

Оригинальная статья
УДК616-092

Особенности связывания моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом плазмы крови у больных саркоидозом органов дыхания

¹Н.Е.Араблинская, ³И.А.Наперова, ¹Е.А.Купавцева, ¹М.П.Грачева,
¹Э.В.Бирон, ²С.Е.Борисов, ³О.А.Кост, ⁴С.М.Данилов

¹Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М.Сеченова, Москва, Россия;

²Московский городской научно-практический Центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;

³Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия;

⁴Иллинойский университет, Чикаго, США

Резюме.

Проведено тестирование уровня активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в плазме крови и изучение особенностей связывания моноклональных антител (мАт) с АПФ у пациентов с саркоидозом органов дыхания для уточнения роли АПФ в развитии патологии и в проведении дифференциальной диагностики. Выявлено, что связывание мАт 3G8, 1G12, 6A12, специфичных к N-домену АПФ, и мАт 1B3, 1E10 и 3F11, специфичных к C-домену, с АПФ при развитии саркоидоза с повышенной активностью АПФ в крови увеличивается по сравнению со связыванием этих мАт с АПФ в норме. Это может объясняться различным гликозилированием АПФ в крови в норме и при развитии патологии. Можно предположить, что в плазме крови больных саркоидозом содержится не только АПФ, продуцируемый эндотелием сосудов и легких (как у здоровых доноров), но и АПФ, продуцируемый другими клетками, а именно саркоидными гранулемами.

Ключевые слова: саркоидоз, ангиотензин-превращающий фермент, моноклональные антитела, диагностика

Различные гранулематозные заболевания, как правило, имеют сходные клинические, рентгенологические и лабораторные проявления, при этом часто отмечается разнообразие вариантов течения одного и того же заболевания, поэтому диагностика и, особенно, дифференциальная диагностика гранулематозов сложна и требует комплексного обследования пациентов, причем даже стандартное морфологическое исследование, в части случаев – до 10%, не позволяет вынести обоснованное суждение о диагнозе [2, 4, 8].

Об активности гранулематозного процесса, о функциональной активности клеток, входящих в

состав гранулем, можно судить на основании определения содержания веществ, ими вырабатываемых. К таким веществам относится ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), однако по имеющимся данным отмечено повышение активности АПФ при достаточно широком круге заболеваний – саркоидозе, пневмокониозах, а также при заболеваниях, связанных с повреждением эндотелия сосудов или тканей органов, содержащих значительное количество АПФ (тезаурисмозы и др) [2, 4-6, 8, 17].

Объектом исследования в настоящей работе явился АПФ (пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – Zn^{2+} -зависимая пептидаза, состоящая из одной полипептидной цепи, которая содержит два домена (N- и C-домены). Каждый домен содержит каталитически активный центр [22]. АПФ является одним из главных регуляторов кровяного давления и содержания вазоактивных пептидов в организме [9]. АПФ также вовлечен в метаболизм нейропептидов, иммунную и репродуктивную функции [10, 15]. В настоящее время установлены структуры отдельных доменов АПФ [19, 20], но структура полного фермента пока неизвестна.

В нормальных условиях АПФ в плазме крови продуцируют эндотелиальные клетки. У здоровых доноров уровень АПФ в крови достаточно стабилен, в то время как при развитии гранулематозных заболеваний наблюдается значительное повышение уровня АПФ. Определение активности АПФ в крови сейчас является дополнительным методом для диагностики и мониторинга клинического течения саркоидоза [4, 8]. Предполагается, что именно гранулемы могут являться источником повышенного содержания АПФ в крови. Однако повышение уровня АПФ происходит лишь у 50-60% больных саркоидозом, поэтому причины такого повышения остаются все еще неясными.

Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, в том числе биосинтез специфических антител, получили название антигенов. К антигенам относятся белки, в том числе гликопротеины, а также полисахариды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты. На поверхности сложного антигена, такого, как АПФ, можно выявить функциональные группы или остатки, обуславливающие его антигенную специфичность, называемые антигенными детерминантами или эпитопами [1, 3, 7, 9, 18].

Эпитопы белков бывают двух типов – секвенциальные, т.е. представляющие из себя последовательность из 5-20 аминокислотных остатков в полипептидной цепи, и конформационные, образованные аминокислотными остатками из различных частей белковой глобулы [3]. В гликопротеинах в эпитоп могут входить и олигосахаридные группировки [3], содержащие 4-6 остатков углеводов. Организм способен образовывать антитела практически к любой части молекулы антигена, но, как правило, некоторые эпитопы обладают большей антигенностью, и большинство антител образуется именно к ним.

Анализируя связывание моноклональных антител (мАт), направленных к различным участкам на поверхности какого-либо белка, можно выявить изменение конформации этого белка при развитии патологии.

Ранее была получена панель из 8 мАт к N-домену АПФ и 8 мАт к С-домену АПФ и идентифицированы эпитопы связывания этих антител на поверхности белка [10, 11]. Работы по эпитопному картированию N-домена продемонстрировали важный исследовательский, диагностический и даже терапевтический потенциал данных антител. Моноклональные антитела были успешно использованы для количественного определения АПФ в растворе методом ELISA и на поверхности клеток жидкостной цитометрией для исследования структуры и функций АПФ [7, 8, 12, 13, 21, 23], для доставки ферментов к легочному эндотелию, как метод диагностики легочно-сосудистых заболеваний [16].

Молекула АПФ может быть гликозилирована в разной степени в разных тканях. Реальные сайты гликозилирования при этом также могут отличаться. Это открывает перспективы для использования мАт для идентификации АПФ АПФ из разных источников.

Цель исследования заключалась в тестировании уровня АПФ в крови больных саркоидозом и в изу-

чении особенностей связывания моноклональных антител с АПФ плазмы крови у пациентов с саркоидозом органов дыхания для уточнения роли АПФ в развитии патологии и в проведении дифференциальной диагностики.

Материалы и методы.

В исследование были включены 21 пациент с саркоидозом внутригрудных лимфатических узлов и легких, обратившиеся за медицинской помощью в университетскую больницу фтизиопульмонологии Первого Московского государственного медицинского университета им И.М.Сеченова, в возрасте от 18 до 60 лет, не получавшие курсы иммуносупрессивной терапии (глюкокортико-стероидные препараты, цитостатики), лечение антибактериальными препаратами или противотуберкулезными препаратами более 2 недель, а также систематически не принимающие ингибиторы АПФ в связи с сопутствующей кардиологической патологией. Для внутреннего контроля были проведены исследования у 21 здорового донора.

Клиническую картину заболевания описывали с помощью стандартной карты обследования больных, отражающей паспортную часть, профессиональные факторы, вредные привычки, аллергологический анамнез, сопутствующую патологию, историю заболевания, проводимую ранее терапию, жалобы больного, результаты физикального обследования. Пациентам было проведено комплексное рентгенологическое, функциональное, клинико-лабораторное, биохимическое, микробиологическое, бронхоскопическое исследования по общепринятым методикам. Всем пациентам был установлен диагноз саркоидоза на основании общепринятых клинико-лабораторных и инструментальных проявлений и верифицирован цито- и/или гистологически у 76,1% больных (трансбронхиальная биопсия, медиастиноскопия, биопсия внелегочных очагов, торакоскопическая и открытая биопсия легкого).

Для исследования уровня активности АПФ в плазме крови был проведен забор венозной крови (5мл) в стандартные пробирки с консервантами (цитрат натрия; гепарин). Кровь центрифугирована, плазма отобрана и заморожена в морозильной камере при температуре -24°C .

Определение активности АПФ при гидролизе субстратов Hip-His-Leu и Z-Phe - His-Leu проводили на флюориметре Hitachi MPF-4 (Япония). Для этого в пластиковую пробирку помещали 200 мкл раствора субстрата (5 мМ Hip-His-Leu или 2 мМ Z-Phe-

His-Leu) в 0,05 М трис-буфере, pH 8,3, содержащем 0,3 KCl, 1 мкМ ZnCl₂ (буфер А), добавляли 20 мкл предварительно разбавленной в 5 раз плазмы крови, перемешивали реакционную смесь и инкубировали при 37°C. Время реакции предварительно подбирали таким образом, чтобы глубина гидролиза не превышала 10%. Реакцию останавливали добавлением 680 мкл 0,43 н. NaOH, вносили 50 мкл 0,2% орто-фталевого альдегида, растворенного в метаноле, выдерживали 10 минут и добавляли 100 мкл 6 н. HCl.

Полученную смесь центрифугировали в течение 1 минуты при 10000 g. Флюоресценцию образованного аддукта измеряли в супернатанте при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны эмиссии 500 нм. Фоновую флюоресценцию измеряли также, но фермент вносили после добавления NaOH к раствору субстрата. Стандартную флюоресценцию измеряли также, но вместо субстрата и фермента использовали растворы продукта реакции His-Leu известной концентрации.

За единицу активности (ед/л) принимали количество АПФ, гидролизующее 1 мкМ субстрата за 1 минуту в заданных условиях.

Характеристика связывания мАт с АПФ

Для определения связывания АПФ с мАт эксперимент проводили следующим образом. В лунках планшета иммобилизовали поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши, промывали лунки 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl, 1 мкМ ZnCl₂ (буфер Б) и 0,05% твин-20, затем добавляли раствор мАт (3 мкг/мл) в буфере Б. После инкубации в течение 1 часа при 37°C лунки снова промывали и добавляли по 50 мкл плазмы крови, предварительно разбавленной в 5 раз тем же буфером. Инкубировали в течение 2 часов при 37°C, отмывали лунки и определяли активность АПФ с использованием субстрата Hip-His-Leu.

Результаты и обсуждение. Активность АПФ в плазме крови определяли по двум субстратам Hip-His-Leu и Z-Phe-His-Leu для того, чтобы убедиться, что плазма крови не содержит ингибиторов АПФ. Ранее было показано, что в присутствии коммерческих ингибиторов АПФ отношение активности фермента, определяемой по субстрату Z-Phe-His-Leu, и активности фермента, определяемой по субстрату Hip-His-Leu (Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu) значительно увеличивается при их заданных фиксированных концентрациях. Таким образом, показатель Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu может быть использован для

детекции присутствия ингибиторов в крови или биологических жидкостях человека [14]. Отношение Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu мы рассматривали следующим образом: если Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu для какого-либо образца плазмы крови было существенно больше среднего значения, то считали, что данная плазма крови может содержать ингибиторы АПФ, поэтому ее не использовали в дальнейших экспериментах. Так, например, на основе приведенного выше анализа из рассмотрения был выброшен образец плазмы крови здорового донора №21. Анализ Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu для АПФ из плазмы крови остальных здоровых доноров и больных саркоидозом показал, что данное отношение варьируется в некоторых, достаточно узких, пределах как для АПФ из плазмы крови здоровых доноров, так и для АПФ из плазмы крови пациентов с саркоидозом.

В результате анализа активности АПФ в образцах плазмы крови были выявлены образцы плазмы больных саркоидозом с повышенной активностью АПФ (рис.1, помечены черным цветом), а также с нормальной активностью АПФ.

В рамках совместной работы с доцентом механико-математического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Яровой Е.Б. был проведен статистический анализ полученных результатов с помощью пакета статистических программ SPSS 14.0. При сравнении групп здоровых доноров и пациентов с саркоидозом по основным показателям активности АПФ использовался непараметрический U критерий Манна-Уитни. Данный параметр используется для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно, он позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Чем меньше значение критерия, тем вероятнее, что различия между значениями параметра в выборках достоверны. В результате в ходе исследования было выявлено достоверное повышение уровня активности АПФ в плазме пациентов с саркоидозом (уровень значимости составил 0,019) у группы с повышенной активностью АПФ.

Таким образом, все полученные образцы плазмы крови были разделены на три группы: плазма крови здоровых доноров, плазма крови пациентов с саркоидозом с повышенной активностью АПФ, и плазма крови пациентов с нормальной активностью фермента.

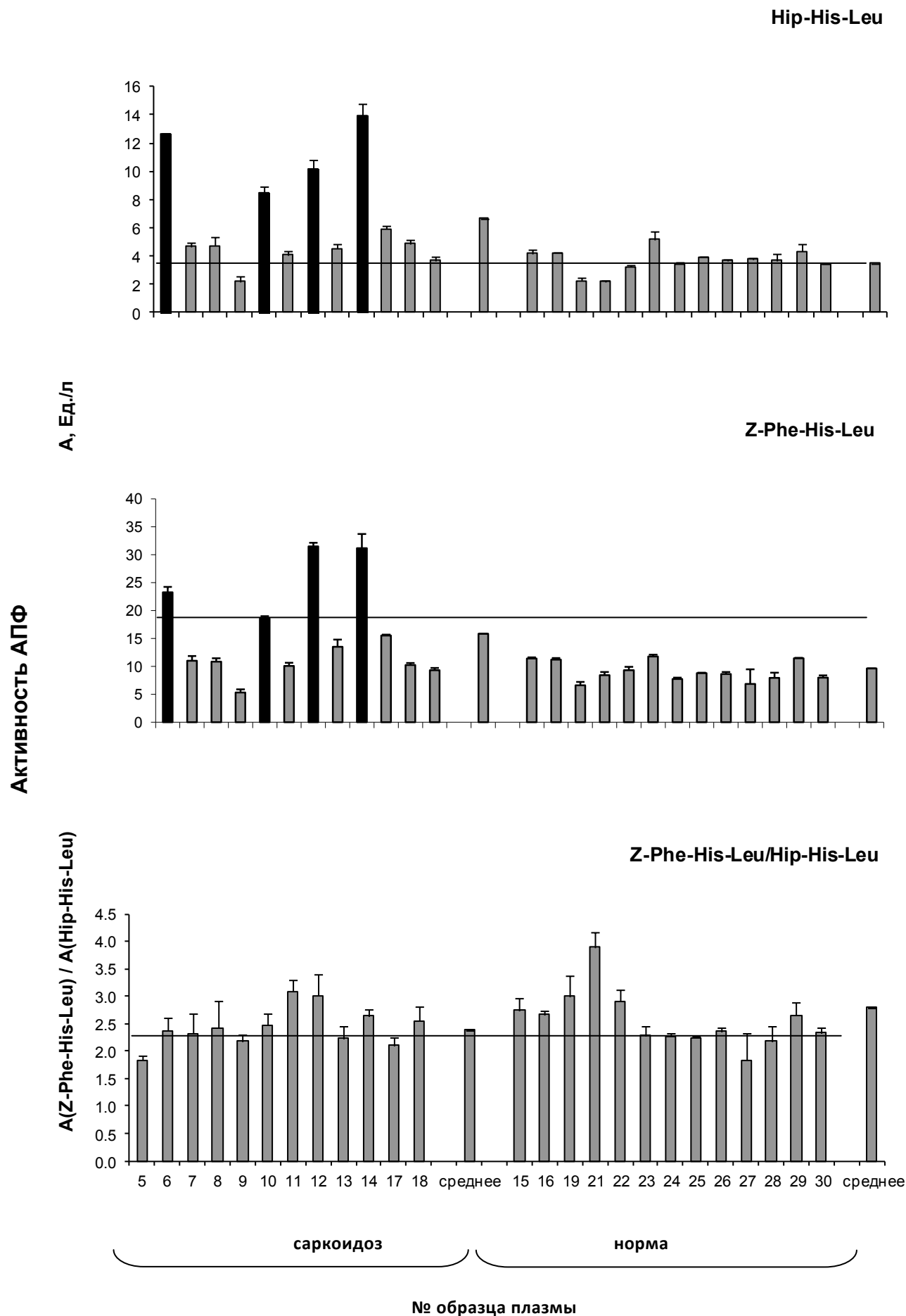


Рисунок 1. Активность АПФ в плазме крови больных саркоидозом и здоровых доноров.

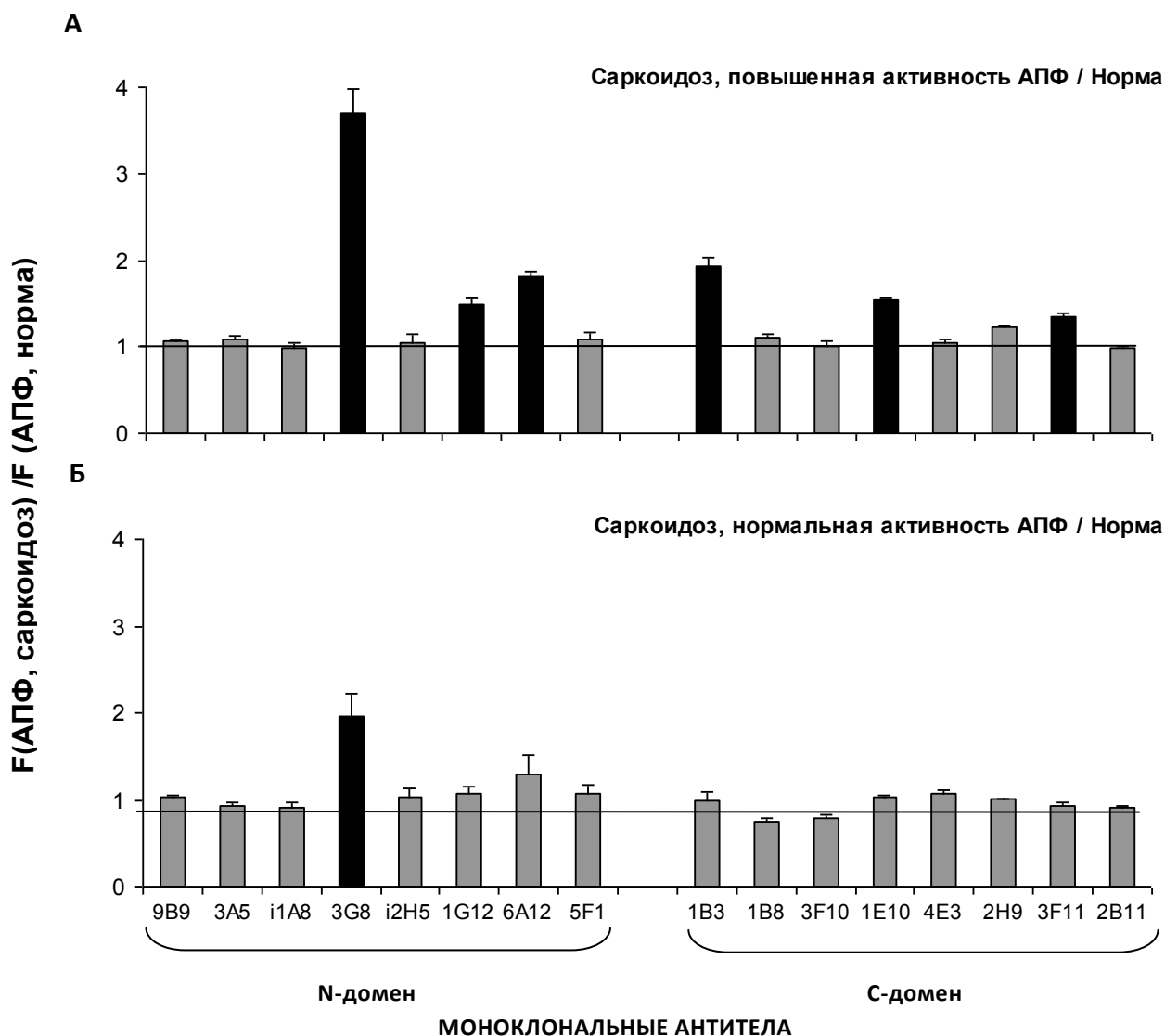


Рисунок 2. Связывание моноклональных антител с АПФ из плазмы крови пациентов с саркоидозом по отношению к связыванию с АПФ из плазмы крови здоровых доноров (попарно сравнивали эффективности связывания мАт с АПФ из плазмы крови больного саркоидозом и здорового донора): А. связывание моноклональных антител с АПФ из плазмы крови больных саркоидозом с повышенной активностью АПФ. Б. связывание моноклональных антител с АПФ из плазмы крови больных саркоидозом с нормальной активностью АПФ.

F – сигнал флуоресценции.

Для анализа связывания мАт с АПФ в норме и при развитии саркоидоза использовали 8 мАт, специфичных к N-домену, и 8 мАт, специфичных к С-домену АПФ. Отдельно проводили сравнение связывания мАт с АПФ из плазмы крови пациентов с саркоидозом с повышенной активностью со связыванием мАт с АПФ из плазмы крови здоровых доноров и связывание мАт с АПФ из плазмы крови пациентов с саркоидозом с нормальной активностью АПФ со связыванием мАт с АПФ из плазмы крови здоровых доноров. Данные представлены на рис. 2. Оказалось, что связывание некоторых мАт – 3G8, 1G12, 6A12, специфичных к N-домену АПФ, и мАт 1B3, 1E10 и 3F11, специфичных к С-домену – с АПФ при развитии саркоидоза с повы-

шенной активностью АПФ отличается от связывания с АПФ в норме. Следует отметить, что эпитоп связывания мАт 3G8 содержит два потенциальных сайта гликозилирования – Asn25 и Asn82, эпитопы связывания мАт 1G12 и 6A12 – потенциальные сайты гликозилирования Asn289 и Asn416, мАт 1B3 – Asn1196, мАт 1E10 – Asn666, мАт 3F11 – Asn1162.

Таким образом, вероятно, что различное связывание мАт с АПФ в крови в норме и при развитии патологии объясняется различным гликозилированием фермента. Можно заключить, что в плазме крови больных саркоидозом содержится не только АПФ, продуцируемый эндотелием сосудов и легких (как у здоровых доноров), но и АПФ, продуцируемый дру-

гими клетками, а именно саркоидными гранулемами.

В то же время, связывание лишь одного МАТ к N-домену фермента – 3G8 – с АПФ из плазмы крови больных саркоидозом с нормальной активностью фермента отличается от связывания с АПФ из плазмы крови здоровых доноров (рис.2). Значительное изменение связывания АПФ с МАТ при саркоидозе, по видимому, характерно лишь для форм саркоидоза с высокой активностью АПФ.

Заключение.

Проведенное исследование выявило различия в эффективности связывания моноклональных антител с АПФ в плазме крови здоровых людей и пациентов, страдающих саркоидозом. Показаны перспективы применения анализа эффективности связывания моноклональных антител с АПФ из плазмы крови пациентов с саркоидозом для улучшения процесса диагностики саркоидоза.

Список литературы.

1. Абраменко Т.В., Панченко О.Н., Мягкова М.А., Кост О.А., Никольская И.И., Чемоданова Е.Е., Агапов А.А. Определение естественных антител к ангиотензинпревращающему ферменту в сыворотке крови человека иммуноферментным методом. *Клин. Лаб. Диагн.*, -2000-, №12, с. 22-24.
2. Борисов С.Е., Соловьева И.П., Ефимьевский В.П., Купавцева Е.А., Богородская Е.М. Диагностика и лечение саркоидоза органов дыхания. Пособие для фтизиатров и пульмонологов. *Проблемы туберкулеза*, -2003-, №6-с.51-64
3. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва, Высшая школа.-1991.
4. Заболевания органов дыхания. Библиотека врача общей практики. Том 2. Под редакцией М.М. Ильковича.- Санкт-Петербург .Нордмед-Издат, -1998-, с.464
5. Саркоидоз: от гипотезы к практике. Под редакцией А.А. Визеля. - ФЭН. Академия наук РТ., Казань.-2004-, с .348
6. Станислав М.Л., Балабанова Р.М., Алекперов Р.Т., Мягкова М.А., Абраменко Т.В., Киселев И.П., Кост О.А., Никольская И.И., Гарац Е.В. Аутоантитела к вазоактивным пептидам и ангиотензинпревращающему ферменту у больных с системными заболеваниями соединительной ткани. *Терап. Арх.*, - 2001-, № 5,с. 20-25.
7. Balyasnikova I.V., Karran E.H., Albrecht R.F., II, Danilov S.M. Epitope-specific antibodies-induced cleav-

age of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. *Biochem. J.*, - 2002-, 362, 585-595.

8. Balyasnikova I.V., Skirgello O.E., Binevski P.V., Nesterovich A.B., Albrecht R.F., II, Kost O.A., Danilov S.M. Monoclonal antibodies 1G12 and 6A12 to N domain of human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and antibody-based method for relevation and quantification of ACE inhibitors in the human blood. *J. Proteom. Res.*, - 2007-, 6, 4, 1580-1594.

9. Corol P., Eyries M., Soubrier F. Angiotensin I-converting enzyme. In *Handbook of Ptoteolytic Enzytmes*; Barret A.A., Raawlings N.D., Woessner J.F., Eds.; Elsevier Academic Press: New York, 2004; pp. 332-349

10. Corraday H.R., Schwager S.L., Nchinda A.T., et all. Crystal structure of human somatic Angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J. Mol. Biol.* 2006, 357, 964-957.

11. Danilov S., Jaspard E., Churakova T., Towbin H. at all. Structure-function analysis of Angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. *Biol. Chem.* 1994, 269, 26806-26814.

12. Danilov S.M., Sadovnikova E., Scharenborg N., Balyasnikova I.V., Svinareva, D.A., Semikina E.L., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., Adema G.J. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Exp. Hematol.*, - 2003-, 31, 12, 1301-9.

13. Danilov S.M., Martynov A., Klibanov A.L., Slinkin M.A., Sacharov I.Y., Malov A.G., Sergienko V.B., Vedernikov A.Y., Muzykantov V.R., Torchilin V.P. Radioimmunoimaging of lung vessels: an approach using 111-In-labeled monoclonal antibody to angiotensin-converting enzyme. *J. Nucl. Med.*, - 1989-, 30, 1688-1692.

14. Danilov S.M., Balyasnikova I.V., Albrecht R.F., Kost O.A.. Simultaneous determination of ACE activity with two substrates provides information on the status of somatic ACE and allows detection of inhibitors in human blood. *J. Cardiovasc. PHarmacol.* 2008,52, 90-103.

15. Isaac R.E., Williams T.A., Sajid M., Corvol P., Coates D. Cleavage of arginyl-arginine and lysyl-arginine from the C-terminus of pro-hormone peptides by human germinal angiotensin I-converting enzyme (ACE) and the C-domain of human somatic ACE. *Biochem. J.*, -1997-, 328 (Pt 2), 587-91

16. Muzykantov V.R., Danilov S.M. Targeting of radio-labelled monoclonal antibody against angiotensin-converting enzyme to the pulmonary vasculature. In *Handbook of targeting delivery of imaging agents.* -1995-

17. Naperova I.A., Arablinskaya N.E., Borisov S.E., Kost O.A., Danilov S.M. Conformational Fingerprinting of blood ACE in sarcoidosis. ATS international conference. Toronto, -2008-, p.A351

18. Naperova I.A., Balyasnicova I.V., Schwartz D.E., Watermeyer J., Strurrock E.D., Kost O.A., Danilov S.M. Mapping of conformational mAb epitopes to the C domain of human angiotensin I-converting enzyme (ACE). J. Proteome Res. 2008, 7, 3396-3411.

19. Natesh R., Schwager S.L.U., Sturrock E.D., Acharya K.R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. Nature, -2003-, 421, 551-554.

20. Prasad L., Sharma S., Vandonselaar M., Quail J.W., Lee J.S., Waygood E.B., Wilson K.S., Dauter Z., Delbaere L.T. Evaluation of mutagenesis for epitope mapping. Structure of an antibody-protein antigen complex. J. Biol. Chem., -1993-, 268, 15, 10705-8.

21. Piquilloud Y., Reinharz A., Roth M. Studies on the angiotensin-converting enzyme with different substrates. Biophys. Acta . -1970-, 206, 136-142.

22. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert, C., Allegrini J., John M., Tregear G., Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, -1988-, 85, 9386-9390.

23. Skirgello O.E., Balyasnikova I.V., Binevsk, P.V., Zhu-Li S., Baskin I.I., Palyulin V.A., Nesterovich A.B., Albrecht R.F., II, Kost O.A., Danilov S.M. Inhibitory antibodies to human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and mechanism of action. Biochemistry, -2006-, 45, 4831-4847.



ТЫ МОЖЕШЬ!

- 1 СТАТЬ УМНЕЕ**
У некурящих людей лучше работает мозг, развиты память и логическое мышление.
- 2 ОБРЕСТИ СВОБОДУ**
Никотиновая зависимость – это добровольное рабство, которое забирает здоровье, деньги и будущее.
- 3 БЫТЬ ЗДОРОВЫМ И ИМЕТЬ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ**
Курение приводит к преждевременному старению организма, бесплодию, раку легких и других органов, повышает риск рождения детей с патологиями.

ЗДОРОВАЯ РОССИЯ

БЕСПЛАТНАЯ ПОМОЩЬ **8 800 200 0 200**
в отказе от курения

УЗНАЙ БОЛЬШЕ
КАК БЫТЬ ЗДОРОВЫМ
www.takzdorovo.ru