

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИТЕЛ К ГИСТАМИНУ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Морозова В.С., Другова Е.Д., Петроченко С.Н., Мягкова М.А.

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

Разработан метод ИФА определения антител к гистамину, позволяющий установить изменения их содержания в кровотоке больных с аллергическими расстройствами. Проведено аффинное выделение естественных антител к гистамину и исследованы их иммунохимические свойства. Из каждого образца хроматографированы антитела к гистамину IgG и IgM класса. У 70–80 % обследованных больных выделены антитела IgM класса, а у остальных – IgM и IgG класса. Антитела индивидуальны по своей специфичности и не дают перекрёстных реакций с исследованными ингибиторами. Установлено изменение аффинности и специфичности антител при патологических состояниях, характеризующихся нарушением метаболизма гистамина. Для больных нейродермитом уровень антител к гистамину различался в зависимости от тяжести процесса и был повышенным для пациентов первой группы (SCORAD равнялся 49.60±3,44). Показаны новые диагностические возможности выявления естественных антител для мониторинга болезненных процессов с участием гистамина.

Ключевые слова: антитела, диагностические маркеры, гистамин, аффинная хроматография, иммунохимические свойства.

IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF NATURAL ANTIBODIES TO HISTAMINE IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Morozova V.S., Drugova E.D., Petrochenko S.N., Myagkova M.A.

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

The method of ELISA detection of antibodies to histamine, allowing you to install altering their content in the blood of patients with allergic disorders. A selection of natural antibody affinity to histamine and investigated their immunochemical properties. Each sample was chromatographed histamine antibody IgG and IgM class. In 70–80 % of the patients allocated IgM class antibodies, and at ostalnyh – IgM and IgG class. Antibodies are unique in their specificity and do not give cross-reactions studied inhibitors. The change in affinity and specificity of antibodies in pathological conditions characterized by impaired metabolism of histamine. Showing new diagnostic capabilities identify natural antibodies to monitor disease processes involving histamine.

Keywords: antibodies, diagnostic markers, histamine, affinity chromatography, immunochemical properties.

Изучению метаболизма нейромедиаторов в крови при различных заболеваниях посвящены работы, в которых установлена роль гистамина. Показано, что он является регулятором многих жизненно важных функций организма и участвует в процессах нейротрансмиссии, иммуномодуляции, гемопоэза, заживления ран, биологических ритмах день-ночь [3]. Накопление гистамина в организме может привести к патологическим явлениям. Изучено его выделение из клеток при анафилактических и аллергических реакциях и установлена роль гистамина как медиатора гиперчувствительности немедленного типа. Эти процессы сопровождаются увеличением содержания указанного нейромедиатора, причем степень выраженности реакций определяется повышением его концентрации. Нарушение метаболизма гистамина, приводящее к увеличению его содержания в организме, наблюдается и при нейродермите, поллинозе, которые относятся к группе аллергических

расстройств [1]. Создание диагностических тестов определения гистамина для мониторинга его физиологических функций является актуальной задачей. Для этой цели используют лабораторные способы иммуноанализа, основанных на применении антител [4]. В последние годы расширились диагностические возможности применения антител для оценки изменения содержания эндогенных биорегуляторов. Наряду с разработкой классических методов иммуноанализа, в которых применяют моноклональные антитела, либо созданные по технологии иммунизации животных, получили развитие методы определения естественных антител к биомолекулам различного вида [2]. Установлено, что важной составной частью циркулирующих иммуноглобулинов являются естественные антитела (Е-АТ) [5,6]. 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. Предметом данного исследования являлись естественные антитела к гистамину, присутствующие в сыворотке крови больных с аллергическими расстройствами.

Цель данной работы заключалась в выделении аффинной хроматографией естественных антител к гистамину из сыворотки крови больных аллергическими расстройствами, проведении сравнительного исследования их иммунохимических свойств и установлении возможности диагностического применения.

Материалы и методы

Основными материалами работы были образцы биологической жидкости – сыворотки крови. 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. Степень тяжести кожного процесса определяли с помощью индекса SCORAD. Больные нейродермитом были распределены на 2 группы: первую группу со средней степенью тяжести составили 16 человек, индекс SCORAD равнялся $49,60 \pm 3,44$. Вторую с тяжелыми проявлениями заболевания и индексом SCORAD $68,142,2 \pm 1,23$ – 13 человек. 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.

Получение конъюгата гистамина на основе полимерной матрицы

Синтез конъюгированного антигена гистамина 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) гистамина и выдерживали реакционную смесь в течение суток при температуре 20 °С. Добавляли для инактивации не прореагировавшего активированного эфира 5 % раствор аммиака. Растворитель упаривали в вакууме. Оставшееся масло многократно промывали эфиром и растворяли в 1 мл ДМФА_{абс}, оставляли на хранение при температуре -20 °С. В результате был получен конъюгат гистамина, содержащий 15 молей гаптена на моль полимерного носителя.

ИФА определения антител к гистамину в сыворотке крови человека

Планшет сенсibilизировали раствором конъюгированного антигена гистамина (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. Далее выполняли стандартную процедуру ИФА. Полученные данные обработали статистически по критерию Стьюдента.

Получение сорбента для аффинной хроматографии антител к гистамину

При получении сорбента для аффинной хроматографии 2 г суспензии макропористого аминопропилированного стекла, предварительно активированного полинитрофенилакрилатом, к 3 мл диметилформамида (ДМФ) добавляли раствор 5 мг гистамина в 1 мл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали ночь при 4 °С, затем добавляли 2 мл 0,1 % этаноламина в ДМФ. Через 2 ч полученный сорбент промывали 100 мл ЗФР, а затем таким же объемом ЗФР, содержащим 0,05 % твина-20. Для определения емкости полученного сорбента использовали кислотный гидролиз 0,1 г активированного гистамином макропористого стекла с последующим определением гидролизата с помощью элементного анализа. В результате установлено, что иммуносорбент содержит 0,8 мг/г ковалентно связанного гистамина.

Выделение антител к гистамину аффинной хроматографией

Для выделения антител к гистамину из сыворотки крови больных нейродермитом и доноров иммуносорбент помещали в колонку и уравнивали ЗФР, затем добавляли 2 мл исследуемой сыворотки, инкубировали в течение 10 минут. Далее осуществляли элюцию не

связавшихся сывороточных белков ЗФР, используя для контроля выходящих фракций проточную кювету при длине волны 280 нм. После падения оптической плотности в проходящем через колонку элюате до нуля, проводили смену буфера на 0.2 М глицин-HCl (pH 2.8) и выделяли с колонки вторую фракцию, в которой немедленно доводили pH до 7.2 раствором 1 М K_2HPO_4 . Определили концентрацию антител, связывающих гистамин в выделенных фракциях. Содержание иммуноглобулинов, хроматографированных из сыворотки крови больных находилось в среднем интервале 0.062 ± 0.040 мг/мл, а в сыворотке крови доноров составляло 0.022 ± 0.004 мг/мл.

Ингибиторный ИФА для оценки специфичности и аффинности антител к гистамину

Раствором выбранной концентрации антигена гистамина (диапазон от 100 до 300 нг/мл) в карбонатном буфере 0.05 М (pH 9.5) сенсibilизировали лунки планшета (по 100 мкл) в течение 18 часов при температуре 4 °С, затем промывали и добавляли по 100 мкл смеси, содержащей выделенные антитела в разведении 1:2 и различные концентрации ингибитора в интервале от 10^{-12} до 10^{-6} моль/л. Планшет инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С и проводили описанные выше операции ИФА.

Определение специфичности антител к гистамину

На основании полученных данных ИФА строили кривую зависимости изменения оптической плотности (OD_{450}) от концентрации добавленного ингибитора, по которой устанавливали условия 50 % торможения для каждого образца сыворотки при взаимодействии антител с иммобилизованным на планшете антигеном. Специфичность рассчитывали, как отношение молярных концентраций антигена и исследуемого соединения, вызывающих в ИФА 50 % ингибирование.

Расчёт константы аффинности антител к гистамину

Расчёт K_a проводили на основании кривых ингибиторного ИФА, при использовании в качестве ингибитора исследуемого антигена. K_a определяли как обратную величину концентрации свободного ингибитора, необходимую для 50 % торможения антител (I_{50}), связавшихся с иммобилизованным на планшете антигеном: $K_a = 1/I_{50}$.

Обсуждение полученных результатов

Конъюгированные антигены гистамина синтезировали с использованием полимерной матрицы, путём конденсации исходного соединения, содержащего свободную аминогруппу, с поли(4-нитрофенил)акрилатом. Соотношение гаптена и полимерного носителя варьировало в реакции от 70 % до 10 % замещения гистамином. Обнаружено, что из всего разнообразия синтезированных конъюгированных антигенов, комплексы с 10–15 % замещением полимерной матрицы гистамином 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. Выявление иммуноглобулинов в сыворотке крови пациентов, связывающих гистамин, выполняли твердофазным ИФА

Таблица 1

Условия ИФА определения антител к гистамину в анализируемых образцах сыворотки крови

Исследуемый антиген, содержащий в качестве гаптена:	Изотип иммуноглобулинов	Интервал разведения сыворотки	Интервал концентрации сорбируемого антигена, мкг/мл
Гистамин	IgM	1/100 – 1/1200	0,05 – 2
	IgG	1/100 – 1/800	0,05 – 3

На основании выбранных условий ИФА проводили определение содержания антител IgG и IgM класса в индивидуальных сыворотках здоровых лиц и больных нейродермитом, аллергическим поллинозом (рис.1).

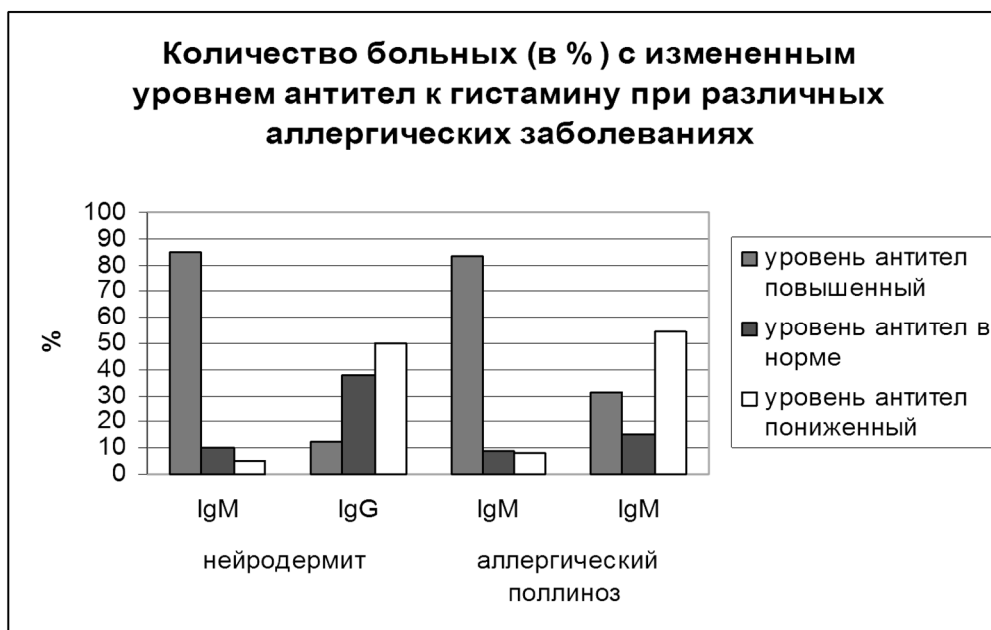


Рис. 1. Изменение уровня антител к гистамину при различных аллергических заболеваниях

Проведённая статистическая обработка полученных данных позволила установить, что больных условно можно подразделить на три категории: группа с пониженным, с повышенным и соответствующим норме содержанием антител. В плане дальнейшего развития исследования необходимо:

- 1) Установить, как связаны изменения уровня антител с развитием заболевания.
- 2) Определить, насколько эти изменения являются специфическими и отражают участие гистамина в патогенезе.

Данные ИФА выявления антител IgM класса к гистамину в сыворотке крови
больных и доноров

Исследуемый антиген	Значение оптической плотности (OD ₄₅₀) в ИФА в среднем по группе			
	Больные нейродермитом 1 группа	Больные нейродермитом 2 группа	Больные аллергическим поллинозом	Доноры
Гистамин	0.72±0.042*	0.41±0.039*	0.34±0.054*	0.64±0.041

*p<0,05

Для группы больных содержание антител IgM класса было наиболее информативным и позволяло обнаружить высокий процент пациентов с достоверным изменением уровня антител по сравнению с нормой. Причем для больных нейродермитом уровень антител к гистамину различался в зависимости от тяжести процесса и был повышенным для пациентов первой группы (SCORAD равнялся 49.60±3,44).

Выделение антител к гистамину из сыворотки крови доноров и больных нейродермитом и поллинозом проводили аффинной хроматографией с помощью синтезированного иммуносорбента. Из сыворотки крови доноров и больных выделены антитела к гистамину IgG и IgM класса. Причём у 60 % доноров установлено наличие антител класса IgG и только в единичных случаях 10 % одновременно присутствовали IgM и IgG антитела. При исследовании изотипического состава антител против гистамина, выделенных из сыворотки крови больных, обнаружены значительные отличия по сравнению с донорами. У 70–80 % обследованных больных выделены антитела IgM класса, а у остальных – IgM и IgG класса. Для анализируемых образцов антител против гистамина определили константу аффинности (K_a). В таблице 3 представлены обобщенные данные значений K_a для больных аллергическим поллинозом, нейродермитом и доноров. В группе больных наблюдается возрастание аффинности антител и K_a лежит в диапазоне от 10⁵-10⁷ M⁻¹ до 10⁷-10¹⁰ M⁻¹.

Таблица 3

Определение K_a для антител, выделенных из сыворотки крови доноров и больных

Исследуемый антиген	Диапазон K _a , M ⁻¹			
	Группа больных		Группа доноров	
гистамин	IgG	IgM	IgG	IgM
	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ¹⁰	10 ³ -10 ⁴	10 ³ -10 ⁴

Далее для всех исследуемых образцов аффинно очищенных антител была изучена специфичность связывания с некоторыми антигенами, имеющими либо сходные с гистамином структурные фрагменты, либо проявляющих похожую физиологическую активность (рис. 2). В результате установлено, что все выделенные из сыворотки крови антитела индивидуальны по своей специфичности и не дают перекрёстных реакций с исследованными ингибиторами, отличающимися по структуре от использованных для аффинной хроматографии.

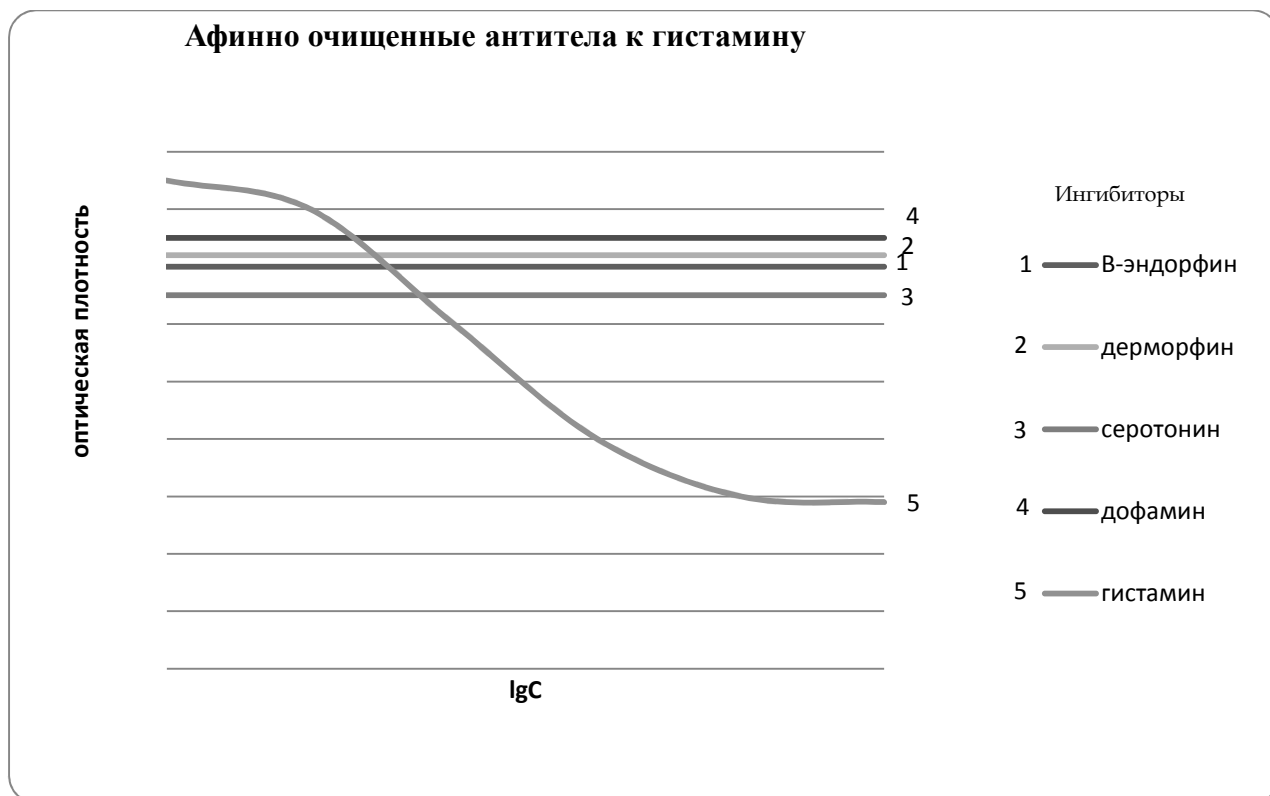


Рис. 2. Специфичность антител, выделенных из сыворотки крови больных

Таким образом, разработанный метод ИФА определения антител к гистамину позволяет установить изменения содержания антител в кровотоке больных при патологических состояниях, характеризующихся нарушением метаболизма указанного биорегулятора. Проведено исследование иммунохимических свойств естественных антител к гистамину. Показаны новые диагностические возможности выявления естественных антител для мониторинга болезненных процессов с участием гистамина.

Список литературы

1. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественных 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. Maintz L. and Novak N. Histamine and histamine intolerance // Am. J. Clin. Nutr. – 2007. – V.85. – P.1185-1196.
4. Van Ree R, Aalberse RC. 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. – № 3. – pp. 250-257.
5. 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.
6. 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.