.ед.) в сравнении с детьми с АИТ. Значительно реже и в более низком среднем титре (7,1(0,54 у.ед.) антитимические антитела регистрируются у детей с зобом (у 12,7% обследованных).

На основании полученных нами результатов и принимая во внимание данные литературы по патогенетической, прогностической и диагностической роли аутоантител к эпителиальным клеткам тимуса [2, 3, 6, 7, 8, 12, 13, 14], можно предположить, что обнаружение антитимических антител в диагностических титрах и более при АИТ и раке ЩЖ указывает на наличие аутоиммунного процесса по отношению к тимусу при этих заболеваниях ЩЖ. У обследованных детей и подростков высока вероятность развития (или наличия) вторичных иммунодефицитов, поскольку аутоиммунный процесс, направленный против эпителиальных клеток тимуса, спо-

собствует нарушению иммунорегуляторной и эндокринной функции вилочковой железы [3, 12, 13]. Предполагается также, что обнаружение в диагностических титрах аутоантител к тканевым антигенам тимуса, также как и аутоантител к антигенам ЩЖ, у практически здоровых детей и подростков может служить критерием для формирования групп риска по развитию патологии тимуса и ЩЖ.

Выводы

1. Предложен способ для определения аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса, основанный на феномене иммунопреципитации.

2. Установлено, что 80,1 % детей и подростков с аутоиммунным тиреоидитом; 41,2 % детей с раком ЩЖ; 12,7 % пациентов с эндемическим эутиреоидным узловым зобом имеют аутоантитела к эпителиальным клеткам тимуса в диагностических титрах, что указывает на развитие или наличие процессов аутоиммунизации.

3. Факт выявления аутоантител к эпителиальным клеткам тимуса в диагностических титрах у практически здоровых лиц может быть критерием для формирования групп риска по развитию патологии тимуса и ЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков И.М., Ярилин А.А., Гнездицкая Э.В., Кузьменок О.И. Определение аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса у больных в отдаленный период после облучения методом иммунофлюоресценции Сб. Всесоюз. конф. "Иммунный статус человека и радиация". - М. - 1991. - с. 31-32.
2. Беляков И.М., Ярилин А.А., Кузьменок О.И., Гнездицкая Э.В., Белецкая Л.В. Определение аутоантител к антигенам эпителиальных клеток тимуса у ликвидаторов и больных, перенесших острую лучевую болезнь в отдаленный период после облучения // Радиобиология. - 1992. - Т. 32. - № 3. - с.341-348.
3. Досон Р.Д., Эллиот Д. Справочник биохимика. - М., Мир. - 1991. - 543 с.
4. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. - М., Медицина: 1990-Т. 1, 2, 3.
5. Кузьменок О.И. Лучевое поражение эпителиальных клеток тимуса // Автореф. дисс... к. м. н. - М. - 1993. -24 с.
6. Кузьменок О.И., Ярилин А.А., Шарова Н.И. Иммуноферментный метод определения аутоантител к эпителиальным клеткам тимуса. Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. II.- Минск: Белорусский центр научной медицинской информации, 1997.- С. 40.
7. Кемелева З. Вилочковая железа. - М. -1984. - 252 с. .
8. Лямперт И.М. Аутоантитела, реагирующие с базальным эпителием кожи и эндокринным эпителием тимуса - первый этап возникновения различных аутоиммунных процессов. // Иммунология. - 1988. - № 4. - С. 5-11.
9. Лямперт И.М. Иммунологические механизмы, имеющие значение при возникновении аутоиммунного процесса. //Вестн. Акад. мед. наук СССР. - 1988. - № 5. - С.12-20.
10. Ратнер Г.М. Поликлональные антитела как реагент для иммуноанализа: получение, характеристика, применение // Автореф. дисс.... док.мед.наук. - Томск.- 1996.-26 с.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. -Минск.-1967. - 327 с.
12. Рыжикова Е.В., Спирина Г.В., Черкасов В.Л. и др. Антитела, реагирующие с эпителиальными клетками тимуса и кожи, в сыворотках больных ревматизмом и рожей. //Вестн. АМН СССР. - 1986. - С.45-49.