УДК 602.68:57.083

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТАМИНА

Другова Е.Д., Мягкова М.А.

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

Разработан конкурентный иммуноферментный метод количественного определения гистамина в сыворотке крови с использованием кроличьих аффинно очищенных специфических антитела и синтетического антигена, полученного из производного гистамина и овальбумина. Синтезированы конъюгаты с БСА (Гис-БСА) и Ова (Гис-Ова). Осаждение IgG из сыворотки кролика, имеющей наиболее высокий титр на гаптен (1:8000), проводили октановой кислотой. Выделение антител выполняют аффинной хроматографией на колонке с NSH- активированной сефарозой. Для выявления диагностической значимости разработанного ИФА проведено определение гистамина в 20 образцах сыворотки крови пациентов с аллергическими заболеваниями. С помощью разработанного метода ИФА обнаружено увеличение содержания гистамина в 80% исследуемых образцах. По данным ВЖХ выявлено 50% образцов, положительных по содержанию гистамина. Предварительные исследования показали возможность использования данного метода в медицинской практике.

Ключевые слова: гистамин, антитела, аффинная хроматография, иммуноферментный анализ, диагностика заболеваний

ELISA DETERMINATION OF HISTAMINE

Drugova E.D., Myagkova M.A.

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

Competitive Immunoassay method developed in the serum quantification of histamine using a specific affinity-purified rabbit antibodies and the synthetic antigen derived from ovalbumin and histamine derivative. Synthesized conjugates with BSA (BSA GIS) and Ova (GIS Ova). Deposition of IgG from rabbit sera having the highest titer to the hapten (1: 8000) was performed octanoic acid. Isolation of antibodies is performed by affinity chromatography on a column of activated Sepharose NSH-. To identify the diagnostic value of the developed ELISA conducted determination of histamine in 20 samples of blood serum of patients with allergic diseases. With the help of the developed ELISA method showed an increased histamine content in 80% of the samples studied. According to HPLC revealed 50% of samples positive for histamine content. Preliminary studies have shown the possibility of using this method in medical practice.

Keywords: histamine, antibody affinity chromatography, immunoassay, diagnosis of diseases

В исследованиях последних лет значительное место занимает разработка методов, позволяющих контролировать изменения содержания эндогенных нейромедиаторов, осуществляющих регуляцию физиологических процессов, направленных на адаптацию организма к изменяющимся условиям внутреннего и внешнего окружения, препятствующих развитию патологических процессов. В связи с этим, создание диагностических тестов определения и мониторинга эндогенных биорегуляторов является актуальной задачей. Как правило, для обнаружения этих веществ используют физико-химические методы анализа, чаще всего основанные на различных видах хроматографии или иммунохимические способы-радиоиммунный, иммуноферментный и иммунофлюоресцентные анализы (РИА) и (ИФА) [1, 2]. Основным инструментом в разработке указанных методов являются антитела. Именно от иммунохимических свойств антител зависит чувствительность и специфичность определения эндогенного биорегулятора. Известно, что гистамин является

регулятором многих жизненно важных функций организма [3] и играет большую роль в патогенезе ряда болезненных состояний. Появляется в крови при патологических процессах (анафилактический шок, ожоги, крапивница и аллергические заболевания), при поступлении в организм некоторых химических веществ (к ним относятся психоактивные и токсические вещества) [4]. Отмечена высокая информативность определения гистамина в оценке клеточного звена иммунной системы. Клинический интерес представляет измерение количества высвобождаемого гистамина из базофилов при гиперчувствительности немедленного типа и количество гистамина в различных биологических жидкостях (плазма, моча, супернатант клеточных культур) после контакта с аллергеном [5].

Целью данного исследования являлась разработка твердофазного ИФА определения гистамина на основе антител, индуцированных иммунизацией и выделенных аффинной хроматографией из сыворотки крови кролика, установлении возможности диагностического применения метода.

Материалы и методы исследования

В работе использовались бычий сывороточный альбумин (БСА), овалбумин (Ова) («Sigma»), Сефадекс С-25, NSH-активированная сефароза («Sigma», «Pharmacia»), полистирольные планшеты фирмы «Nunc». Осаждение IgG проводили октановой кислотой («Sigma»). Сравнительное определение содержания гистамина в сыворотке крови проводили методом хроматографии (ВЖХ).

Для выявления специфичности ИФА использовали в качестве ингибиторов соединения, схожие по структуре и физиологической функции гистамину (сротонин, дофамин), а также некоторые пептидные нейромедиаторы (β -эндорфин, дерморфин).

Синтез конъюгатов гистамина с белками осуществляли методом смешанных ангидридов. В качестве функциональной группы, способной ковалентно связываться с белками в мягких условиях, использовали содержащуюся в гистамине свободную карбоксильную группу (1). Синтезированы конъюгаты с БСА (Гис-БСА) и Ова (Гис-Ова). Количество молей гистамина, связанных с одним молекулой белка, определяют с помощью тринитробензолсульфокислоты по разнице свободных аминогрупп в исходном белке и полученном конъюгированном антигене.

Для синтеза конъюгатов (Гис-БСА) растворяли 54 мг соединения (1) в 800 мкл безводного диметилформамида (ДМФА), добавляли при охлаждении и перемешивали 36 мкл безводного триэтиламина и 25 мкл изобутилхлорформиата. Через 40 мин. образовавшийся раствор при перемешивании по каплям добавляли к раствору 100 мг БСА в 8 мл 0,25 М натрия бикарбоната. Реакционную смесь оставляли на 18 ч. при 4 °С. Далее синтезированный конъюгат Гис-Бса выделяли гель-хроматографией на колонке с сефадексом С-25. Полученный конъюгат Гис-БСА по данным УФ-спектров содержал 20 молей (1) на один моль белка.

Конъюгат Гис-Ова синтезируют аналогично описанной методике, используя при этом следующие соотношения реагентов: 1 мг (1) растворяли в 0,1 ДМФА и добавляли 6,3 мкл изобутилхлорформиата в присутствии 1 мкл триэтиламина. Образовавшийся смешанный ангидрид приливали к раствору 30 мг Ова в 5 мл 0,25 М натрия бикарбоната. Синтезированный антиген выделяли гель-хроматографией на колонке с сефадексом С-25. Полученный конъюгат содержал 5 молей (1) на 1 моль Ова.

Для получения специфических антител использовали 6 кроликов-самцов массой 2,5 кг. Иммунизацию проводили введением конъюгата из расчета 1 мг на кролика в виде 50% эмульсии водного раствора Гис-БСА и полного адьюванта Фрейнда. В течение 1 мес. с интервалом 7 суток проводили внутрикожные инъекции по 0,2 мл. в точки вблизи позвоночника – в области лопаток и крестца. Реиммунизацию осуществляли ежемесячно, вводя по 0,5 мг конъюгата внутримышечно.

Через 3 мес. брали кровь и определяли титр полученных антисывороток, используя прямой ИФА. С этой целью в лунки планшета вносили по 100 мкл растворов конъюгатов Гис-Ова и Гис-БСА в концентрации от 10 мкг/мл до 100 нг/мл соответственно в 0,2М карбонатбикарбонатном буфере (рН 9,6). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, отмывали забуферным физиологическим раствором (ЗФР), содержащем 0,005% твин-20, стряхивали,

а затем в лунки планшета добавляли по 100 мкл кроличьих сывороток, используя серию двойных разведений от 1:10 до 1:10⁶ в ЗФР, содержащем 0,01% твин-20. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, отмывали (как описано выше), далее добавляли по 100 мкл в лунку конъюгата овечьих антител к иммуноглобулинам кролика, меченных ПХ в разведении 1:1000. Планшеты выдерживали в течение 45 мин (как описано выше) и вносили по 100 мкл субстратной смеси (0,04% о-фенилендиамин, 0,02% перекись водорода в фосфатно-цитратном буфере (рН 5,0), инкубировали в течение 15 мин в темноте. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты и измеряли оптическую плотность при 492 нм на спектрофотометре «Multiskan». Из сыворотки, имеющей наиболее высокий титр (1:6000), выделяли у-глобулиновую фракцию по методу с октановой кислотой.

Осаждение IgG из сыворотки кролика проводили октановой кислотой. В течение ночи в холодильнике при температуре 2-8 °С размораживают пул сыворотки крови кроликов. В колбу с плоским дном помещают 20 мл сыворотки, затем, добавляют двойной объем ацетатного буфера (40 мл) и перемешивают содержимое на магнитной мешалке, при низкой скорости. Постепенно в течение 30 минут добавляют 1,50 мл (из расчета 0,75 мл на каждые 10 мл сыворотки) октановой кислоты (каждую минуту по 50 мкл). После добавления последней части октановой кислоты смесь инкубируют при помешивании с низкой скоростью ещё 30 минут. Далее смесь делят поровну на 2 пробирки (50 мл) и центрифугируют при 10000g в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученный серо-белый осадок отбрасывают. Супернатант (40 мл) фильтруют через фильтр 0,45 μ m вакуумным насосом. Полученный супернатант диализуют против фосфатного буфера (рН = 7,4, 10-кратный объем: 400 мл).

Для выделения антител используют аффинную хроматографию на колонке с сефарозой. Предварительно сорбент, NSH-активированную сефарозу, содержащую в своем составе карбоксильные группы, активированные N-окси – сукцинимидным эфиром, октабатируют 0,1 М раствором гистамина в фосфатно-солевом буфере рН = 7,4 в соотношении 1:50. Полученный сорбент используют для аффинной хроматографии кроличьих антител. Для этого колонку с активированной гистамином сефарозой отмывают фосфатным солевым буфером до рН = 7,4 (100 мл). Заливают продукт (кроличьи IgG) объемом 15 мл в колонку. Аккуратно перемешивают содержимое до гомогенного состояния и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Отмывают несвязавшиеся антитела фосфатным солевым буфером и далее собирают фракцию антител с глициновым буфером (рН = 2,5) в приёмник и нейтрализуют до рН = 7,2. Полученный элюат антител используют в иммуноферментном анализе.

Твердофазный ИФА для количественного определения гистамина проводили в полистирольных планшетах. Для этого в лунки планшета сорбировали антиген Гис-Ова в концентрации 2 мкг/мл в течение 18 ч при 4 °С в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере с рН 9,6. Затем планшеты отмывали ЗФР, содержащим 0,005% твин-20. Аликвоты анализируемых образцов сыворотки крови (по 10 мкл), а также образцы с известными концентрациями гистамина, разведенные в 5 раз смесью ЗФР с 0,01% твин-20, смешивали

с раствором аффинно выделенных антител против гистамина (50 мкл) предварительно разведенных тем же буфером до соотношения 1:400. Смесь встряхивали и наносили в лунки планшета на иммобилизованный антиген, а затем инкубировали 1ч при 37°C. Для выявления образования иммунных комплексов в планшеты после отмывания добавляли по 100 мкл в лунку конъюгата овечьих антител к иммуноглобулинам кролика, меченных ПХ в разведении 1:1000. Планшеты выдерживали в течение 45 мин. Далее, проводят процедуру ИФА аналогично описанной выше. Определение специфичности, полученных при иммунизации антител, проводили ИФА, используя в качестве ингибиторов набор соединений указанных выше в концентрации от 0,5 мг/мл до 1,0 нг/мл. Для каждого соединения в ИФА определяли концентрацию, при которой происходит 50% торможение взаимодействия специфических антител с конъюгатом Гис-Ова. Специфичность определяли как выраженное в процентах отношение найденных молярных концентраций исследуемого ингибитора и гистамина.

Результаты исследования и их обсуждение

Для получения специфических антител против гистамина по разработанной нами схеме проводили иммунизацию кроликов конъюгированным антигеном Гис-БСА, синтезированным по описанной выше методике. Иммунохимические свойства полученных кроличьих антисывороток анализировали прямым ИФА, причем было установлено, что титры антител на гаптен и белок-носитель у различных животных варьируют в широком интервале от 1:800 до 1:6400 (табл. 1), в случае использования в качестве антигена Гис-Ова, и от 1:6400-1:100000 при иммобилизации на планшет Гис-БСА

Титр сыворотки устанавливали как конечное разведение, при котором значение оптической плотности при 492 нм в ИФА втрое превышало фоновое значение.

Известно из литературных данных, что клинические эффекты гистамина зависят от его концентрации в плазме. Повышение желудочной секреции кислоты и сердечного ритма происходит при содержании 1-2 нг/мл. Проявление тахикардии, головной боли, приливов, крапивницы регистрируется при 3-5 нг/мл. Снижение артериального давления – 6-8 нг/мл. Бронхоспазм – 7-12 нг/мл. Остановка сердца около 100 нг/мл [3].

Поэтому, помимо высокой технологичности, простоты проведения анализа отсутствия сложной пробоподготовки анализируемого вещества, метод определения гистамина должен обладать высокой чувствительностью и специфичностью. Твердофазный ИФА основан на конкуренции меченного и свободного гаптена, находящегося в анализируемой пробе, за связывание со специфическими антителами. Для его разработки необходимо наличие специфических антител и конъюгата гаптена с макромолекулярным носителем. Из сыворотки кролика, имеющей наиболее высокий титр на гаптен (1:8000) выделяли у-глобулиновую фракцию с помощью октановой кислоты. Далее проводили аффинную хроматографию антител и использовали их при разработке ИФА. В качестве второго реагента для ИФА применяли конъюгат Гис-Ова.

Твердофазный метод ИФА включает в себя следующие этапы: иммобилизацию конъюгированного антигена на полистирольном планшете; конкурентное связывание свободного производного гистамина, присутствующего в анализируемом образце, и адсорбированного на твердой фазе конъюгата Гис-Ова со специфическими антителами; выявление образовавшегося иммунного комплекса с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена; измерение ферментативной активности в образовавшемся иммунном комплексе.

На основании данных полученных при анализе связывания конъюгата Гис-Ова с антителами в зависимости от количества присутствующего в пробе свободного гистамина, строили калибровочную кривую. Максимальная чувствительность метода составляет 2,50 нг/мл, 50%-ное ингибирование взаимодействия специфических антител, с конъюгатом Гис-Ова, иммобилизованным в лунках полистирольного планшета, происходит при добавлении 5,0 нг/мл свободного гистамина.

Специфичность метода была исследована конкурентным ИФА при добавлении в реакционную среду соединений, родственных гистамину(сротонин, дофамин), а также ряда других препаратов (β-эндорфин, дерморфин) (табл. 2).

Таблица 1

Условия проведения иммуноферментного анализа антител к гистамину на различных белках носителях в сыворотке крови

Наименование антигена	Диапазон разведения антигена мкг/мл	Диапазон разведения сыворотки
Гис-Ова	1-10 мкг/мл	1: 800 – 1 : 6400
Гис-БСА	1-10 мкг/мл	1: 6400 – 1 : 100000

Таблица 2
 Специфичность метода ИФА
 для определения амфетаминов

Соединение	Ингибирование %
Гистамин	100
Сротонин	2,0
Дерморфин	1,3
Дофамин	0,7
β-эндорфин	1,1

Из табл. 2 видно, что указанные вещества, не тормозят специфическую реакцию взаимодействия антител и антигена даже в концентрации 0,5 нг/мл. Следовательно, разработанный ИФА является специфичным для выявления производных класса гистамина.

Для выявления диагностической значимости разработанного ИФА было проведено определение гистамина в 20 образцах сыворотки крови пациентов с аллергическими заболеваниями. В этих образцах определяли содержание гистамина, используя метод ВЖХ, который широко применяют для подтверждения содержания эндогенных веществ в образцах биологической жидкости. Было установлено, что с помощью разработанного метода ИФА обнаружено увеличение содержания гистамина в 80% исследуемых образцах. По данным ВЖХ выявлено 50% образцов, положительных по содержанию гистамина. Отсюда следует, что разработанный ИФА по чувствительности превосходит ВЖХ и может быть рекомендован

для использования в лабораторной медицинской практике. Дальнейшее проведение исследований позволит уточнить диагностические возможности использования разработанного метода.

Заключение

Таким образом, разработан конкурентный ИФА количественного определения гистамина в сыворотке крови с использованием кроличьих аффинно очищенных специфических антитела и синтетического антигена, полученного из производного гистамина и овальбумина. Предварительные исследования показали возможность использования данного метода в медицинской практике.

Список литературы

1. Келина Н.Ю., Куликова О.А., Петроченко С.Н., Мягкова М.А. Современное состояние проблемы определения болезни как результата нарушений адаптации организма // XXI Век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2014. – № 01(17). – С. 196 – 200.
2. Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Анохин Л.А., Петроченко С.Н. Сравнительный анализ выявления амфетаминов методом ИФА и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – № 2. – С. 42-44.
3. Maintz L., Novak N. Histamine and histamine intolerance // Am. J. Clin. Nutr. – 2007. – V. 85. – P. 1185-1196.
4. Delteren A., De Man J.G., Pelckmans P.A., De Winter B.Y. Histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract // British Journal of pharmacology. – 2015. – V. 172. – P. 1165-1178.
5. Ohsawa Y., Hirasawa N. The role of histamine H1 and H4 receptors in atopic dermatitis: from basic research to clinical study // Allergol Int. – 2014. – V.63. – № 4. – p. 533-542.