

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АУТОАНТИТЕЛ НА ОСНОВЕ МИКРОСОМНЫХ ФРАКЦИЙ СТЕРОИД-ПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКА И ГОНАД ЧЕЛОВЕКА

УДК 616

© П. П. Хохлов, П. Д. Шабанов

ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

аутоантитела; иммуноферментный анализ; надпочечник; репродукция; аутоиммунные болезни

Резюме:

Целью работы было конструирование твердофазных иммуноферментных тест-систем для количественного определения аутоантител, специфичных к иммунореактивным структурам стероид-продуцирующих клеток человека. В качестве иммобилизуемых на твердой фазе антигенов были использованы микросомные фракции надпочечника человека, клеток Лейдига мужчин и клеток гранулезного слоя яичника женщин соответственно. Использование биопсийного материала гонад и надпочечника человека, стандартизованных фракций антител пациентов с аутоиммунными поражениями надпочечника и гонад позволили сконструировать твердофазные иммуноферментные тест-системы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью к органоспецифичным аутоантителам с аутоиммунными заболеваниями. Тест-системы с использованием в качестве иммобилизованных антигенов микросомальных фракций стероид-продуцирующих клеток гонад и надпочечника человека обладают необходимой чувствительностью, надежностью и точностью анализа, предъявляемым к диагностическим иммуноферментным тест-системам.

В последнее десятилетие расширяется как порочность аутоиммунных заболеваний, так и относительная доля пациентов, страдающих подобного рода болезнями [1, 6]. При таком положении вещей актуальность дифференциальной лабораторной диагностики аутоиммунных болезней и болезней с аутоиммунным компонентом только возрастает.

В клинической лабораторной практике существуют качественные методы диагностики органоспецифических аутоиммунных поражений надпочечника и гонад человека. Методы основаны на иммуногистохимическом определении органо- и тканеспецифичных аутоантител [2]. Данные методы имеют качественный характер, поэтому при оценке результатов возможен определенный субъективизм, который связан с квалификацией и опытом врача лаборатор-

ной диагностики. С помощью иммуногистохимических методов в свое время была выявлена аутоиммунная реактивность эндокринных клеток яичника в случаях синдрома поликистозных яичников, преждевременной недостаточности яичника у женщин, иммунореактивности эндокринных клеток гонад при нарушениях репродуктивной функции у мужчин, а также отдельной или сочетанной иммунореактивности надпочечника и гонад у мужчин и подростков при гипогонадизме и задержке полового созревания [9]. Существующие количественные иммуноферментные тест-системы (ELISA-kits) созданы для определения аутоантител, специфичных к структурам герминативных клеток, в частности к zona pellucida яйцеклеток, сперматогониям и сперматоцитам и т. д. [5]. Среди различного рода молекулярных и субклеточных структур, которые являются объектами (мишенями) аутоиммунной агрессии, особо следует выделять так называемые микросомные ферменты [3, 4]. Поэтому конструирование высокочувствительных тест-систем для количественного определения аутоантител, специфичных к клеткам коры надпочечника и эндокринным клеткам гонад человека, не только актуально, но и практически важно.

Целью работы было конструирование твердофазных иммуноферментных тест-систем для количественного определения аутоантител, специфичных к иммунореактивным структурам стероид-продуцирующих клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные реагенты и оборудование. В качестве химических реагентов были использованы: антитела моноклональные диагностические против легких и тяжелых полипептидных цепей иммуноглобулинов человека (ФСР 42-0190-0593, ЦНИРРИ, Санкт-Петербург); глицерин (квалификации не ниже чда); альбумин сывороточный бычий (БСА); натрий углекислый (все неорганические соли квалификации не ниже чда); натрий углекислый, кислый; натрий фосфорнокислый двузамещенный; натрий хлористый; калий фосфорнокислый однозамещенный; раствор хромогена — тетраметилбензидина (ТМБ) для приготовления рабочего раствора для прове-

дения цветной реакции (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург); кислота соляная чда или хч. Субстрат — раствор пероксида водорода для приготовления рабочего раствора для проведения цветной реакции (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Для проведения иммуноферментных реакций использовали микропланшеты для иммуноферментного анализа (АО «Пластполимер», Санкт-Петербург).

Измерения поглощения растворов выполняли на спектрофотометре СФ-46 (Россия). Непрерывные градиенты плотности приготавливали при помощи миксера (GM-40) с использованием сухого Ficoll-400 (Farmacia, Швеция). Вертикальный оптический абсорбциометр («ридер») с количественной регистрацией оптического поглощения при длине волны 450 нм. Для определения общего белка в растворе применяли фотометрический метод Варбурга, колориметрический метод Бредфорд.

Выделение антигенов. Образцы тканей надпочечника получали в ходе хирургической операции частичной адреналэктомии, образцы тканей яичка — в ходе хирургической операции по изменению пола, образцы тканей яичника — в ходе процедуры диагностической лапароскопии. Не использованные в ходе диагностических процедур ткани яичника использовали для выделения антигена. Для получения образцов сывороток забирали кровь из локтевой вены пациента в сухую пробирку, в течение 1 ч давали образоваться сгустку, центрифугировали пробу при комнатной температуре в течение 10 мин при 100 g. Взятие клинико-лабораторного материала, сведения из истории болезни и лабораторные показатели были получены совместно с лечащими врачами Санкт-Петербургской МАПО МЗиСР, НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН и ГУЗ «Городской центр профилактики и лечения невынашивания беременности» Санкт-Петербурга. Процедуры взятия образцов биопсийного материала эндокринных органов и проб периферической крови полностью соответствовали стандартам этических комитетов соответствующих клинических учреждений, за исключением случаев, когда материал был взят до вывода соответствующего постановления МЗиСР. Детальное изложение методик опубликовано ранее [3, 4].

Полученный целевой антиген ковалентно связывали с поверхностью лунок микропланшета. Для приготовления рабочего раствора антигена маточный раствор постепенно размораживали и разводили карбонат-бикарбонатным бикарбонатным раствором, рН 9,6. Для связывания с поверхностью лунок микропланшетов соответствующий антиген разводили 1%-м раствором бикарбоната аммония до конечной концентрации общего белка для овариального антигена — от 15,6 нг/мл до 16 мкг/мл. Раствор антигена вносили в лунки микропланшета и проводили инкубацию при +4 °С в течение 16 ч.

В качестве связывающего (сшивающего) бифункционального агента использовали 0,25%-й раствор глутарового альдегида. После проведения реакции связывания микропланшет промывали и высушивали при 37 °С в течение трех часов.

После иммобилизации антигена проводили «покрытие» поверхности лунок 1%-м раствором БСА для блокирования свободных центров адсорбции на поверхности микропланшета. После процедуры блокирования микропланшет высушивали при 37 °С в течение 48 ч и далее, при необходимости, хранили при +4 °С во влагонепроницаемой упаковке. Далее процедуру твердофазного ИФА проводили согласно традиционной схеме иммуноферментного анализа антител.

Получение стандартов специфичных аутоантител. Ввиду отсутствия сертифицированного референтного материала, калибровочные материалы для предложенных методов были приготовлены на основе внутренних стандартов («in house») антител соответствующих специфичностей. Стандартные препараты антител готовили из предварительно отобранных сывороток крови пациентов, у которых были выявлены антитела к соответствующему антигену. Положительные контрольные сыворотки для определения антител получали от пациентов, которым были поставлены клинические диагнозы аутоиммунного поражения яичника для женщин, недостаточность надпочечника и гипогонадизм или (и) задержка полового созревания для мужчин и подростков. Диагнозы были подтверждены клиническими и лабораторными данными в отношении местных и системных воспалительных реакций. В качестве контрольных были использованы сыворотки 156 пациентов. В качестве отрицательных контролей использовали сыворотки 34 женщин с нормальной динамикой менструального цикла и 59 мужчин с нормальной половой функцией и фертильностью. Одновременно учитывали нормальный характер эндокринных профилей для пациентов обоих полов.

Стандартный препарат антител готовили из предварительно отобранных сывороток крови пациентов, у которых были выявлены антитела к соответствующему антигену (овариальному, тестикулярному, адренокортикальному, эндометриальному), демонстрирующие в ИФА оптическую плотность не менее 0,9. Отобранные образцы сывороток крови человека соединяли вместе (делали «пул») и выделяли иммуноглобулиновую фракцию путем ионообменной хроматографии согласно общепринятой методике выделения антител.

Проведение иммуноферментного анализа. При приготовлении вспомогательных реагентов для ИФА маточный раствор иммуноферментного конъюгата разводили в 120 раз. Карбонатный буферный раствор с концентрацией 0,1М и рН9,6 готовили соответственно стандартной прописи. Калий-натрий-фосфатный буферный раствор с концентрацией

0,01 М и рН 7,4 готовили соответственно стандартной прописи. ЗФР готовили путем добавления к предыдущему раствору хлористого натрия до конечной концентрации 0,15 М. Промывочный раствор готовили путем добавления к ЗФР детергента твина-20 до конечной концентрации 0,5%. Дилуэнт I готовили на основе ЗФР путем добавления сухого бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной концентрации 0,5%. Дилуэнт II готовили на основе ПР путем добавления БСА до конечной концентрации 0,3%. Стоп-раствор готовили путем приготовления 9%-го водного раствора из концентрированной соляной кислоты. Рабочий раствор для проведения цветной реакции готовили путем смешивания равных объемов коммерческих реагентов «реагент» и «субстрат».

В качестве фермента использовали очищенную бактериальную коллагеназу (коммерческий препарат «коллизин» производства НИИ вакцин и сывороток, Санкт-Петербург). Концентрированный маточный раствор соответствующего антигена: овариального, эндометриального или тестикулярного разводили до конечной концентрации 0,5–1,2 мкг/мл относительно общего белка. Концентрированный маточный раствор моноклональных антител, меченых пероксидазой хрена, разводили в 100–150 раз растворителем «дилуэнт II».

Кривые зависимости оптической плотности от концентрации антител (калибровочные кривые) строили в двойных логарифмических координатах с выравниванием кривой путем spline-преобразования с помощью пакета программ типа «FIA-CALC» фирмы «Wallac» в режиме построения калибровочной кривой в Log/Log координатах. Концентрации антител в образцах в Е/мл рассчитывали с помощью того же пакета прикладных программ. Статистическую обработку количественных показателей проводили с использованием пакетов прикладных программ NCSS Statistical and Data Analysis 2004 и Statistica 6.0. Расчет статистических критериев был реализован в модулях Nonlinear regression, Nonparametrics/Disturb, Multiple regression и ANOVA/MANOVA.

Стандартизация неунифицированных лабораторных методов исследования была проведена на базе государственного учреждения НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербургской МАПО МЗиСР, ГУЗ «Роддом № 1 (специализированный)», Санкт-Петербург.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Введение стандартов специфических антител. Используя метод последовательных разведений, определяли минимальное количество специфических антител, которое давало достоверно различимую иммуноферментную реакцию с 10 нг связанного с поверхностью микропланшета соответствующего антигена. Определенное таким образом количество антител обозначали как единицу «Е» стандарт-

ного препарата соответствующих специфических антител. Приведенные к конечной концентрации 25000 Е/мл стандартные препараты антител соответствующей специфичности брали за основу. Для приготовления рабочего калибровочного материала исходный стандартный калибровочный препарат разводили в 25 раз и далее последовательными разведениями получали стандарты в 1000; 500; 250; 125; 62,5; 32,1; и 15,6 Е/мл.

Определение рабочих концентраций иммобилизуемых антигенов и зависимость иммуноферментных реакций от концентраций иммобилизуемых антигенов. Пропорциональная зависимость оптической плотности (ОП) иммуноферментной реакции от концентрации иммобилизованных адренокортикального, овариального и тестикулярного антигенов находилась в интервале концентраций от 62 нг/мл до 2 мкг/мл при среднем разведении испытуемых сывороток 1/50 (рис. 1, 3, 5). Ход кривых естественным образом зависел от разведения сывороток: при разведении до 20 раз уже при концентрациях АГ выше 62 нг/мл реакция давала ОП выше 1,0 и за-

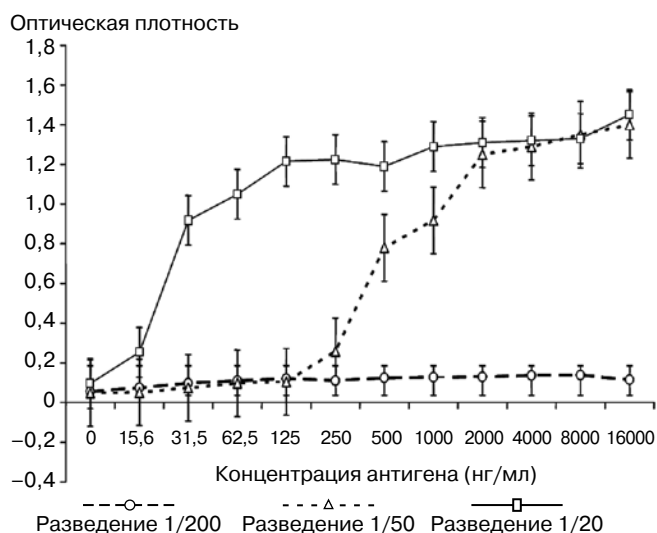


Рисунок 1.

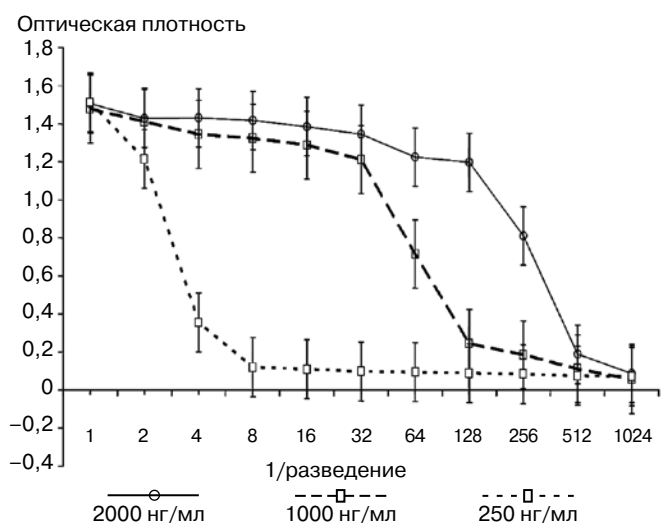


Рисунок 2.

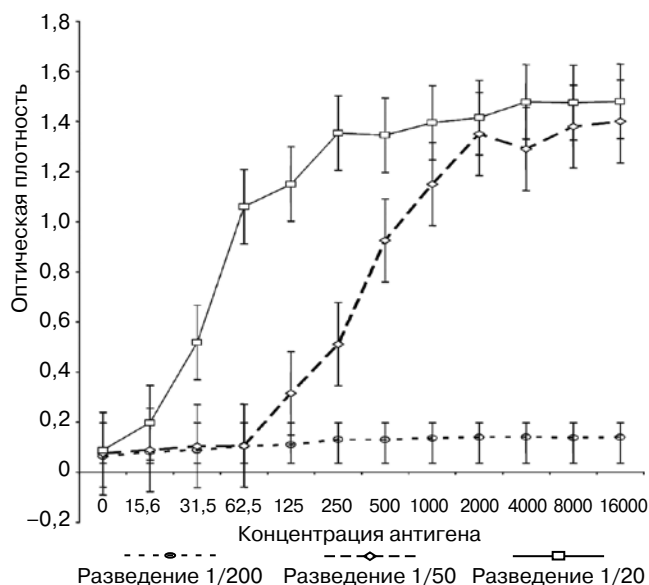


Рисунок 3.

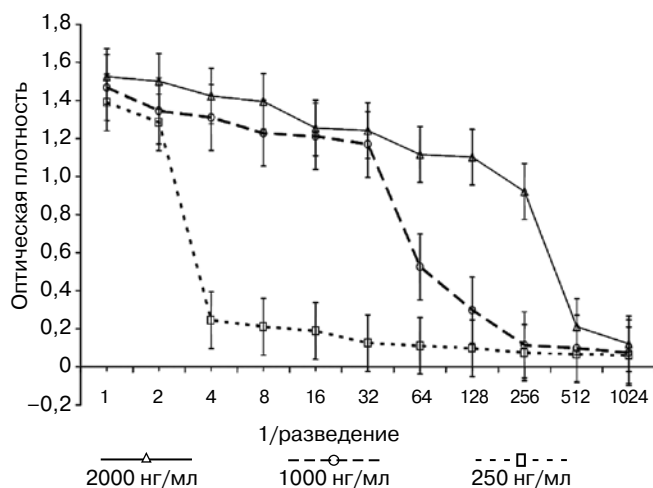


Рисунок 4.

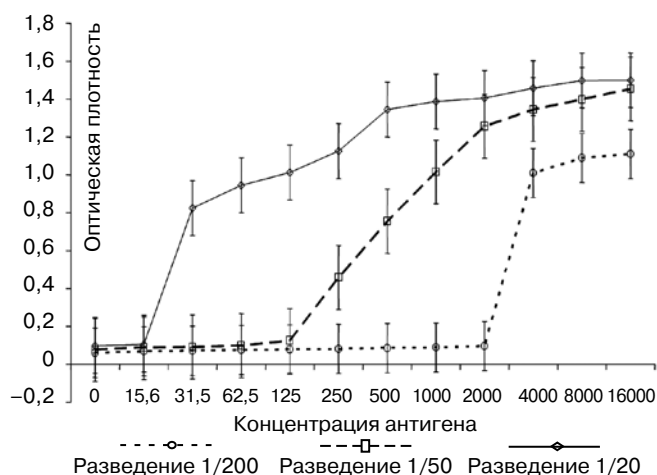
висимости от концентрации АГ были выражены слабо; разведение сыворотки в 200 и более раз приводило к слабой цветной реакции для при любых концентрациях АГ. Титрование испытуемых содержащих аутоантитела сывороток продемонстрировало зависимость от концентраций связывающего адренкортикального АГ (рис. 1). Концентрации АГ не выше 250 нг/мл уже разведенная в 2–4 раза сыворотка демонстрировала низкую, не отличающуюся от уровня холостой пробы, цветную реакцию. При концентрации АГ в интервале 0,8–1,5 мкг/мл кривая титрования имеет пропорциональный участок разведений от 1/32 до 1/256. При концентрации АГ 2 мкг/мл и выше кривая демонстрирует высокий уровень неспецифического связывания при разведениях сывороток до 1/256, а при более высоких резко «спускается» до уровня холостой пробы. Исходя из результатов перекрестного титрования, было принято считать рабочей концентрацией иммобилизованного на твердой фазе адренкортикального

антигена 1000 нг/мл при рабочем разведении исследуемых образцов сывороток 1/50. Пропорциональная зависимость ОП иммуноферментной реакции от концентрации иммобилизованного эндометриального антигена находилась в интервале концентраций АГ от 62 нг/мл до 2 мкг/мл при среднем разведении испытуемых сывороток 1/50 (рис. 1–3). Ход кривых естественным образом зависел от разведения сывороток: при разведении до 20 раз уже при концентрациях АГ выше 62 нг/мл реакция давала ОП выше 1,0 и зависимость от концентрации АГ была выражена слабо; разведение сыворотки в 200 и более раз приводило к слабой цветной реакции для при любых концентрациях АГ.

Зависимость оптической плотности (ОП) цветной иммуноферментной реакции от концентрации овариального антигена выявлялась в интервале концентраций от 15 нг/мл до 16 мкг/мл (рис. 3). Ход кривой также зависел от разведения контрольных и испытуемых сывороток. При разведении испытуемой сыворотки в 200 и более раз зависимость ОП от концентрации АГ практически не наблюдалась и достоверно не отличалась от холостой пробы. При разведении сыворотки 1/50 наблюдался участок пропорциональной зависимости в диапазоне концентраций АГ от 125 нг/мл до 2 мкг/мл. При разведениях 1/20 и слабее кривая имела «крутой» подъем в области низких концентраций АГ до 60 нг/мл и пропорциональный участок не был выражен.

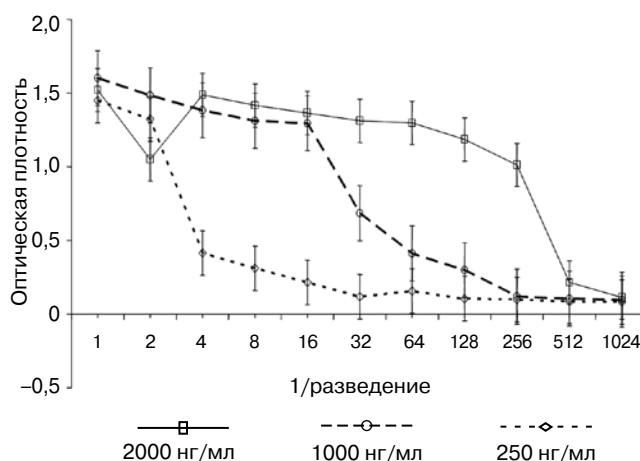
Зависимость иммуноферментных реакций от кратности разведений испытуемых сывороток. Ход кривых зависимости ОП от разведения испытуемых сывороток в свою очередь зависел от концентрации иммобилизованного антигена (рис. 2, 4, 6). При концентрации АГ не выше 250 нг/мл реакция с любыми сыворотками при разведении 1/8 и более достоверно не отличалась от холостой пробы. При концентрациях овариального АГ близких к 1 мкг/мл кривая зависимости ОП от разведения сыворотки имела сравнительно пологий участок. При концентрациях АГ 2 мкг/мл и более вплоть до разведения 1/256 была выражена неспецифическая реакция и ОП слабо зависела от разведения; далее при разведениях сывороток более 1/256 ОП резко снижалась и при разведениях 1/512 и выше приближалась к значениям холостых проб. Результаты титрования АГ с последующей иммобилизацией с одной стороны и испытуемых сывороток, с другой, приводят к заключению, что оптимальной концентрацией овариального АГ следует считать 1 мкг/мл, а оптимальным разведением тестируемых сывороток — 1/50.

Чувствительность ИФА-реакций. В качестве количественных параметров метода определения аутоантител использовали общепринятые показатели специфичности метода, его точности, надежности и как в отношении использования определенного антигена, так и в отношении определяемых антител.



■ Рисунок 5.

Для оценки чувствительности метода (чувствительности тест-системы) был использован показатель минимальной концентрации анализируемого лиганда, которую можно достоверно отличить от нулевой («blank») пробы, или минимальную регистрируемую разницу концентраций лиганда (аналита) в двух образцах. Чувствительность выражали в единицах концентрации, а именно в нанограммах на миллилитр (нг/мл) антител. Минимальную определяемую концентрацию аутоантител в образцах оценивали как наименьшую статистически достоверно отличную от холостой



■ Рисунок 6.

пробы при уровне значимости не выше 0,01. Чувствительность иммуноферментного метода определения для антиадренокортикальных антител составила 20–25 нг/мл специфических антител, для антиовариальных антител — 16–20 нг/мл и для антитестикулярных — 18–24 нг/мл специфических антител соответственно (табл. 1).

Определение надежности анализа. В качестве показателя надежности метода принимали «смещенность» или систематическую ошибку полученного результата от истинного значения концентрации антител в образце. В качестве количественного показателя на-

■ Таблица 1. Количественные характеристики чувствительности определения антиадренокортикальных (АКАТ), антиовариальных (АОАТ) и антитестикулярных (АТАТ) антител

Тип антител	Число измерений	Концентрация аутоантител (нг/мл)	Среднее оптическое поглощение (ОП)	Уровень значимости отличий (P)
Антиадренокортикальные	19	0	0,076±0,009	–
	19	5	0,074±0,011	>0,05
	19	10	0,077±0,010	>0,05
	19	20	0,079±0,014	>0,05
	19	40	0,080±0,008	>0,05
	19	80	0,084±0,011	>0,05
	19	160	0,095±0,007	<0,05
	19	320	0,121±0,013	<0,01
	Антиовариальные	15	0	0,065±0,008
15		5	0,068±0,011	>0,05
15		10	0,071±0,009	>0,05
15		20	0,069±0,010	>0,05
15		40	0,086±0,012	<0,05
15		80	0,098±0,009	<0,01
15		160	1,225±0,105	<0,01
Антитестикулярные	15	0(blank)	0,089±0,009	>0,05
	15	5	0,092±0,010	>0,05
	15	10	0,096±0,011	>0,05
	15	20	0,156±0,012	<0,05
	15	40	0,418±0,016	<0,05
	15	80	0,811±0,015	<0,05
	15	160	1,105±0,019	<0,001

■ Таблица 2. Количественная оценка надежности метода определения антиадренокортикальных (АКАТ), антиовариальных (АОАТ) и антителикулярных (АТАТ) антител

Тип антител	n	Интервал значений	Среднее ОП _{ср.}	Оптическое поглощение стандарта (ОП _{станд.})	P (%)
Антиадренокортикальные	13	Низкий	0,265	0,270	98,0
	13	Средний	0,796	0,788	101,0
	13	Высокий	1,454	1,469	99,0
Антиовариальные	15	Низкий	0,224	0,230	97,5
	15	Средний	0,711	0,715	99,5
	15	Высокий	1,324	1,292	102,5
Антителикулярные	15	Низкий	0,125	0,119	105,0
	15	Средний	0,518	0,521	99,42
	15	Высокий	1,215	1,196	101,6

■ Таблица 3. Оценка специфичности определения антиадренокортикальных (АКАТ), антиовариальных (АОАТ) и антителикулярных (АТАТ) антител по отношению к антителам и неспецифичным иммуноглобулинам

Тип антител	n	Тип иммуноглобулинов	Концентрация (мкг/мл)	Среднее ОП _{ср.}	S
Антиадренокортикальные	13	Специф. IgG	0,90	1,264±0,097	1,1
	13	Неспециф. IgG	0,90	0,116±0,021	10,9
	13	Специф. IgG	0,10	0,428±0,104	0,99
	13	Неспециф. IgG	0,10	0,048±0,009	9,9
Антиовариальные	15	Специф. IgG	0,90	1,345±0,104	1,0
	15	Неспециф. IgG	0,90	0,128±0,085	10,5
	15	Специф. IgG	0,10	0,427±0,029	1,0
	15	Неспециф. IgG	0,10	0,041±0,010	10,6
Антителикулярные	15	Специф. IgG	0,90	1,284±0,096	1,1
	15	Неспециф. IgG	0,90	0,112±0,018	11,2
	15	Специф. IgG	0,10	0,512±0,054	1,0
	15	Неспециф. IgG	0,10	0,039±0,008	10,9

дежности анализа использовали «процент открытия» $P = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{ОП}_{\text{стандарта}}} \times 100\%$. Как видно из таблицы 2, максимальный разброс между измеренными величинами не превышал 8% от измеряемой величины.

Определение специфичности анализа. Оценку специфичности антител проводили по отношению к сходным по структуре антигенам. В качестве количественной оценки специфичности иммуноферментной реакции использовали отношение показателя цветной реакции — оптическое поглощение (ОП) со специфичными антителами к показателю реакции с неспецифичными антителами в той же концентрации согласно формуле: Специфичность ИФА реакции $S = \frac{\text{ОП}_{\text{специфичн.}}}{\text{ОП}_{\text{неспецифичн.}}}$

Уровни неспецифических реакций с неспецифическими иммуноглобулинами в случае адренокортикального антигена не превышали 6,5%, в случае овариального антигена — 7,2%, и в случае тестикулярного антигена, соответственно — 8,5% (табл. 3). Уровни неспецифических реакций между неспецифическими антигенами и аутоантителами составили для антиадренокортикальных антител не более 8%; для антиовариальных аутоантител — не более 7,9%; и, наконец, для антителикулярных аутоантител не превышали 9,0% (табл. 4).

Определение точности анализа. Для оценки точности анализа был использован принятый в таких случаях показатель — коэффициент вариации, выражаемый в процентах (CV%). Показатель отражает статистическое рассеяние значений оптического поглощения (ОП) при повторных определениях одного опытного образца. Вычисляли коэффициент согласно формуле: $CV = \frac{\sigma}{x} \times 100\%$, где x — среднее значение величины оптического поглощения (ОП), а σ — стандартное отклонение.

Анализ рассеяния измерений между пробами ($CV_{\text{interassay}}$) составил 13,1% для измерения антиадренокортикальных антител; 14,2% для антиовариальных антител и 13,8% для антителикулярных антител, рассеяние измерений внутри проб ($CV_{\text{intraassay}}$) не превысило 5,8% для адренокортикальной тест-системы и соответственно 7,4% и 5,8% для овариальной и тестикулярной тест-систем (табл. 5).

Чувствительность иммуноферментного метода определения адренокортикальных антител составила 20–25 нг/мл специфических антител, метода определения антиовариальных антител — 16–20 нг/мл специфических антител и метода определения антителикулярных антител — 18–24 нг/мл соответственно.

■ Таблица 4. Оценка специфичности метода определения антиадренокортикальных (АКАТ), антиовариальных (АОАТ) и антитестикулярных (АТАТ) антител по отношению к антигенам

Тип антител	Тип антигена	n	[С] (мкг/мл)	ОП	S
Антиадренокортикальные	Специфический	15	0,3	0,854±0,074	1,0
	Специфический	15	1,0	1,345±0,112	1,0
	Овариальный	15	1,0	0,146±0,028	9,2
	Тестикулярный	15	1,0	0,166±0,030	8,9
	ЧСА	15	0,3	0,052±0,009	13,2
	ЧСА	15	1,0	0,121±0,020	10,8
	БСА	15	0,3	0,054±0,017	11,2
	БСА	15	1,0	0,097±0,009	12,1
Антиовариальные	Специфический	15	0,5	0,657±0,048	1,0
	Специфический	15	1,0	0,985±0,072	1,0
	Адренокортикальный	15	1,0	0,116±0,009	8,50
	Тестикулярный	15	1,0	0,127±0,011	7,76
	ЧСА	15	0,5	0,052±0,008	12,6
	ЧСА	15	1,0	0,083±0,009	11,9
	БСА	15	0,5	0,043±0,010	15,3
	БСА	15	1,0	0,075±0,011	13,1
Антитестикулярные	Специфический	15	0,3	0,911±0,085	1,0
	Специфический	15	1,0	1,265±0,098	1,0
	Адренокортикальный	15	1,0	0,154±0,012	9,2
	Овариальный	15	1,0	0,171±0,013	8,8
	ЧСА	15	0,3	0,055±0,009	13,1
	ЧСА	15	1,0	0,121±0,012	11,6
	БСА	15	0,3	0,055±0,009	12,7
	БСА	15	1,0	0,095±0,011	11,8

■ Таблица 5. Оценка точности определения антиадренокортикальных, антиовариальных и антитестикулярных антител (внутренний контроль качества)

Тип антител		Интервал значений	n	Среднее ОП _{ср.}	Стандартное отклонение (σ)	CV (%)
Антиадренокортикальные	Изменчивость внутри пробы (intraassay)	Низкие	13	0,365	0,016	4,3
		Средние	13	0,871	0,045	5,2
		Высокие	13	1,256	0,073	5,8
	Изменчивость между пробами (interassay)	Низкие	13	0,403	0,041	10,2
		Средние	13	0,812	0,091	11,3
		Высокие	13	1,313	0,176	13,4
Антиовариальные	Изменчивость внутри пробы (intraassay)	Низкие	15	0,125	0,0675	5,4
		Средние	15	0,658	0,0408	6,2
		Высокие	15	1,115	0,0825	7,4
	Изменчивость между пробами (interassay)	Низкие	15	0,131	0,0152	11,6
		Средние	15	0,585	0,0749	12,8
		Высокие	15	1,175	0,166	14,1
Антитестикулярные	Изменчивость внутри пробы (intraassay)	Низкие	15	0,365	0,016	4,3
		Средние	15	0,871	0,045	5,2
		Высокие	15	1,256	0,073	5,8
	Изменчивость между пробами (interassay)	Низкие	15	0,403	0,041	10,2
		Средние	15	0,812	0,091	11,3
		Высокие	15	1,313	0,176	13,4

Уровни неспецифических реакций антигенов с иммуноглобулинами составили 7,2% для адренокортикального антигена, 6,5% для овариального антигена и 8,5% для тестикулярного соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отличительной особенностью предлагаемых тест-систем является уникальный метод получения антигенов. Использование субклеточных фракций со сложным молекулярным спектром редко применяется в диагностике эндокринных и аутоиммунных заболеваний, однако широко распространено при диагностике паразитарных болезней путем определения циркулирующих антител [7, 8]. В основе предложенного иммуноферментного метода определения аутоантител лежит оригинальный способ выделения клеточных фракций с последующим их использованием в качестве антигенов [3]. Предшествующие исследования показали высокую иммунореактивность выделенных методами препаративной биохимии микросомных фракций стероид-продуцирующих клеток надпочечника и гонад человека [3, 4]. На основе получения оригинальным методом этих фракций были сконструированы твердофазные иммуноферментные тест-системы для количественного определения антител. Целью данной работы было описать количественные характеристики сконструированных тест-систем и оценить их соответствие требованиям, предъявляемым к ИФА-наборам подобного типа.

Использование биопсийного материала гонад и надпочечника человека, стандартизованных фракций антител пациентов с аутоиммунными поражениями надпочечника и гонад позволяют сконструировать твердофазные иммуноферментные тест-системы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью к органоспецифичным аутоантителам с аутоиммунными заболеваниями. Тест-системы с использованием в качестве иммобилизованных антигенов микросомальных фракций стероид-продуцирующих клеток гонад и надпочечника человека обладают необходимой чувствительностью, надежностью и точностью анализа, предъявляемым к диагностическим иммуноферментным тест-системам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинина Н. М., Кетлинский С. А., Оковитый С. В., Шуленин С. Н. Заболевания иммунной системы. Ди-

агностика и фармакотерапия. — М.: Эксмо, 2008. — 496 с.

2. Лапин С. В., Тотолян А. А. Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний. — СПб.: Человек, 2006. — 128 с.
3. Потин В. В., Гзгзян А. М., Иоселиани Т. Г., Хохлов П. П. Иммунохимический метод количественного определения антител к антигенам стероид-продуцирующих клеток в сыворотке крови: Пособие для врачей / Под ред. Э. К. Айламазяна. — СПб.: Н-Л, 2007. — 27 с.
4. Хохлов П. П., Шабанов П. Д., Сапронов Н. С. Иммунореактивность субклеточных фракций стероид-продуцирующих клеток человека при аутоиммунных поражениях надпочечника и гонад // Мед. акад. журн. — 2012. — Т. 12, № 1. — С. 59–65.
5. Khole V. Does ovarian autoimmunity play a role in the pathophysiology of premature ovarian insufficiency? // J. Midlife Health. — 2010. — Vol. 1, N 1. — P. 9–13.
6. Michels W., Eisenbarth G. S. Immunologic endocrine disorders // J. Allergy Clin. Immunol. — 2010. — Vol. 125, Suppl. 2. — P. 226–237.
7. Pires E. S. Multiplicity of molecular and cellular targets in human ovarian autoimmunity: an update // J. Assist. Reprod. Genet. — 2010. — Vol. 27. — P. 519–524.
8. Saerens D., Stijlemans B., Baral T. N. et al. Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens // J. Immunol. Methods. — 2008. — Vol. 329, N 1–2. — P. 138–150.
9. Viswanathan V., Eugster E. A. Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents. // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. — 2009. — Vol. 38, N 4. — P. 719–738.

DESIGN OF ELISA TEST-KITS FOR ORGAN SPECIFIC AUTOANTIBODIES DETERMINATION ON THE BASE OF MICROSOME FRACTIONS OF ADRENAL AND GONADS STEROID PRODUCING CELLS

Khokhlov P. P., Shabanov P. D.

◆ **Summary:** The aim of this work was to design ELISA test-kits for quantitative measurement of autoantibodies to immune reactive structures of human steroid-producing cells. The antigens were immobilized in solid phase including microsome fractions of human adrenals, Leydig male cells and female ovarian granulosa cells. The use of biopsy of human adrenal and gonad material, standardized antibodies fractions of patients with adrenal or gonad autoimmune lesion, have permitted to design ELISA test-kits. That test-kits have high sensibility and specificity to organ-specific autoantibodies for autoimmune diseases. These test-kits on the bases of microsome fractions of human adrenals and gonads as immobilized antigens have sensibility, accuracy and precision needed for such routine ELISA kits.

◆ **Key words:** autoantibodies; enzyme immunoassay; adrenals; reproduction; autoimmune diseases.

◆ Информация об авторах

Хохлов Платон Платонович — кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова Института экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, 197376. E-mail: platonkh@list.ru

Шабанов Петр Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С. В. Аничкова «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Khokhlov P.P.PhD (Biochemistry), Researcher, SV Anichkov Dept. of NeuroPharmacology, Institute of Experimental Medicine NWB RAMS, 12, Acad. Pavlov street, St.Petersburg, 197376, Russia; phone: (812)234-5447; e-mail: platonkh@list.ru

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor, Head, Dept. of Neuropharmacology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch of RAMS. 197376, St.-Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.