

товерно большее количество пациентов с неполной ремиссией во 2-й группе, что требует проведения дополнительных лечебных мероприятий.

Проведенное исследование показало, что ПТ при БИК является высокоэффективным и адекватным методом лечения и позволяет достичь клинко-биохимической ремиссии заболевания более чем в 80% случаев у пациентов с аденомой гипофиза и без таковой. В случаях, когда на МРТ выявляется лишь диффузная неоднородность структуры аденогипофиза или нормальная структура гипофиза без признаков очаговых изменений, ПТ является альтернативой субтотальной гипопизэктомии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдин Л. Л. // Труды 1-го Международного семинара по использованию протонных пучков в лучевой терапии. — М., 1977. — С. 16—24.
2. Кирпатовская Л. Е. // Нейроэндокринология (клинические очерки) / Под ред. Е. И. Маровой. — Ярославль, 1999. — С. 485—505.
3. Марова Е. И. Болезнь Иценко—Кушинга (патогенез, клиника, диагностика, лечение): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1992.

4. Марова Е. И., Рожинская Л. Я., Бельченко Л. В. // Пробл. эндокринологии. — 1992. — № 1.
5. Минакова Е. И. Протонные пучки высоких энергий и лучевая терапия злокачественных опухолей. — Дубна, 1975.
6. Чувило И. В., Гольдин Л. Л., Хорошков В. С. и др. // Труды 1-го Международного семинара по использованию протонных пучков в лучевой терапии. — М., 1977. — С. 64—70.
7. de Castro D. G., Salvajoli J. V., Canteras M. M., Cecilio S. A. // Arch. Bras. Endocrinol. Metab. — 2006. — Vol. 50, N 6. — P. 996—1004.
8. Devisetty K., Chen L. F., Chmura S. J. // Expert Rev. Anticancer Ther. — 2006. — Vol. 6. — Suppl. 9. — P. S93—S98.
9. Feigl G. C., Bonelli C. M., Berghold A. et al. // J. Neurosurg. — 2002. — Vol. 97, N 5. — Suppl. — P. 415—421.
10. Hentschel S. J., McCutcheon J. E. // Neurosurg. Focus. — 2004. — Vol. 16, N 4. — P. E5.
11. Kristof R. A., Schramm J., Redel L. et al. // Acta Neurochir. (Wien). — 2002. — Bd 144, N 6. — S. 555—561; discussion P. 561.
12. Laws E. R., Sheehan J. P., Sheehan J. M. et al. // J. Neurooncol. — 2004. — Vol. 69, N 1—3. — P. 257—272.
13. Pollock B. E. // Progr. Neurol. Surg. — 2007. — Vol. 20. — P. 164—171.
14. Sheehan J. P., Jagannathan J., Pouratian N., Steiner L. // Front. Horm. Res. — 2006. — Vol. 34. — P. 185—205.
15. Shimon I., Ram Z., Cohen Z. R. et al. // Neurosurgery. — 2002. — Vol. 51, N 1. — P. 57—61; discussion P. 61—62.

Поступила 17.11.06

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616.453-008.61-07:616.316-008.84:577.175.534

Н. П. Гончаров, Г. В. Кацья, Е. И. Марова, Г. С. Колесникова, С. Д. Арапова, Л. Я. Рожинская

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СВОБОДНОГО КОРТИЗОЛА В СЛЮНЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий (дир. — член-корр. РАМН Г. А. Мельниченко), Москва

Проведены сравнительные исследования информативности неинвазивного метода определения свободного кортизола в слюне и суточной моче с использованием ультрачувствительных технологий иммуноанализа и общего кортизола в крови у здоровых людей и пациентов с болезнью Иценко—Кушинга. Исследование осуществляли до и после лечения, в условиях проведения функциональных тестов, а также в процессе мониторинга заместительной терапии глюкокортикоидами. Для оценки характера суточного ритма одновременно определяли уровень общего кортизола в крови и его свободной формы в слюне утром, днем и вечером.

Установлены суточные нормативы содержания свободного кортизола в слюне в утренние (6,8—25,9 нмоль/л) и вечерние часы (0,6—3,3 нмоль/л) у здоровых людей. Подтверждена высокая чувствительность свободного кортизола в слюне в оценке функциональных тестов с АКТГ и дексаметазоном. Неинвазивность, доступность и простота получения образцов слюны в сочетании с высокой аналитической чувствительностью и специфичностью метода в определении свободной биологически активной фракции кортизола делает его перспективным для оценки гормональной функции надпочечных желез.

Ключевые слова: свободный кортизол, слюна, суточный ритм, болезнь Иценко—Кушинга.

Comparative studies were conducted to define the informative value of the noninvasive technique for determining free cortisol in saliva and daily urine, by applying ultrasensitive immunoassay technologies, and for evaluating total cortisol in blood from healthy individuals and patients with Cushing's syndrome. The studies were made during functional tests and glucocorticoid replacement therapy before and after treatment. To evaluate the pattern of diurnal rhythm, the level of total cortisol in the blood and that of its free form in the saliva were simultaneously measured in the morning, in the afternoon, and in the evening.

The normal daily salivary free cortisol values were established in healthy individuals in the morning (6.8–25.9 nmol/l) and in the evening (0.6–3.3 nmol/l). There is evidence that salivary free cortisol is highly sensitive in the assessing functional tests with adrenocorticotrophic hormone and dexamethasone. The noninvasiveness, accessibility, and easiness-to-use of obtaining salivary samples in combination with the high analytical sensitivity and specificity of the technique in determining the free biologically active fraction of cortisol make it promising in evaluating adrenal hormonal function.

Key words: free cortisol, saliva, diurnal rhythm, Cushing disease

Концентрация кортизола в крови определяется как уровнем активности системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники, так и его метаболическим

клиренсом. Содержание свободной биологически активной фракции кортизола не превышает 3%. Большая его часть связана со специфическим

транспортным белком — транскортином (около 80—90%), а остальная часть — с альбумином. Изменение связывающей способности транскортина под влиянием как экзогенных, так и эндогенных факторов может существенно влиять на концентрацию общего кортизола в крови, изменяя его метаболический клиренс. Поэтому во многих случаях количественные параметры гормона в крови не отражают клиническую картину заболевания.

Определение биологически активного свободного кортизола в крови в рутинной практике сопряжено с серьезными технологическими трудностями. Более 20 лет тому назад начали использовать метод определения свободного кортизола, экскретируемого с мочой. Несмотря на то что только 1% кортизола в свободной форме выделяется с мочой, он обозначен как "золотой" стандарт в оценке глюкокортикоидной функции, хотя и имеет ряд ограничений, в частности, он не позволяет определить характер суточного ритма.

Альтернативной биологической жидкостью является слюна. Более 50 лет тому назад было показано, что клеточная мембрана (барьер) слюнных желез пропускает в слюнный проток только свободные стероиды (кортизол, тестостерон, эстрадиол и др.), а гормоны, связанные с альбумином или глобулинами, транспортными белками стероидов, она не пропускает. Концентрация свободных стероидов в слюне очень низкая и не превышает 3% от общей концентрации стероидов, циркулирующих в крови. Появление методов радиоиммунологического анализа (РИА) положило начало использованию слюны для измерения биологически активных свободных форм стероидов, как наиболее оптимальных параметров оценки функции стероидсекретирующих желез. Однако методы РИА не обеспечивали нужную чувствительность и требовали сбора большого количества слюны (до 3 мл). Это ограничивало их широкое использование в рутинной диагностической практике. С появлением более совершенных методов иммуноанализа резко возросло число гормональных лабораторий, использующих преимущество легкодоступного, неинвазивного, оперативного способа определения кортизола и других стероидов в слюне. В частности, нами была продемонстрирована высокая информативность метода определения свободного тестостерона в слюне для диагностики различных форм гипогонадизма [6].

В настоящее время метод определения свободного кортизола в слюне рутинно используется в странах Европы и США в комбинации с измерением общего кортизола в крови и свободной формы гормона в моче в качестве маркера при оценке глюкокортикоидной функции, равно как и оценки функциональной целостности гипоталамо-гипофизарной системы. Этот метод является наиболее оптимальным, поскольку позволяет собрать материал в любых заданных временных интервалах у каждого пациента, не подвергая его стрессу. Однако у нас в стране в силу разных причин он пока не нашел применения.

В представленной работе нами была выбрана технология иммуноанализа, основанная на принципе усиления люминесцентного сигнала с ис-

пользованием в качестве меченых компонентов комбинации пероксидазы хрена и люминола, которая обеспечивает высокую аналитическую и функциональную чувствительность метода. Его точность была проверена в сравнении с референсным методом масс-спектрометрии в широком диапазоне концентраций кортизола. Подробная характеристика данной технологии изложена в опубликованной работе Y. Westermann и соавт. [22].

Целью нашей работы явилась сравнительная оценка информативности параллельного определения свободного кортизола в слюне, кортизола в крови и свободного кортизола в моче у здоровых людей и у пациентов с болезнью Иценко—Кушинга (БИК) до и после лечения, при проведении функциональных тестов, а также у больных в процессе мониторинга заместительной гормональной терапии. Для оценки характера суточного ритма одновременно определяли уровень общего кортизола в крови и его свободной формы в слюне.

Материалы и методы

Обследованы 29 пациентов с БИК. Диагноз БИК установлен на основании клинических симптомов, результатов оценки функции надпочечников (определение уровня общего кортизола в крови в 8 и 23 ч, свободного кортизола в моче), визуализации гипофиза и надпочечников с помощью компьютерной и магнитно-резонансной томографии, УЗИ и гистологии удаленной гипофизарной ткани. Для анализа информативности содержания свободного кортизола в слюне обследованные пациенты распределены в следующие группы:

1. Пациенты с БИК:

1) до лечения (7 человек), средний возраст 31 ± 8 лет, ИМТ 29 ± 3 кг/м²;

2) после аденомэктомии и протонотерапии (11 человек) в стадии ремиссии, средний возраст 33 ± 12 лет, ИМТ 27 ± 6 кг/м²;

3) группа на пробе с дексаметазоном (11 человек), средний возраст $32 \pm 9,5$ года, ИМТ 27 ± 5 кг/м².

2. Пациенты с системными коллагенозами, получающие длительную терапию метилпреднизолоном, (4 человека), возраст 45 лет — 72 года.

3. Контрольная группа:

1) здоровые мужчины (45 человек) в возрасте 45 ± 5 лет, ИМТ 28 ± 7 кг/м²;

2) здоровые доноры (15 мужчин и 7 женщин) в возрасте 32 ± 10 лет, ИМТ 26 ± 4 кг/м².

Определение свободного кортизола в слюне проводили в динамике на протяжении дня. Образцы слюны утром — в 8 ч 30 мин, 9 ч, 9 ч 30 мин (1—3 ч после подъема), днем — в 15 ч 30 мин, 16 ч, 16 ч 30 мин (2—3 ч после приема пищи) и вечером — в 22 ч, 22 ч 30 мин и 23 ч. У части пациентов сбор образцов слюны для определения кортизола проводили только в утренние (8 ч 30 мин и 9 ч) и вечерние часы (22 ч 30 мин и 23 ч). Использовали специальные устройства для сбора слюны объемом 2 мл (SaliCaps® IBL, Германия). Условия получения образцов слюны были строго стандартизированы. В процессе получения образца пациент направлял слюну через специальную стерильную (не

Таблица 1

Динамика свободного кортизола в слюне (нмоль/л) у здоровых мужчин и женщин в течение дня

Пол	Время взятия образцов слюны								
	8 ч 30 мин	9 ч	9 ч 30 мин	15 ч 30 мин	16 ч	16 ч 30 мин	22 ч	22 ч 30 мин	23 ч
Мужчины (n = 15)	18,6 (9,3—41,1)	13,2 (8,8—25,1)	12,1 (4,9—20,1)	5,8 (3,6—14,6)	3,0 (3,9—12,1)	4,8 (3,3—13,2)	1,8 (0,8—3,9)	1,65 (0,6—2,8)	1,1 (0,6—2,5)
Женщины (n = 7)	17,4 (6,6—26,4)	19,2 (12,4—27,5)	15,6 (7,9—22,1)	4,2 (3,0—6,4)	3,9 (2,8—6,3)	3,3 (2,8—7,1)	1,6 (0,6—3,8)	1,4 (0,6—3,6)	1,3 (0,3—3,5)
p	0,378	0,112	0,217	0,112	0,06	0,061	0,367	0,887	0,971

адсорбирующую стероиды) соломинку в полипропиленовую пробирку, снабженную крышкой. Процесс сбора слюны в объеме 0,5–1,0 мл занимает 1–2 мин. За 30 мин до начала процедуры пациент должен воздерживаться от чистки зубов, еды, питья, жевательной резинки. Образцы слюны, контаминированные кровью ($> 0,2\%$), из анализа исключаются.

Определение свободного кортизола в слюне проводили вышеуказанным прямым высокочувствительным методом хемилюминесцентного иммуноанализа (наборы IBL, Германия) с регистрацией люминесцентного сигнала на приборе "Виктор 2" (Wallac, Финляндия). Диапазон калибровочной кривой 0–110 нмоль/л. Объем слюны для исследования составлял 20 мкл. Коэффициент вариации (КВ) определяемых значений свободного кортизола в слюне в пределах одной реакции составлял 7,7% при низких значениях гормона ($2,6 \pm 0,2$ нмоль/л) и 4,5% при высоких значениях ($24 \pm 1,1$ нмоль/л), при повторных постановках — 11,5 и 6,2% соответственно. Аналитическая и функциональная чувствительность метода — 0,4 и 1,0 нмоль/л соответственно.

Общий кортизол в образцах сыворотки и свободный кортизол в моче (последний после предварительной экстракции) анализировали методом усиленной хемилюминесценции (Ortho-Clinical Diagnostics, J&J) на автоматическом анализаторе Vitros Eci. Аналитическая чувствительность метода < 3 нмоль/л.

Данные представлены в виде медианы и интерпроцентильного размаха между 10-й и 90-й процентилями. Нормальность распределения оценивали по критерию W Шапиро—Уилка. Значимость различий между группами оценивали с помощью критерия Манна—Уитни и медианного критерия Краскела—Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Связи между исследованными показателями оценивали методом ранговой корреляции по Спирмену и методом регрессионного анализа. Статистическую обработку проводили с использова-

нием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc США).

Результаты и их обсуждение

У здоровых мужчин и женщин отсутствовали значимые различия в содержании свободного кортизола на протяжении дня (табл. 1).

Отсутствие различий позволило нам провести анализ динамики кортизола на протяжении дня вне зависимости от пола. На рис. 1 представлена динамика свободного кортизола в слюне в объединенной группе добровольцев.

Среднее содержание кортизола в 3 утренних образцах слюны у представленной группы добровольцев составляло 14,9 (6,8–25,9) нмоль/л. В дневные часы этот показатель снижался до 6,3 (3,4–18,4) нмоль/л, а в вечерние — до 1,6 (0,6–3,3) нмоль/л. В процентном выражении уровень кортизола в слюне в дневное время снижался на 54% (19–78%), в вечернее — на 89% (82–96%).

Содержание общего кортизола в крови у здоровых людей в утренние и вечерние часы составляло 333 (228–397) и 77 (41–106) нмоль/л соответствен-

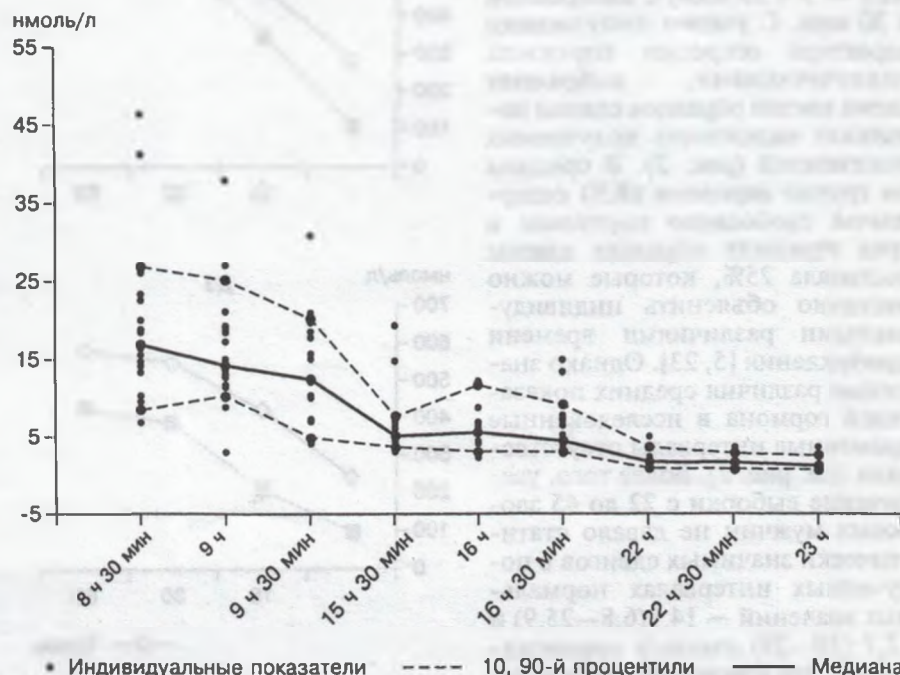


Рис. 1. Динамика свободного кортизола в слюне у здоровых мужчин и женщин на протяжении дня.

Здесь и на рис. 2, 6, 8, 9: по оси абсцисс — время суток.

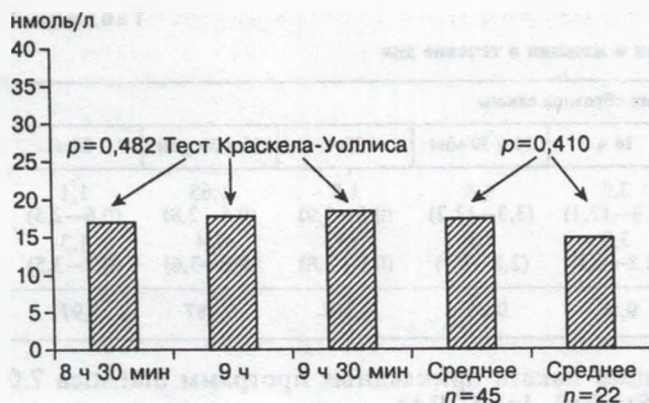


Рис. 2. Содержание свободного кортизола в 3 утренних образцах слюны у здоровых мужчин в зависимости от величины выборки.

но. В среднем уровень кортизола в вечернее время снижался на 77% (69–87%), т. е. вечернее падение уровня кортизола в крови было выражено слабее ($p = 0,0003$), чем свободного кортизола в слюне. Возможно, это объясняется стрессорным фактором, сопутствующим венопункции при заборе образцов крови, и/или замедлением метаболизма кортизола, связанного с транскортином.

У здоровых людей наблюдалась статистически значимая ранговая корреляция Спирмена между содержанием свободного кортизола в слюне и общим кортизолом в крови в утренние ($r = 0,826$; $p = 0,0002$) и вечерние часы ($r = 0,861$; $p = 0,0001$).

У 45 здоровых мужчин в возрасте 38–55 лет проводили 3-кратный сбор образцов слюны только в утренние часы (8 ч 30 мин – 9 ч 30 мин) с интервалом в 30 мин. С учетом импульсного характера секреции кортизола надпочечниками, выбранная схема взятия образцов слюны повышала надежность получаемых показателей (рис. 2). В среднем по группе вариация (КВ) содержания свободного кортизола в трех утренних образцах слюны достигала 25%, которые можно частично объяснить индивидуальными различиями времени пробуждения [5, 23]. Однако значимые различия средних показателей гормона в исследованные временные интервалы отсутствовали (см. рис. 2). Более того, увеличение выборки с 22 до 45 здоровых мужчин не давало статистически значимых сдвигов в полученных интервалах нормальных значений – 14,9(6,8–25,9) и 17,7 (10–29) нмоль/л соответственно, что свидетельствует о хорошей надежности и информативности определения концентрации кортизола в слюне.

Тест с АКТГ. Поскольку было показано, что синактен в стандартной дозе 250 мкг и раститрованных дозах, начиная с 1 мкг и выше, вызывает одинаковый прирост концентрации кортизола в крови [4], мы провели тест с синактеном в дозе 5 мкг в/в. У 4 мужчин контрольной группы на фоне функционального теста с АКТГ (синактен) собрали образцы слюны и крови одновременно по схеме: до введения (0) и через 15 ч 30 мин и 60 мин после введения. Как показали результаты, прирост свободного кортизола через 15, 30 и 60 мин после введения АКТГ составляет 158 ± 57 , 345 ± 80 и $399 \pm 67\%$ соответственно, что достоверно превышает относительные показатели прироста кортизола в крови: 62 ± 12 ($p = 0,025$), 90 ± 32 ($p = 0,015$) и $100 \pm 31\%$ ($p = 0,0002$) (рис. 3). Полученные нами данные подтверждают высокую чувствительность свободного кортизола в слюне для оценки теста с АКТГ [10, 16].

Содержание свободного кортизола в слюне на различных этапах обследования пациентов с БИК. У 7 пациентов с установленным диагнозом БИК содержание свободного кортизола в слюне до лечения в утренние (35,7; 20–66 нмоль/л), дневные (14,5; 5–40 нмоль/л) и вечерние часы (26; 15–79 нмоль/л) статистически значимо превышало аналогичные показатели в контрольной группе (табл. 2).

Результаты динамики свободной фракции гормона в слюне демонстрируют нарушения суточного ритма свободного кортизола у пациентов с БИК

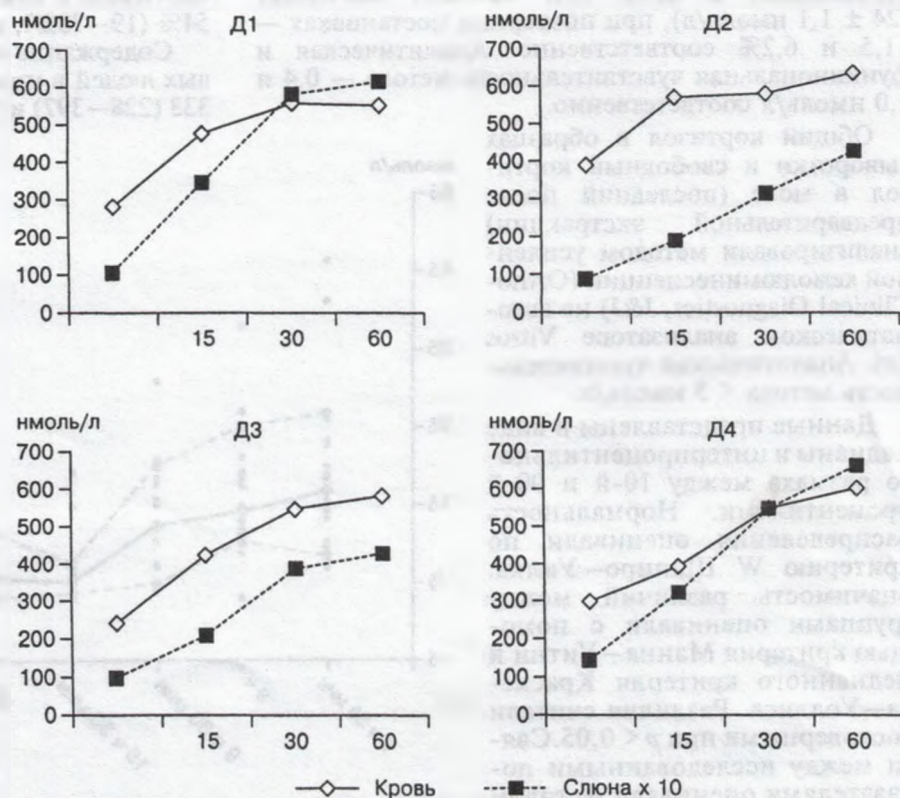


Рис. 3. Сравнительная динамика свободного кортизола в слюне и общего кортизола в крови в условиях функциональной пробы с АКТГ (синактен в дозе 5 мкг в/в) у здоровых мужчин контрольной группы (D1–D4).

По оси абсцисс — время после введения синактена (в минутах).

Таблица 2

Средние показатели (Ме, 10—90-й процентиля) свободного кортизола (нмоль/л) в слюне на протяжении дня у пациентов с БИК до лечения и в стадии ремиссии после лечения (аденомэктомия, протонотерапия)

Группа	8 ч 30 мин — 9 ч 30 мин	15 ч 30 мин — 16 ч 30 мин	22 ч — 23 ч
Пациенты с БИК до лечения	35,7 (20—66)	15,2 (5—40)	26 (15—79)
p_1	0,0007*	0,014	0,0003*
p_2	0,0002*	0,301	0,0004*
Пациенты с БИК в стадии ремиссии	14,1 (6,6—21)	6,6 (4—30)	8,3 (2—12)
p_1	0,849	0,066	0,0001
Контрольная группа	14,9 (6,8—25,9)	6,3 (3,4—18,4)	1,6 (0,6—3,3)

Примечание. * — статистическая значимость различий, p_1 — сравнение с контрольной группой, p_2 — сравнение с группой пациентов в стадии ремиссии.

до лечения. Содержание свободного кортизола в слюне в дневные часы снижалось по сравнению с утренними значениями в среднем на 60%, в вечернее время — на 48% (у здоровых людей — на 89%).

У пациентов с БИК в стадии ремиссии (после аденомэктомии и протонотерапии) содержание свободного кортизола в слюне в утренние и вечерние часы было снижено по сравнению с пациентами до лечения (см. табл. 2). Средний уровень кортизола в слюне в утреннее (14,1; 6,6—21 нмоль/л) и в дневное время (6,6; 4—30 нмоль/л) не отличался от показателей контрольной группы. Однако в вечерние часы средний уровень свободного кортизола (8,3; 2—12 нмоль/л) был значительно выше ($p = 0,001$), чем у пациентов контрольной группы (1,6; 0,6—3,3 нмоль/л). Таким образом, несмотря на значимые различия уровня свободного кортизола в слюне в утренние часы у пациентов с БИК до лечения и здоровых людей, индивидуальные показатели последних в области высоких значений перекрывают область низких показателей больных (рис. 4).

В то же время вечером минимальный уровень свободного кортизола в слюне у пациентов с БИК почти в 3 раза превышает максимальный уровень гормона, регистрируемый у здоровых людей в данное время суток. В диагностике БИК чувствительность и специфичность метода определения свободного кортизола в слюне в 22 ч — 23 ч, по нашим данным, составляет 100%.

Для диагностики синдрома Кушинга по вечернему уровню свободного кортизола в слюне предлагаются различные границы раздела от 3,6 [14] и 5,6 нмоль/л [24] до 7,7 [2] и 15,2 нмоль/л [12]. По нашим данным, диагностический порог превышает 4 нмоль/л. Однако необходимо учитывать, что небольшое количество обследованных пациентов на этапе диагностики БИК ($n = 7$) ограничивает толкование операционных характеристик метода.

Кроме того, диагностический порог для разграничения "норма — патология" обычно базируется, как и в нашей работе, на сравнении с результатами определения свободного кортизола у здоровых людей. Имеются единичные сообщения по расчету

диагностического порога пациентов с БИК по сравнению с ожирением (5,6 нмоль/л; чувствительность 100%, специфичность 96%) [24]. В то же время, по другим данным [20], у пациентов с ожирением (ИМТ > 39 кг/м²) вечерний уровень свободного кортизола в слюне не отличался от такового у здоровых людей — 2,1 (0,3—4,4) и 1,7 (0,6—3,0) нмоль/л соответственно. В качестве диагностического порога исследователи использовали содержание свободного кортизола в слюне более 6 нмоль/л, что обеспечивало 100% чувствительность и специфичность диагностики синдрома Кушинга.

Учитывая, что гиперкортизолемиа может наблюдаться и при других ситуациях (психические расстройства, сахарный диабет 2-го типа, алкоголизм, беременность и др.), необходимо проведение дальнейших исследований с увеличением числа пациентов с БИК и характеристикой адекватных контрольных групп сравнения с вышеперечисленной патологией.

Анализ результатов содержания свободного кортизола в слюне в различных публикациях демонстрирует значительный разброс в абсолютных показателях гормона, как у здоровых людей, так и у больных БИК. По данным различных авторов, у здоровых людей утренние показатели кортизола в слюне варьируют в пределах $15,9 \pm 1,96$ [16], $8,2—52,4$ [17], $14,6 \pm 1,4$ [13], $13,4 \pm 3,2$ [19], $17,9 \pm 1,9$ [12], $11,6 (2,5—25,4)$ нмоль/л [20]. Различия в по-

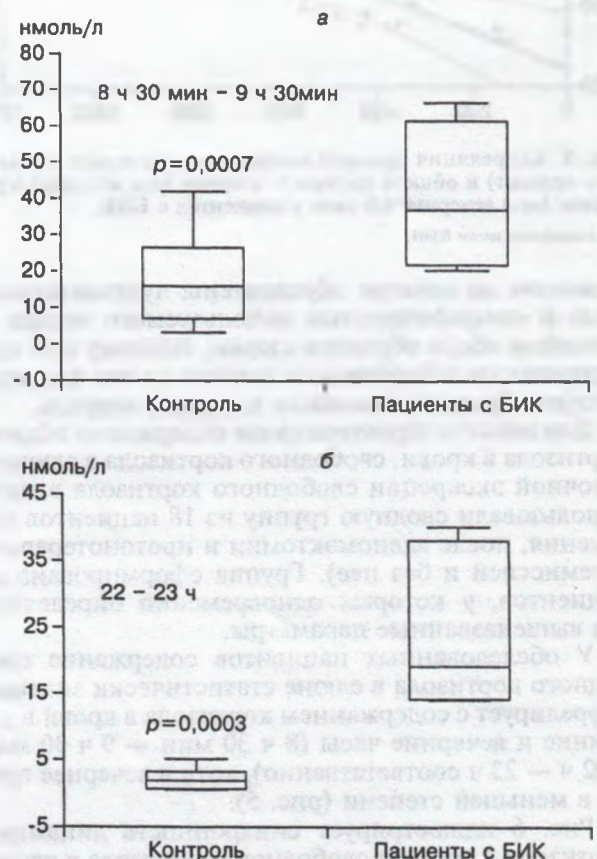


Рис. 4. Средние показатели уровня свободного кортизола в слюне в утренние (а) и вечерние (б) часы у пациентов с БИК до лечения и здоровых людей (Ме, 10, 90-й процентиля).

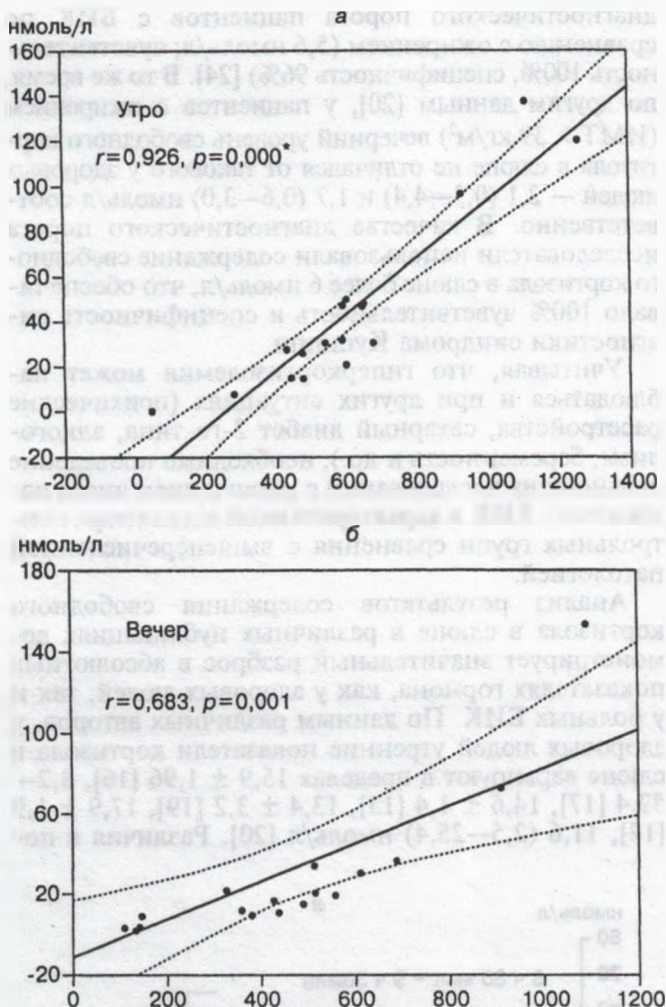


Рис. 5. Корреляция уровней свободного кортизола в слюне (оси ординат) и общего кортизола в крови (оси абсцисс) в утренние (а) и вечерние (б) часы у пациентов с БИК.

* — корреляция менее 0,001.

казателях во многом обусловлены чувствительностью и специфичностью используемого метода и способом сбора образцов слюны, поэтому при интерпретации лабораторных данных на эти факторы следует обращать внимание в первую очередь.

Для анализа характера связи содержания общего кортизола в крови, свободного кортизола в слюне и суточной экскреции свободного кортизола в моче использовали сводную группу из 18 пациентов (до лечения, после аденомэктомии и протонотерапии, с ремиссией и без нее). Группа сформирована из пациентов, у которых одновременно определяли все вышеуказанные параметры.

У обследованных пациентов содержание свободного кортизола в слюне статистически значимо коррелирует с содержанием кортизола в крови в утренние и вечерние часы (8 ч 30 мин — 9 ч 30 мин и 22 ч — 23 ч соответственно), хотя в вечернее время в меньшей степени (рис. 5).

Рис. 6 иллюстрирует синхронность динамики кортизола в крови и свободного кортизола в слюне у отдельных пациентов с БИК.

Регрессионный анализ выявил также статистически значимую прямую зависимость свобод-

ного кортизола в слюне и общего кортизола в крови с экскрецией свободного кортизола в суточной моче:

- свободный кортизол в моче/свободный кортизол в слюне (утро: $r = 0,886$; $p = 0,0002$);
- свободный кортизол в моче/свободный кортизол в слюне (вечер: $r = 0,835$; $p = 0,0001$);
- свободный кортизол в моче/общий кортизол в крови (утро: $r = 0,901$, $p = 0,0003$);
- свободный кортизол в моче/общий кортизол в крови (вечер: $r = 0,510$, $p = 0,037$).

Малая дексаметазоновая проба (ночной тест с 1 мг дексаметазона, МДП). У пациентов с БИК в активной фазе (рис. 7) средний уровень свободного кортизола утром до приема дексаметазона составляет $76,1 \pm 34,0$ нмоль/л, а после приема дексаметазона — 41 ± 26 нмоль/л. В среднем у больных в активной фазе МДП вызывает снижение содержания свободного кортизола в слюне на $49 \pm 14\%$. Эти данные совпадают с результатами оценки теста по динамике кортизола в крови. Средние показатели кортизола в крови до и после проведения МДП у больных в активной фазе составляют 793 ± 191 и 583 ± 151 нмоль/л. Степень подавления уровня кортизола в крови у этих пациентов при проведении МДП составляла $33 \pm 13\%$. При проведении у этих же пациентов большой дексаметазоновой пробы содержание свободного кортизола в слюне и общего кортизола в крови снижалось на 83 ± 10 и $64 \pm 19\%$ соответственно.

При проведении МДП у пациентов в стадии ремиссии (см. рис. 7) средний уровень свободного кортизола утром до приема дексаметазона составлял $15,2 \pm 7,1$ нмоль/л, а после приема дексаметазона — $1,8 \pm 1,2$ нмоль/л. В среднем у больных в стадии ремиссии в условиях МДП содержание свободного кортизола в слюне снижается на $89 \pm 6\%$. Эти данные также полностью совпадают с результатами оценки теста по динамике кортизола в крови. Средние показатели кортизола в крови до и после проведения МДП у пациентов в стадии ремиссии составляют 343 ± 95 и 31 ± 24 нмоль/л. Степень подавления уровня кортизола в крови составляла $88 \pm 10\%$.

Выраженное в процентах снижение концентрации кортизола в крови и концентрации свободного кортизола в слюне в ответ на введение дексаметазона у пациентов с БИК характеризуется прямой линейной зависимостью ($r = 0,826$; $p = 0,0002$).

Свободный кортизол в слюне в качестве маркера мониторинга терапии надпочечниковой недостаточности производными гидрокортизона. Наибольший интерес представляет возможность использования данного маркера для мониторинга заместительной гормональной терапии, поскольку неинвазивность получения образцов слюны дает возможность проводить частый сбор образцов в различных временных режимах и тем самым проследить индивидуальную фармакокинетику вводимого препарата.

Как показали первые результаты (рис. 8), заместительная терапия препаратом кортеф в дозе 10 мг вызывает значимый подъем уровня свободного кортизола в слюне у пациентов с вторичной хронической надпочечниковой недостаточностью. Пиковые значения регистрируются через 1–2 ч по-

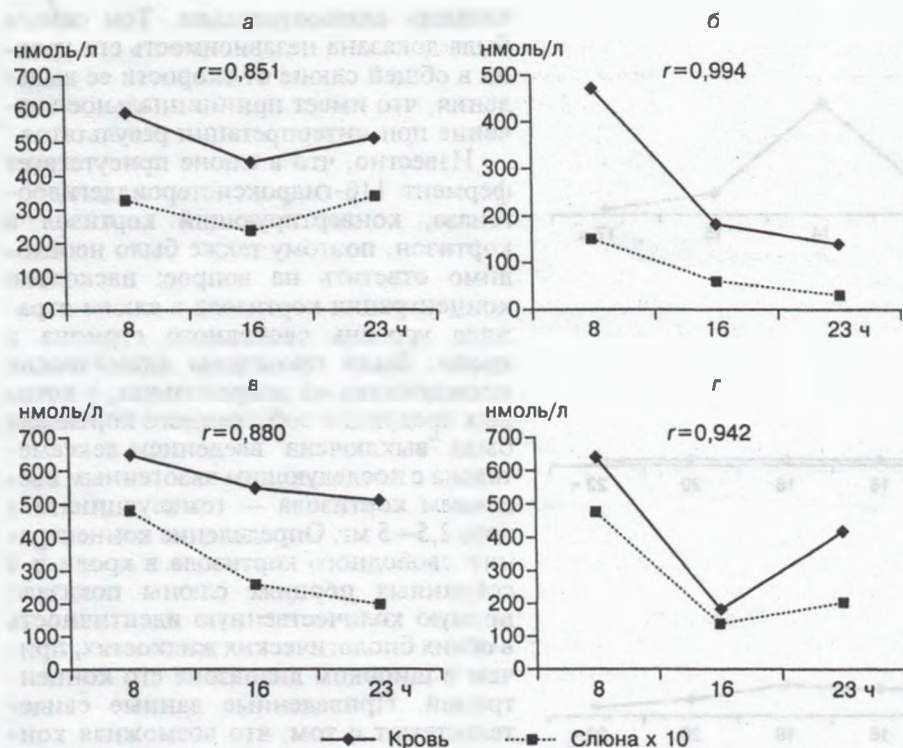


Рис. 6. Сравнительная динамика кортизола в крови и свободного кортизола в слюне у отдельных пациентов на протяжении дня.

а — пациент Ж., БИК, АКТГ-эктопия (?), до лечения; б — пациент Ш., БИК, после протонотерапии, ремиссия; в — пациент Г., БИК, до лечения; г — пациент Н., БИК, после аденомэктомии, без ремиссии.

сле приема кортефа. Наблюдаются индивидуальные различия в интенсивности повышения уровня свободного кортизола в слюне. Абсолютные значения зарегистрированных максимальных концентраций после утренней дозы кортефа 10 мг колеблются в пределах 30—379 нмоль/л. Исходные уровни кортизола в слюне в утренние часы до приема препарата составляют 0,7—3,3 нмоль/л (в контрольной группе 7—26 нмоль/л), что отражает глубокую надпочечниковую недостаточность у всех пациентов. Прием кортефа в дозе 5 мг (в обеденное время) на фоне остаточного эффекта предшествующей утренней дозы препарата не вызывает пикового повышения содержания свободного кортизола в слюне (см. рис. 8, пациент Се).

Мы обследовали также группу пациентов с идиопатической пузырчаткой, которые длительное время находились на терапии метилпреднизолоном по специальной схеме с исходной максимальной дозой препарата 80 мг и последовательным поэтапным снижением дозы. Длительность каждого этапа снижения дозы определялась клиническим течением заболевания.

Как показали результаты обследования, у 4 пациентов (рис. 9),

принимавших в момент обследования метипред в дозе 4—16 мг/сут, регистрировался очень низкий уровень кортизола в слюне — 1,3 (0,6—6,7) нмоль/л, что в 5—10 раз ниже нормальных значений у здоровых людей — 14,9 (7—26) нмоль/л.

Можно полагать, что уровень свободного кортизола в слюне является чувствительным маркером подавления секреции эндогенного кортизола при терапии метилпреднизолоном и может быть использован для индивидуального мониторинга терапии синтетическими глюкокортикоидами (СГК).

В заключение необходимо отметить, что во всех случаях при оценке адекватности заместительной терапии СГК могут возникать определенные трудности в интерпретации результатов, особенно по уровню общего кортизола в крови и в меньшей степени — по уровню свободного кортизола в слюне и в моче [1, 3, 7, 8, 11, 15, 18]. Эти трудности связаны с такими факторами, как:

— наличие перекрестных реакций в процессе иммуноанализа кортизола с близкими по структуре СГК. При этом в зависимости от химического строения препарата и его фармакокинетики изменяется интенсивность и динамика его интерферирующего эффекта. В приведенном случае (см. рис. 9), судя по очень низкому уровню кортизола, метипред не имеет значимой перекрестной реакции;

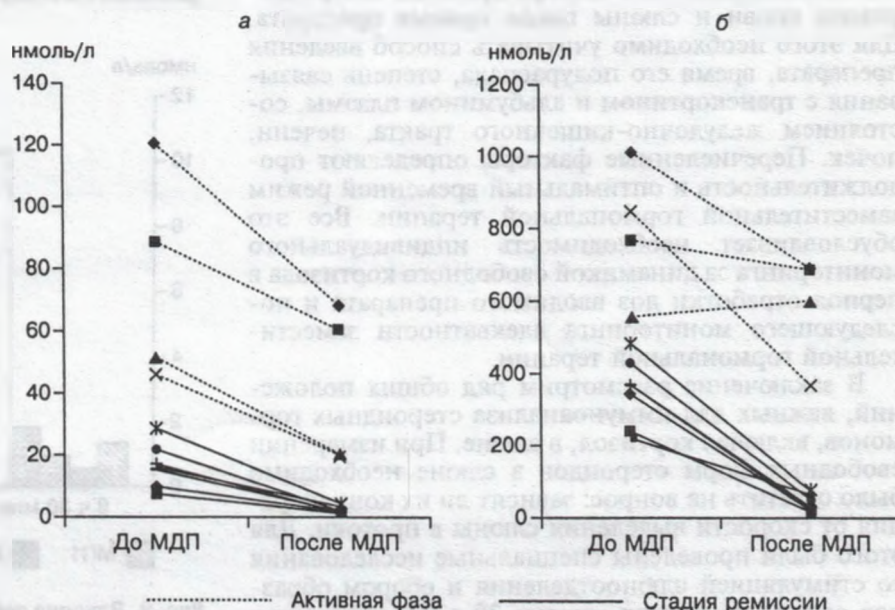


Рис. 7. Индивидуальная динамика свободного кортизола в слюне (а) и крови (б) при проведении МДП у пациентов с БИК в активной фазе и в стадии ремиссии.

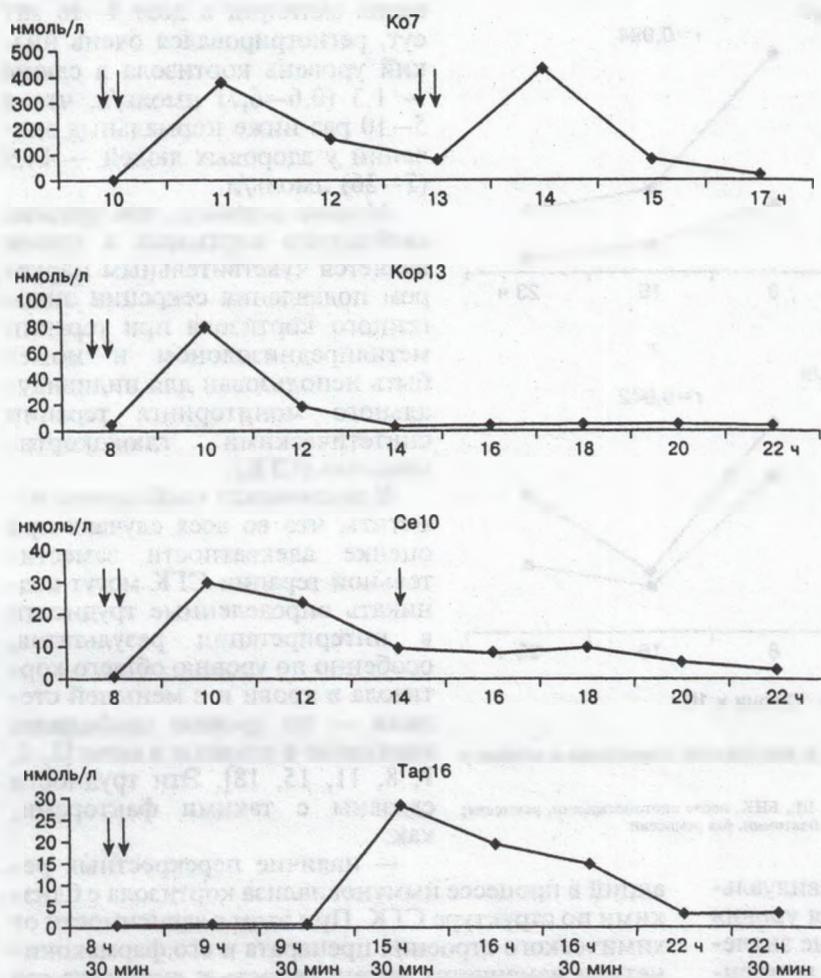


Рис. 8. Индивидуальная фармакокинетика экзогенного кортизола (кортеф) в слюне у пациентов с вторичной надпочечниковой недостаточностью (↓↓ — прием 10 мг, ↓ — прием 5 мг).

— обоснованность выбора времени забора образцов крови и слюны после приема препарата. Для этого необходимо учитывать способ введения препарата, время его полураспада, степень связывания с транскуртином и альбумином плазмы, состоянием желудочно-кишечного тракта, печени, почек. Перечисленные факторы определяют продолжительность и оптимальный временной режим заместительной гормональной терапии. Все это обуславливает необходимость индивидуального мониторинга за динамикой свободного кортизола в период отработки доз вводимого препарата и последующего мониторинга адекватности заместительной гормональной терапии.

В заключение рассмотрим ряд общих положений, важных для иммуноанализа стероидных гормонов, включая кортизол, в слюне. При измерении свободных форм стероидов в слюне необходимо было ответить на вопрос: зависит ли их концентрация от скорости выделения слюны в протоки. Для этого были проведены специальные исследования со стимуляцией слюноотделения и сбором образцов слюны по 50 мкл каждые 30 с. Последующие измерения концентрации кортизола показали отсутствие разницы в его содержании до и после ак-

тивации слюноотделения. Тем самым была доказана независимость его уровня в общей слюне от скорости ее выделения, что имеет принципиальное значение при интерпретации результатов.

Известно, что в слюне присутствует фермент 11β -гидроксистероиддегидрогеназа, конвертирующий кортизол в кортизон, поэтому также было необходимо ответить на вопрос: насколько концентрация кортизола в слюне отражала уровень свободного гормона в крови. Были проведены клинические исследования на добровольцах, у которых продукция собственного кортизола была "выключена" введением дексаметазона с последующим экзогенным введением кортизола — гемисукцината в дозе 2,5—5 мг. Определение концентрации свободного кортизола в крови и в собранных порциях слюны показало полную количественную идентичность в обеих биологических жидкостях, причем в широком диапазоне его концентраций. Приведенные данные свидетельствуют о том, что возможная конверсия кортизола в кортизон хотя и имеет место, но существенно не влияет на количество кортизола в слюне [9].

В аналогичном исследовании с дексаметазоном и экзогенным введением кортизола и взятием крови со сбором слюны каждые 60 с было показано быстрое проникновение свободного кортизола в слюну из крови. Уже через 60 с его концентрация в слюне многократно выросла параллельно с увеличением его уровня в крови.

По уровню кортизола в слюне с частым ее забором можно проследить за физиологическими колебаниями активности гипо-

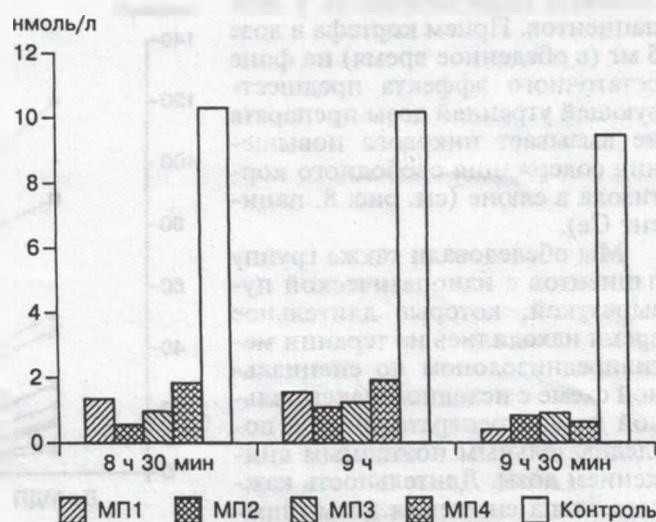


Рис. 9. Влияние терапии метипредом на уровень свободного кортизола в слюне у пациентов с идиопатической пузырчаткой (пациенты МП 1—4). Контроль отражает нижнюю границу нормальных значений для указанных временных интервалов.

таламо-гипофизарно-адреналовой системы на протяжении дня, месяца, года и т. д., тогда как по уровню кортизола в крови это сделать намного сложнее.

Исследование слюнной жидкости для определения кортизола существенно снижает затраты, так как в большинстве случаев не требует госпитализации больного. Однократный визит к доктору с получением четкой инструкции о правилах и временном интервале сбора слюны дома позволяет избежать стрессорных ситуаций, связанных с посещением госпиталя, взятием крови из вены и т. д.; кроме того, снижаются транспортные расходы, а также расходы на преаналитическом этапе, которые зачастую превышают стоимость самого гормонального теста.

Определение кортизола в слюне радикально облегчает проведение функциональных тестов с АКТИГ, дексаметазоном, инсулином и исключает влияние стресса на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, обусловленного многократным забором крови. И самое главное, содержание кортизола в слюне отражает концентрацию свободной, физиологически активной фракции гормона, циркулирующего в крови, тогда как его определение в сыворотке крови отражает уровень общего кортизола, т. е. и свободной фракции, и фракции, связанной с транскортином и альбумином, и измерение его концентрации не всегда можно рассматривать как следствие изменения функции системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники. Во многих случаях изменение его содержания в крови обусловлено нарушением связывающей способности транскортина, на продукцию которого в печени оказывают влияние ряд фармакологических препаратов, включая аспирин, а также изменение гормонального гомеостаза. Кортизолсвязывающий глобулин (транскортин) и альбумин исследуемой плазмы могут конкурировать с анτισывороткой к кортизолу в иммунологической реакции и тем самым создавать "неспецифический эффект" с искажением полученных результатов. Эти проблемы требуют затратных технологических решений, чтобы уменьшить обозначенные помехи. Слюнная жидкость не содержит в значительных количествах белки и поэтому является оптимальным биологическим материалом, позволяющим избежать указанную проблему. Кроме того, определение кортизола в слюне, равно как и других стероидов, позволяет избежать проблемы матрикса в иммуноанализе и готовить калибрующую кривую стандарта не в безстероидной плазме (как при их определении в крови), а в буферном растворе. Это принципиально уменьшает стоимость технологии и повышает точность и надежность метода. Кроме того, в случае гемолиза крови регистрируются искажения результатов, что создает дополнительные диагностические трудности, особенно это проблематично для современных прямых автоматизированных систем определения стероидных гормонов.

Точность и надежность определения концентрации свободного кортизола в слюне была подтвер-

ждена референсным методом масс-спектрографии [21].

Выводы

1. Содержание свободного кортизола в слюне является чувствительным и надежным маркером секреторной функции надпочечников.

2. Неинвазивность, доступность и простота получения образцов слюны в сочетании с высокой аналитической чувствительностью метода делают его оптимальным методом выбора при проведении динамических наблюдений и контроле за функцией железы.

3. Показана информативность данного метода в оценке разнонаправленных функциональных тестов с подавлением и стимуляцией секреции кортикостероидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barbeta L., Dall'Asta C., Re T., Libe R. et al. // J. Endocrinol. Invest. — 2005. — Vol. 28. — P. 632–637.
2. Castro M., Elias P. C., Quidute A. R. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1999. — Vol. 84. — P. 878–882.
3. Devers M. C., Thomson A. H., Freel M. et al. // Endocr. Abstr. — 2004. — Vol. 8. — P. 87.
4. Dokmetas H. S., Colak R., Kelestimur F. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2000. — Vol. 85. — P. 3713–3719.
5. Federenko I., Wust S., Hellhammer D. H. et al. // Psychoneuroendocrinology. — 2004. — Vol. 29. — P. 174–184.
6. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. // Aging Male. — 2006. — Vol. 9. — P. 111–122.
7. Jerjes W. K., Cleare A. J., Wood P. J., Taylor N. F. // Clin. Chim. Acta. — 2006. — Vol. 364. — P. 279–286.
8. Lee H. J., Yoo J. Y., Kim Y. G. et al. // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. — 2004. — Vol. 42. — P. 519–525.
9. London J., Smith D., Perry L. et al. // Immunoassay of Steroid in Saliva / Eds G. Read et al. — 1982. — P. 300–307.
10. Marcus-Perlman Y., Tordjman K., Greenman Y. et al. // Clin. Endocrinol. (Oxford). — 2006. — Vol. 64. — P. 215–218.
11. Masharani U., Shiboski S., Eisner M. D. et al. // Psychoneuroendocrinology. — 2005. — Vol. 30. — P. 744–752.
12. Papanicolaou D. A., Mullen N., Kyrou I., Nieman L. N. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87. — P. 4515–4521.
13. Putignano P., Toja P., Dubini A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2003. — Vol. 88. — P. 4153–4157.
14. Raff H., Raff J. L., Findling J. W. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1998. — Vol. 83. — P. 2681–2686.
15. Rovinsky J., Imrich R., Koska J. et al. // Ann. Rheum. Dis. — 2003. — Vol. 62. — P. 674–676.
16. Simunkova K., Hampl R., Hill M. et al. // Physiol. Res. — 2006.
17. Trilck M., Flitsch J., Ludecke D. K. et al. // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. — 2005. — Vol. 113. — P. 225–230.
18. Tunn S., Mollmann H., Barth J. et al. // Clin. Chem. — 1992. — Vol. 38. — P. 1491–1494.
19. van Aken M. O., Romijn J. A., Miltenburg J. A., Lentjes E. G. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49. — P. 1408–1409.
20. Viardot A., Huber P., Puder J. J. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2005. — Vol. 90. — P. 5730–5736.
21. Walker R., Joyce B., Dyas J. et al. // Immunoassay of Steroid in Saliva / Eds G. Read et al. — 1982. — P. 308–316.
22. Westermann J., Demir A., Herbst V. // Clin. Lab. — 2004. — Vol. 50. — P. 11–24.
23. Wust S., Wolf J., Hellhammer D. H. et al. // Noise Hlth. — 2000. — № 7. — P. 79–88.
24. Yaneva M., Mosnier-Pudar H., Dugué M.-A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89. — P. 3345–3351.

Поступила 06.04.07