

УДК 602.68:57.083

НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ К НЕЙРОМЕДИАТОРАМ

Мягкова М.А., Морозова В.С.

Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская обл., e-mail: m.a.myagkova@gmail.com

Проведено исследование диагностической возможности определения антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам в сыворотке крови человека на основе использования в ИФА новых синтетических антигенов с оптимальным замещением (10-15%) гаптенем высокомолекулярной матрицы. При выбранных условиях ИФА проводили определение содержания антител IgG и IgM класса в индивидуальных сыворотках здоровых лиц и больных аллергическим поллинозом, нейродермитом, опиоидной наркоманией. У пациентов, входящих в группу больных, происходит одновременное изменение уровня антител IgG и IgM класса. Для больных опиоидной наркоманией отмечено достоверное повышение содержания антител IgM класса к серотонину и гистамину ($p < 0,05$). Для группы больных аллергическим поллинозом и нейродермитом характерно достоверное ($p < 0,05$) понижение содержания IgM антител к серотонину и гистамину. Установлена взаимосвязь между содержанием естественных антител к указанным нейромедиаторам и течением патологических процессов. Естественные антитела выполняют в норме гомеостатическую или защитную функцию, поддерживая концентрации различных эндогенных соединений в пределах нормы.

Ключевые слова: антитела, диагностические маркеры, опиоидные пептиды, биогенные амины, иммунохимические свойства.

NEW DIAGNOSTIC POSSIBILITIES DEFINITIONS NATURAL ANTIBODIES TO NEUROTRANSMITTERS

Myagkova M.A., Morozova V.S.

Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, e-mail: m.a.myagkova@gmail.com

Diagnostic study of the possibility of determining antibody to biogenic amines and opioid peptides in human serum by ELISA using a new synthetic antigens with optimal substitution (10–15 %) high molecular weight hapten matrix. When selected conditions ELISA was performed determining the content of IgG and IgM class antibodies in individual sera of healthy individuals and patients with allergic hay fever, neurodermatitis, opium addiction. Patients in the group of patients there is a simultaneous change in the level of IgM and IgG class antibodies. The immune system in response to changes in the metabolism of key bio-regulators, accompanying the development of pathological processes involved in maintaining homeostasis by regulating the content of e-AT to biogenic amines and opioid peptides. For patients with opioid addiction was a significant elevation of IgM class antibodies to serotonin and histamine ($p < 0.05$). For the group of patients with allergic hay fever and neurodermatitis characterized by a significant ($p < 0.05$) decrease in IgM antibodies to serotonin and histamine. The relationship between the content of natural antibodies to these neurotransmitters and the course of pathological processes. Natural antibodies operate in the normal homeostatic or protective function, maintaining the concentration of various endogenous compounds in the normal range.

Keywords: antibodies, diagnostic markers, opioid peptides, biogenic amines, immunochemical properties.

Создание диагностических тестов определения и мониторинга эндогенных биорегуляторов является актуальной задачей, важное место в которой занимает вопрос разработки оптимальных программ лабораторного контроля процесса заболевания, позволяющего прогнозировать осложнения [1,4,8]. Для этой цели используют наиболее технологичные и удобные в лабораторной практике способы иммуноанализа, ключевым составляющим реагентом которого являются антитела. В последние годы расширились диагностические возможности применения антител для оценки изменения содержания

эндогенных биорегуляторов [3,9]. Помимо классических методов иммуноанализа, в которых используют антитела, созданные по технологии иммунизации животных, получили развитие методы определения естественных антител к биомолекулам различного вида [5]. Данные литературы свидетельствуют о том, что важной составной частью циркулирующих иммуноглобулинов являются естественные антитела (е-АТ). Они способны принимать участие в широком спектре физиологических реакций организма: от иммунного регулирования, обеспечения внутреннего гомеостаза, неспецифической барьерной роли против чужеродных патогенных антигенов, до транспортной функции и модуляции действия биологически активных веществ [2,6]. Показано, что при патологических состояниях происходит изменение нормального уровня е-АТ, которое, как правило, связано с нарушением метаболизма того или иного ключевого эндогенного соединения, участвующего в патогенезе заболевания [7]. Одним из перспективных методов оценки процесса течения заболевания является исследование е-АТ к нейромедиаторам в сыворотке крови, которые дают объективную оценку системы тяжести при различной патологии [8].

Цель данной работы заключалась в разработке метода определения естественных антител к нейромедиаторам (сротонину, гистамину, дофамину, дерморфину, β –эндорфину) в сыворотке крови больных с аллергическими расстройствами и болезненной зависимостью, проведении сравнительного исследования их содержания и установлении возможности диагностического применения.

Материалы и методы

Для исследования получены образцы сыворотки крови 70 больных нейродермитом в возрасте от 18 до 34 лет со средней продолжительностью заболевания $7,0 \pm 1,5$ лет в отделе иммунологии ГУ ЦНИКВИ Росздрава. Образцы сыворотки крови для исследования 55 больных в возрасте от 19 до 54 лет и продолжительностью заболевания в среднем $7,9 \pm 1,2$ лет с диагнозом поллиноз предоставлены Клинической больницей № 4 г. Пенза. Московским научно-практическим центром наркологии г. Москвы предоставлены пробы сыворотки крови 25 больных опийной наркоманией, в возрасте от 20 до 44 лет и продолжительностью заболевания от 1 года до 11 лет. При проведении иммунохимических исследований в качестве контрольных образцов использовали сыворотки крови 25 здоровых доноров в возрасте от 20 до 50 лет, полученные в Учреждении Российской академии медицинских наук Гематологическом научном центре РАМН.

Результаты исследований оценивали с использованием средней арифметической величины (M), их стандартной ошибки (m), критерия Стьюдента – Уэлча (t), критерия Пирсона, коэффициента корреляции Кендалла. Для принятия гипотезы применяли уровень достоверности 95 % ($p=0,05$).

Получение конъюгата нейромедиатора на основе полимерной матрицы.

Синтез конъюгированных антигенов нейромедиаторов (сротолина, гистамина, дофамина, дерморфина, β –эндорфина) на основе поли (4-нитрофенил) акрилата выполняли следующим образом. К раствору 6 мг (0.036 ммоль) поли(4-нитрофенил) акрилата в 1 мл ДМФА_{абс}, добавляли 1.1 мг (0.009 ммоль) соответствующего нейромедиатора. В результате был получен конъюгат гистамина, содержащий 13 молей гаптена на моль полимерного носителя.

ИФА определения антител к сротонину, гистамину, дофамину, дерморфину, β –эндорфину в сыворотке крови человека.

Планшет сенсibilизировали раствором конъюгированного антигена соответствующего нейромедиатора (по 100 мкл в лунку) в 2 мкг/мл концентрации в 0.02 М карбонатном буфере (рН 9.5) в течение 18 часов при температуре 4 °С. После сорбции планшет отмывали трижды (3*100 мкл) 0.005 % раствором твин-20 в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (рН 7.2), и вносили в лунки в двух повторах по 100 мкл исследуемой сыворотки в растворе ЗФР, содержащем 0.01 % твин-20, в разведении 1/200. Планшет инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Отмывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 100 мкл раствора антивидовых антител либо против IgG, либо против IgM человека, меченные пероксидазой хрена в разведении 1/2000. Учёт результатов проводили на спектрофотометре при длине волны 450 нм. На основании результатов ИФА проводили анализ содержания антител IgG и IgM класса в индивидуальных сыворотках больных и доноров, определяя достоверное изменение уровня антител.

Обсуждение полученных результатов

На первом этапе работы провели анализ структуры новых антигенов для разработки иммуноферментного метода. Конъюгированные антигены биогенных аминов и опиоидных пептидов синтезировали с использованием полимерной матрицы, путём конденсации исходных соединений, содержащих свободную аминогруппу, с поли(4-нитрофенил)акрилатом. Получены конъюгаты, содержащие различное замещение (100 %, 50 %, 30 %, 10–15 %) молекул лиганда, связанных с макромолекулярным носителем.

При разработке ИФА определения антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам использовали указанные выше синтезированные конъюгированные антигены с различным замещением полимерной матрицы молекулами гаптена (таб.1). Это связано с тем, что при определении антител к любому из исследуемых антигенов на начальном этапе, мы изучали влияние структуры искусственного антигена на полноту связывания в ИФА с гетерогенной популяцией иммуноглобулинов, присутствующих в сыворотке крови человека. В результате обнаружено, что из всего разнообразия синтезированных конъюгированных

антигенов, комплексы с 10–15 % замещением полимерной матрицы биогенных аминов и опиоидных пептидов являются наиболее пригодными для определения всей популяции специфических иммуноглобулинов, которые, как известно, различаются по силе связывания с антигеном и содержанию в каждой индивидуальной сыворотке крови человека.

Таблица 1

Характеристика полученных антигенов

Процент замещения гаптеном полимерной матрицы	Результаты определения специфических антител в ИФА с конъюгированным антигеном, содержащем в качестве гаптена:				
	β -эндорфин	дерморфин	серотонин	гистамин	дофамин
100 %	Отсутствие зависимости при титровании антител	Отсутствие зависимости при титровании антител	Отсутствие зависимости при титровании антител	Отсутствие зависимости при титровании антител	Отсутствие зависимости и при титровании антител
50–30 %	Узкий диапазон выявления антител	Узкий диапазон выявления антител	Узкий диапазон выявления антител	Узкий диапазон выявления антител	Узкий диапазон выявления антител
10–15 %	Полное связывание всего спектра антител	Полное связывание всего спектра антител	Полное связывание всего спектра антител	Полное связывание всего спектра антител	Полное связывание всего спектра антител

Следующий раздел посвящён разработке ИФА определения антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам в сыворотке крови пациентов. В таблице 2 приведены обобщённые данные, полученные при анализе результатов подбора условий выполнения ИФА для определения антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам, на основании которых выбирали область линейной зависимости величины поглощения в ИФА, как от концентрации исследуемого антигена, так и от разведения анализируемой сыворотки.

Таблица 2

Условия проведения ИФА для определения антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам в анализируемых образцах сыворотки крови

Исследуемый антиген, содержащий в качестве гаптена:	Изотип иммуноглобулинов	Интервал разведения сыворотки	Интервал концентрации сорбируемого антигена, мкг/мл
β - эндорфин	IgM	1/200 – 1/800	0,5 – 2
	IgG	1/100 – 1/600	0,5 – 2
Дерморфин	IgM	1/100 – 1/400	1 – 3
	IgG	1/100 – 1/200	0,5 – 2
Гистамин	IgM	1/100 – 1/1200	0,05 – 2
	IgG	1/100 – 1/800	0,05 – 3

Серотонин	IgM	1/100 – 1/800	0,5 – 3
	IgG	1/100 – 1/400	0,5 – 2
Дофамин	IgM	1/200 – 1/600	0,5 – 1
	IgG	1/100 – 1/800	0,5 - 2

На основании выбранных условий ИФА проводили определение содержания антител IgG и IgM класса в индивидуальных сыворотках здоровых лиц и больных аллергическим поллинозом, нейродермитом, опишной наркоманией. Результаты анализа показали, что уровень антител к исследуемым антигенам у больных достоверно отличается от нормы, установленной в группе доноров (среднедонорское значение в ИФА±3σ). Причём, необходимо отметить, что у пациентов, входящих в группу больных, происходит одновременное изменение уровня антител IgG и IgM класса, что свидетельствует о том, что иммунная система в ответ на изменение метаболизма ключевых биорегуляторов, сопровождающих развитие патологических процессов, участвует в поддержании гомеостаза, регулируя содержания е-АТ к биогенным аминам и опиоидным пептидам. Проведённая статистическая обработка полученных данных позволила выявить некоторые закономерности. Так, установили, что в целом по группе в зависимости от характера изменения уровня антител к исследуемому антигену больных можно условно подразделить на три категории: группа с пониженным, с повышенным и соответствующим норме содержанием антител (таб. 3).

Таблица 3

Количество больных (в %) с измененным уровнем антител при различных аллергических заболеваниях

Конъюгированный антиген, содержащий в качестве гаптена:	Уровень антител по сравнению с донорами	Нейродермит (70 чел.)		Аллергический поллиноз (55 чел.)		Больные опишной наркоманией (25 чел.)	
		IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
β-эндорфин	Повышенный	37	28	35	19	12	10
	Норма	28	17	25	26	8	2
	Пониженный	35	65	40	55	5	13
Дерморфин	Повышенный	42	25	37	27	12	10
	Норма	18	45	23	33	6	5
	Пониженный	40	30	40	40	9	10
Гистамин	Повышенный	85	12	83	31	15	5
	Норма	10	38	9	15	2	11
	Пониженный	5	50	8	54	3	9
Серотонин	Повышенный	14	47	38	19	14	7
	Норма	25	19	8	37	5	6
	Пониженный	61	34	54	44	6	12
Дофамин	Повышенный	24	25	35	18	12	9
	Норма	36	45	20	39	3	6

	Пониженный	40	30	45	43	10	10
--	------------	----	----	----	----	----	----

Оценку изменения уровня естественных антител IgG и IgM класса провели на более обширном клиническом материале – у больных с патологиями нервной и иммунной системы (наркомания, аллергический поллиноз, нейродермит). Результаты сравнительного определения специфичности взаимодействия антител к биогенным аминам и опиоидным пептидам: энкефалинам, β-эндорфину, дерморфину и структурным аналогам этих веществ представлены в таблице 4.

Таблица 4

Данные ИФА выявления антител IgM класса к опиоидным пептидам и биогенным аминам в сыворотке крови больных и доноров

Исследуемый антиген	Значение оптической плотности (OD ₄₅₀) в ИФА в среднем по группе			
	Больные опийной наркоманией	Больные нейродермитом	Больные аллергическим им поллинозом	Доноры
Мет-энкефалин	0.85±0.044*	0.57±0.033	0.40±0.023*	0.67±0.026
β - эндорфин	0.87±0.068*	0.53±0.026	0.39±0.036*	0.62±0.025
Дерморфин	0.94±0.032*	0.57±0.023	0.33±0.033*	0.66±0.017
H-Tyr-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	0.61±0.021	0.53±0.027	0.47±0.047	0.64±0.015
[Arg ¹]-дерморфин	0.69±0.040	0.59±0.030	0.49±0.030	0.68±0.011
[D-Ala ⁴]-дерморфин	0.61±0.017	0.63±0.022	0.51±0.012	0.71±0.015
H-Tyr-DAlaPheDAlaOH	0.84±0.037	0.53±0.037	0.47±0.047	0.69±0.024
[Arg ²]-дерморфин	0.50±0.047	0.56±0.049	0.42±0.039	0.66±0.020
Серотонин	0.88±0.015*	0.39±0.032*	0.33±0.032*	0.67±0.013
Дофамин	0.58±0.049	0.61±0.027	0.38±0.042	0.72±0.027
Гистамин	0.97±0.052*	0.37±0.042*	0.34±0.054*	0.64±0.041

*p<0,05

Для группы обследованных больных содержание антител IgM класса было наиболее информативным и позволяло обнаружить высокий процент пациентов с достоверным изменением уровня антител по сравнению с нормой. Наблюдается специфическое увеличение уровня антител IgM класса, связывающих дерморфин, β-эндорфин, энкефалин (p<0.05). Содержание антител к ряду аналогов дерморфина в целом по группе достоверно не отличалось от нормы. Интересные результаты были получены при анализе содержания IgM антител специфичных к опиоидным пептидам для больных аллергическим поллинозом. В этой группе выявлено достоверное снижение нормального уровня е-АТ, связывающих все исследуемые эндогенные опиоидные пептиды. Более того, это снижение было высокоспецифичным именно для эндогенных нейропептидов, поскольку в среднем по группе не было обнаружено достоверных различий для антител IgM класса, связывающих синтетические аналоги дерморфина. В группе больных нейродермитом отмечается тенденция к снижению содержания е-АТ к эндогенным опиоидным пептидам. Но

достоверной разницы по сравнению с группой доноров не установлено. Для больных опиоидной наркоманией можно наблюдать достоверное повышение содержания антител IgM класса к серотонину и гистамину ($p < 0,05$). Полученный факт подтверждает известные данные об участии серотонинергической системы в развитии зависимости к наркотикам. Прием наркотика ведёт к повышенному выбросу серотонина, который в свою очередь оказывает влияние на синтез специфических иммуноглобулинов, способных, вероятно, выполнять компенсаторную функцию и регулировать концентрацию данного соединения. Для группы больных аллергическим поллинозом и нейродермитом характерно достоверное ($p < 0,05$) понижение содержания антител IgM класса к серотонину и гистамину.

Заключение. Из совокупности представленных данных о содержании е-АТ к биогенным аминам и опиоидным пептидам в норме и клинике заболеваний следует, что уровни этих антител изменяются при патологических процессах, связанных с нарушениями обмена их антигенных мишеней и, возможно, индуцированы этими нарушениями. Причём, изменения уровней е-АТ происходят таким образом, чтобы компенсировать патологические отклонения в метаболизме антигенов и тем самым нейтрализовать их патогенетическое действие (если антигены биологически активны). Это позволяет сделать предположение, что е-АТ выполняют в норме гомеостатическую или защитную функцию, поддерживая концентрации различных эндогенных соединений в пределах нормы. Патологическая роль е-АТ, по-нашему мнению, может проявляться лишь при их чрезмерной продукции, связанной, возможно, с нарушением регуляции их синтеза, и может рассматриваться в этом случае, как симптом аутоиммунного расстройства; или, наоборот, при недостаточной их продукции, в результате специфического иммунодефицита (у больных нейродермитом и аллергическим поллинозом). В этом случае проявляется патологическая роль не е-АТ, а их антигенной мишени.

Список литературы

1. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественные антитела и их физиологические функции // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2014. – № 3. – С.75-81.
2. Мягкова М.А. Естественные антитела к низкомолекулярным соединениям. – М.: МГУЛ, 2001. – 268 с.
3. Мягкова М.А., Дудко Т.Н., Панченко Л.Ф., Петроченко С.Н. Определение естественных антител к эндогенным биорегуляторам у больных игроманией методом иммуноферментного анализа // Наркология. – 2006. – № 12. – С. 39-42.

4. Полетаев А.Б. Физиологическая иммунология (естественные аутоантитела и проблемы наномедицины). – М.: Миклош, 2011. – 219 с.
5. Elluru S.R. et al. Modulation of human dendritic cell maturation and function by natural IgG antibodies // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – V. 7(6). – P. 487-90.
6. Han B.W., Herrin B.R., Cooper M.D., Wilson I.A. Antigen recognition by variable lymphocyte receptors // *Science.* – 2008. – V. 321(5897). – P.1834-7.
7. Madi A. et al. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106. – P. 14484-9.
8. Mostafa G.A., Ibrahim D.H., Shehab A.A., Mohammed A.K. The role of measurement of serum autoantibodies in prediction of pediatric neuropsychiatric systemic lupus erythematosus // *J. Neuroimmunol.* – 2010. – V. 227. – pp. 195-201.
9. Van Ree R., Aalberse R.C. Rabbit IgG directed to a synthetic C-terminal peptide of the major grass pollen allergen Lol p I inhibits human basophil histamine release induced by natural Lol p I. // *Int Arch Allergy Immunol.* – 1995. – V.106. – No. 3. – pp. 250-257.