

УДК 615.9:57.08
©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ОПИАТНЫМ РЕЦЕПТОРАМ МЕТОДАМИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА.

*А.В.Харитонов¹, Е.Р.Бычков¹, О.К. Гранстрем¹, Ю.И.Поляков¹,
А.Ю.Меньшикова², Т.Г.Евсеева², С.А.Дамбинова¹*

¹Институт мозга человека РАН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Павлова, 9,
факс (812) 234-3247; электронная почта: rsp@brain.nw.ru

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004 Санкт-Петербург,

Изучена адсорбционная способность пяти видов латексов для синтетических пептидных фрагментов μ и δ опиатных рецепторов. Исследованы уровни аутоантител к опиатным рецепторам в сыворотке крови больных опишной наркоманией с помощью реакции латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа. Больные опишной наркоманией демонстрировали положительную реакцию латекс агглютинации при содержании специфических аутоантител в сыворотке крови 10,4 мкг/мл и выше в 71,4% случаев. Уровень аутоантител к опиатным рецепторам был увеличен у больных опишной наркоманией в 2,8 раза по сравнению с контролем. Выявлена корреляция между показателями уровня аутоантител к опиатным рецепторам, которые были получены методами реакции латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о специфических изменениях иммунной системы, связанных с нарушениями ЦНС (в частности, при опишной наркомании). Таким образом, уровень аутоантител к опиатным рецепторам может быть использован как новый критерий для диагностики опишной наркомании.

Ключевые слова: аутоантитела, реакция латекс агглютинации, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ Неврологические заболевания часто сопровождаются увеличением уровня аутоантител к рецепторным белкам нервной ткани: так, при пароксизмальных состояниях головного мозга увеличивается содержание аутоантител к GluR1- и GluR3-субъединицам AMPA глутаматного рецептора [1, 2], при нарушении мозгового кровообращения - аутоантител к NR2A-субъединице глутаматного рецептора NMDA типа [3], при опишной наркомании - аутоантитела к μ - и δ - опиатным рецепторам [4]. Наблюдаемые изменения в уровне аутоантител к белкам нервной ткани, вероятно, обусловлены специфическим вовлечением определенных рецепторных белков в патологический процесс и их усиленным разрушением и образованием антител к фрагментам рецепторов.

Накопление антител к антигенным детерминантам в крови больных может быть определено с помощью различных иммунологических методов. В нашей лаборатории для этой цели обычно применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием в качестве антигена синтетических пептидных фрагментов μ - и δ - опиатных рецепторов, который позволяет проводить лабораторную диагностику опишной зависимости [5]. Однако этот тест требует наличия приборного обеспечения и определенного навыка работы. Более простым

АНТИТЕЛА К ОПИАТНЫМ РЕЦЕПТОРАМ

методом, в настоящее время широко используемым в лабораторной практике для анализа уровня антител, является реакция латекс-агглютинации (РЛА) [6, 7]. Этот метод анализа не требует дорогостоящего оборудования, хорошо воспроизводим и прост в выполнении. При создании агглютинационных латексных тест-систем в качестве действующего начала используют различные иммунореагенты, которые связываются с частицами латекса. Среди иммунореагентов главную роль играют белки и синтетические пептидные олигомеры, являющиеся антигенными детерминантами. Сенсибилизированный антигеном латекс способен адсорбировать антитела из биологических жидкостей [8]. В настоящей работе в качестве сенсибилизирующих агентов были использованы синтетические пептидные фрагменты, соответствующие аминокислотным последовательностям опиатных рецепторов.

Таким образом, целью данной работы явилась оценка возможности определения аутоантител к опиатным рецепторам в сыворотке крови больных опишной наркоманией методом латекс-агглютинации и сравнение её эффективности с иммуноферментным анализом.

МЕТОДИКА. Уровни антител к синтетическим пептидным фрагментам μ - и δ - опиатных рецепторов были исследованы методами РЛА и иммуноферментного анализа в крови 51 человека. Синтетический пептид длиной 21 аминокислотный остаток, соответствующий аминокислотным последовательностям консервативного участка общего для μ - и δ - опиатных рецепторов человека, был получен методом твердофазного синтеза ("Genemed Synthesis, Inc". США). Чистота пептида составляла 96 %.

Группа больных, страдающих опишной наркоманией, составила 23 человека. Контрольная группа состояла из 28 здоровых доноров, не употребляющих наркотических и седативных средств. Возраст обследованных составлял 16-35 лет. Пробы крови у больных опишной наркоманией отбирали в течение месяца после отмены наркотика. Сыворотку до анализа хранили при температуре -70°C .

Для получения латексных диагностикумов было выбрано пять серий латексов: сополимер полистерола с акролеином (диаметр 0,61 микромметр), сополимер полиметилметакрилата с акролеином (диаметр 1,02 мкм), полиметилметакрилат с карбоксильными группами (диаметр 0,72 мкм), полистирол с карбоксильными группами (диаметр 1,0 мкм), полистирол с карбоксильными группами (диаметр 0,84 мкм) (Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Иммобилизацию синтетического пептидного фрагмента на частицы латекса осуществляли следующим образом: перед сенсибилизацией частицы латекса отмывали два раза фосфатным буфером pH 8,0, доводили до концентрации 1% и смешивали с антигеном. Сенсибилизирующая доза антигена составляла 1 мкг на 1 мл латекса. Смесь инкубировали 1,5 часа при температуре 37°C , частицы отмывали фосфатным буфером и инкубировали в глициновом буфере pH 7,8 еще на 1 час для инактивации оставшихся свободными функциональных групп. Затем частицы латекса переводили в фосфатный буфер. Рабочая концентрация латекса для реакции в планшетах составляла 0,05%. Чувствительность латексных диагностикумов оценивали в РЛА. При изучении чувствительности латексных диагностикумов с различными антигенами выявляли конечный титр антител со стандартной сывороткой в зависимости от видов латекса. РЛА ставили микрометодом в полистироловых планшетах для иммунологических реакций с U-образным дном. Сыворотки добавляли в объеме 75 мкл в первую лунку каждого ряда, а затем разбавляли с двукратным шагом разведений в 75 мкл изотонического раствора NaCl. В каждую лунку добавляли по 75 мкл латексного диагностикума. Реакцию учитывали визуально через 16-20 часов по 4-х крестовой системе. За титр сыворотки принимали максимальное ее разведение, при котором наблюдалась агглютинация латекса на "4+". При титровании сывороток с контрольным латексом наблюдали полное отсутствие агглютинации латекса.

Количественное определение связавшихся с латексом антител проводили при помощи построения соответствующей калибровки; РЛА (сополимер полиметилметакрилата с акролеином (диаметр 1,02 мкм) наблюдалась при минимальной концентрации специфических антител (IgA + IgG + IgM) 2,6 мкг/мл. Данная цифра была получена путем вычитания количества не специфически связавшихся антител с несенсибилизированным пептидом латексом от общего количества связавшихся антител с сенсибилизированным латексом. Связавшиеся антитела смывали раствором 3М NaCl. Содержание белка в элюенте определяли по методу Лоури [9]. Концентрацию белка определяли, используя калибровочную кривую, построенную для стандартного белка в диапазоне от 1 мкг/мл до 1500 мкг/мл. Оптическую плотность измеряли при длине волны 750 нм. Таким образом, полученная калибровка позволяла количественно оценивать результаты РЛА путем умножения приведенного коэффициента на максимальный титр разведения сыворотки, при котором наблюдалась реакция латекс-агглютинации. Для каждого из других видов латексов процедура определения количества связавшихся антител была аналогичной.

Иммуноферментный анализ уровня аутоантител к синтетическим пептидным фрагментам опиатных рецепторов проводили на иммунологических планшетах высокой сорбционной емкости "Biohit". Синтетический пептидный фрагмент μ - δ опиатного рецептора наносили в количестве 0,5 мкг на ячейку. Перед анализом планшеты промывали фосфатным буфером, содержащем 0,05% Твин-20 (200 мкл по 10 мин) и инкубировали с сыворотками крови - 100 мкл в течение 1 часа на шейкере. Сыворотки крови разводили в фосфатном буфере 1:50. После трех промывок фосфатным буфером с 0,05% Твин-20 наносили вторые антитела к иммуноглобулинам G (в объеме 100 мкл), конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали в течение 1 часа на шейкере. Оптимальное разведение вторых антител определяли опытным путем и, обычно, оно составляло 1:10000 - 1:30000. После окончания инкубации планшет промывали фосфатным буфером с 0,05% Твин-20 три раза по 10 мин в объеме 200 мкл. Для развития окраски на планшет наносили по 100 мкл раствора орто-фенилендиамина (0,5 мг/мл) на 0,05 М фосфат-цитратном буфере pH 5,0, содержащем 0,014% H_2O_2 , и инкубировали в течение 20 мин в темноте. Развитие окраски останавливали добавлением 30 мкл 50%-ной серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм с использованием многоканального спектрофотометра "Dinatech".

Для оценки связи между показателями использовали коэффициент корреляции Пирсона, статистическую достоверность межгрупповых различий вычисляли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Так как для обеспечения оптимальной адсорбции пептидных фрагментов на поверхности латекса существенное значение имеет тип функциональных групп на поверхности микросфер, было исследовано пять видов латекса. Проведенные исследования полимерных суспензий со стандартной сывороткой позволили установить оптимальный тип латекса и функциональные группы, обеспечивающие высокую чувствительность теста, которая оценивалась по максимальному титру антител, выявляемому в РЛА (табл. 1). Наибольшая серологическая активность при использовании в качестве антигена синтетического фрагмента μ - и δ - опиатных рецепторов наблюдалась при ковалентном связывании с частицами полистирола с карбоксильными группами (диаметр 1,02 мкм).

Величины антител к μ - и δ - опиатным рецепторам в группах больных опиной наркоманией, эпилепсией и здоровых доноров, выявленные методом РЛА, представлены в таблице 2. Повышенным считали уровень антител в количестве 10,4 мкг/мл и более, который не наблюдался в сыворотках здоровых людей. Группа больных опиной наркоманией отличалась высокой частотой обнаружения повышенного уровня антител к опиатным рецепторам. Уровень антител в количестве 10,4 мкг/мл и выше у больных опиной наркоманией

АНТИТЕЛА К ОПИАТНЫМ РЕЦЕПТОРАМ

регистрировался в 71,4%. Среднее количество специфических аутоантител в группе больных опишной наркоманией составило $9,91 \pm 0,36$ мкг/мл, что достоверно выше в 2,8 раз по сравнению с группой здоровых доноров. Полученные данные свидетельствуют о специфичности выявленных нами изменений уровня антител к мю- и дельта- опиатным рецепторам у больных опишной наркоманией.

Таблица 1. Величина титра антител к синтетическим пептидным фрагментам мю и дельта опиатных рецепторов при их адсорбции на разных типах латекса в реакции латекс-агглютинации со стандартной сывороткой.

Тип латекса	Чувствительность латексных диагностикумов	
	Количество специфических антител связанных синтетическим пептидным фрагментом мю- и дельта- опиатных рецепторов, мкг/мл	
1. Сополимер полистирола с акролеином (диаметр=0,61 мкм)	0	
2. Сополимер полиметилметакрилата с акролеином (диаметр=1,02 мкм)	$5,2 \pm 0,3$	
3. Сополимер полиметилметакрилата с карбоксильными группами (диаметр=0,72 мкм)	0	
4. Полистирол с карбоксильными группами (диаметр=1,0 мкм)	$7,8 \pm 0,5$	
5. Полистирол с карбоксильными группами (диаметр=0,84 мкм)	0	

Таблица 2. Распределение уровня аутоантител к опиатным рецепторам в обследованных группах, выявленных методом РЛА.

Группы Обследованных	Величина Титра антител к опиатным рецепторам (-log ₂) $\bar{X} \pm m$	Количество Антител, связанных опиатным рецептором, мкг/мл	Всего (абс.)	Число обследованных			
				Количество АА < 10,4 мкг/мл		Количество АА ≥ 10,4 мкг/мл	
				абс.	%	абс.	%
Здоровые лица	$1,32 \pm 0,15$	$3,43 \pm 0,15$	28	28	100	0	0
Опишная наркомания	$3,81 \pm 0,36^*$	$9,9 \pm 0,36$	21	6	28,6	15	71,4

Примечание: УАА *1-2 группы P<0.001

Уровень антител к мю- и дельта- опиатным рецепторам у больных опишной наркоманией также был определен методом ИФА (табл. 3). В качестве верхней границы нормальных значений был принят уровень антител, характеризующийся возрастанием оптической плотности на 2 стандартных отклонения от среднего значения в контрольной группе, который составил 0,39 усл. ед. оптической плотности. Показано повышенное содержание антител у 69% больных. Установлена достоверная корреляция между уровнями антител у больных опишной наркоманией, измеренными с помощью РЛА и ИФА ($r=0,77$; $p<0,05$). У наркоманов с повышенным уровнем антител, выявленным РЛА результаты не всегда подтверждались ИФА. Наблюдаемые различия могут быть связаны с тем, что в ИФА измерялось содержание иммуноглобулина G к исследуемым антигенам, а в РЛА определялись антитела и других основных изотипов M и A. Таким образом, в проведенном нами сравнительном исследовании методами ИФА и РЛА были установлены достоверные различия содержания антител у больных опишной наркоманией и здоровых доноров, что может свидетельствовать об индукции

антител к опиатному рецептору при хронической опишной интоксикации. Антитела к опиатным рецепторам в крови людей, употребляющих наркотики, могли бы послужить важным диагностическим признаком. Преимуществом такой методики перед токсикологической экспертизой биологических жидкостей, свидетельствующей только об однократном приеме наркотиков, является возможность обнаружения антител к опиатному рецептору в отдаленные сроки после последнего введения наркотика в организм, что указывает на хроническую опишную интоксикацию [5].

Таблица 3. Распределение уровня аутоантител к опиатным рецепторам в обследованных группах, выявленных методами ИФА и РЛА.

Обследованная группа	Число обследованных	Уровень антител к мю- и дельта- опиатным рецепторам в ИФА, у.о.е.	Количество антител к мю- и дельта- опиатным рецепторам в РЛА, мкг/мл
Здоровые доноры	28	0,291±0,032	3,43±0,15
Больные опишной наркоманией	21	0,441±0,123	9,9±0,36

Таким образом РЛА можно рассматривать, как простой и надежный метод количественного определения аутоантител к рецепторным белкам нервной ткани, который наряду с ИФА может быть использован в диагностике ряда неврологических и наркологических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dambinova S.A., Granstrem O.K., Tourov A., Salluzzo R., Castello F., Izykenova G. A.* (1998) *J. Neurochem.*, **71**, 2088-2093.
2. *Rogers S.W., Andrews P.L., Gahring L.C., Whisenand T., Cauley K., Crain B., Hughes T.E., Heinemann S.F., McNamara J.O.* (1994) *Science*, **265**(5172), 648-651.
3. *Денисенко Т.В., Скулябин Д.И., Громов И.А., Черкас Ю.В., Илюхина А.Ю., Дамбинова С.А.* (1998) *Вопросы медицинской химии*, **44**, 584-590.
4. *Изыкенова Г.А., Сиренко В.В., Дамбинова С.А.* (1995) *Вопр. наркологии*. N 1, 45-49.
5. *Дамбинова С.А., Изыкенова Г.А.* (1997) *Ж. Высшей нерв. деят.* **42**(2), 1551-1556.
6. *Воробьева З.Г., Бурков А.Н., Блинова Т.В.* (1999) *Клиническая лабораторная диагн.* N5, 54-56.
7. *Аллилуев А.П., Королева И.С., Венгеров Ю.Я., Котельникова О.В., Медведева Н.В., Харитонова А.В., Яшина Н.В.* (1999) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **128**(11), 541-544.
8. *Коллинз У.П.* (1991) *Новые методы иммуноанализа*. М., Мир.
9. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Поступила 30.07.01.

**DETECTION OF THE ANTIBODIES TO OPIATE RECEPTORS BY
METHODS OF LATEX AGGLUTINATION AND
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY.**

*A.V.Kharitonova¹, E.R.Bychkov¹, O.K.Granstrem¹, U.I.Poliakov¹,
A.YU.Menshikova², T.G.Evseeva², S.A.Dambinova¹*

¹Institute of the Human Brain RAS 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlova str., 9;
fax (812) 234-3247, e-mail: rsn@brain.nw.ru

²Institute of Macromolecular Compounds RAS, 199004 St. Petersburg, Large ave., 31

Adsorption ability of few kinds of latex covered by synthetic peptide fragments of mu- and delta-opiate receptors (OR) is investigated. The levels of autoantibodies to opiate receptors fragments in the blood serum of patients with drug abuse are detected by latex agglutination and ELISA. The patients with drug abuse demonstrated positive latex agglutination reaction for level specific antibodies from 10,4 mg/ml and higher in the 71,4% of cases. The levels of autoantibodies to OR in the blood of patients with drug abuse was in 2,8 times higher of control data. The correlation between levels of autoantibodies to opiate receptors obtained by methods of latex agglutination and ELISA is revealed. The obtained data confirms our hypothesis concerning existence of specific changes in immune system linked with some CNS disorders like drug abuse. Thus, the level of autoantibodies to opiate receptors could be used as new criterion for diagnostics of opiate abuse.

Key words: autoantibodies, reaction latex agglutination, enzyme-linked immunosorbent assay.