

5. Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. *Вопр. вирусол.* 2016, 61(3):112-119.
6. Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глушенко Н.В., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Анализ изменчивости гена *env* варианта IDU-A ВИЧ-1 в ходе развития эпидемии ВИЧ-инфекции на территории Пермского края России (1996-2011 гг.). *Вопр. вирусол.* 2016, 61(5):222-229.
7. Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Тыргина Т.В., Ладная Н.Н. Прогностическое значение результатов генотипирования вирусов иммунодефицита человека, выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией в 2009 и 2011 годах в Санкт-Петербурге. *Вестник Санкт-Петербургского университета.* 2013, 1:171-178.
8. Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам. Методические рекомендации. МР 3.1.5.0075/1-13. Роспотребнадзор, 2013.
9. Петрова Л.В., Дементьева Н.Е., Яковлев А.А. Проблема резистентности к антиретровирусным препаратам в терапии ВИЧ-инфекции и результаты ее определения у ВИЧ-инфицированных больных по материалам ГИБ № 30 им. С.П. Боткина. *Вестник Санкт-Петербургского университета.* 2008, 11(2):59-67.
10. Суханова А.Л., Рудинский Н.И., Богословская Е.В., Круглова А.И., Башкирова Л.Ю., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А., Казеннова Е.В., Аликикна Ю.И., Зверев С.Я., Гришечкин А.Е., Михайлович В.М., Покровский В.В., Бобкова М.Р., Бобков А.Ф. Полиморфизм протеазы и обратной транскриптазы у вариантов ВИЧ 1 подтипа А, доминирующих на территории СНГ. *Молекулярная биология.* 2005, 6:934-941.
11. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naive to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.* 2009, 9:1471-2334.
12. WHO. HIV drug resistant report 2017.
13. Hrazic M., Pellegrin I., Deveaue C. et al. Genotypic drug resistance during HIV-1-primary infection in France (1996-1999): frequency and response to treatment. *AIDS.* 2002, 16:793-796.
14. Lapadula G., Izzo I., Gargiulo F. et al. Updated prevalence of genotypic resistance among HIV-1 positive patients naive to antiretroviral therapy: a single center analysis. *J. Med. Virol.* 2008, 80:747-53.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Носик Марина Николаевна, к.б.н.,
115088, Москва, 1 Дубровская ул.,15, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.В.Зубков¹, Н.С.Кузьмина¹, С.А.Мазурина¹, Л.Г.Бутова¹, Н.М.Рахматулина², Н.А.Сибгатулина², В.Б.Гервазиева¹

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ sIGE К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С АУТОИММУННЫМИ И АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ²Казанская государственная медицинская академия

Цель. Создание метода определения sIgE к тиреопероксидазе (ТПО) в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями. *Материалы и методы.* Материалом для исследования служили сыворотки крови 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК, 47 больных БА, аллергическим ринитом (АР) и 25 образцов сывороток крови здоровых лиц. Возраст пациентов варьировал от 17 до 65 лет. В разработанном методе определения sIgE к ТПО в твёрдофазном

ИФА в качестве антигена использовали нативную аффинно-очищенную ТПО (чистота >95 %, ферментативная активность 60 ± 15 ед.акт./мг), которая содержала все иммунодоминантные участки, определенные с использованием панели моноклональных антител в ИФА. Выявление в сыворотке крови sIgE, связавшихся с антигеном, осуществляли с помощью моноклональных антител к IgE (8E/4F4), конъюгированных с пероксидазой хрена. *Результаты.* В сыворотках крови пациентов с бронхиальной астмой (БА), аллергическим ринитом (АР) и хронической спонтанной крапивницей (ХСК) выявляются sIgE к ТПО в 18 — 21% случаев. В сыворотке крови пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и у здоровых лиц sIgE к ТПО не были обнаружены. *Заключение.* Определение sIgE к ТПО у больных ХСК и аллергическими заболеваниями позволит выявить ранние нарушения аутоиммунного ответа к антигенам щитовидной железы и обеспечить своевременную диагностику патологии последней.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 31—36

Ключевые слова: sIgE к ТПО, аллергия, аутоиммунитет, крапивница

A.V.Zubkov¹, N.S.Kuzmina¹, S.A.Mazurina¹, L.G.Butova¹, N.M.Rahmatulina², N.A.Sibgatulina², V.B.Gervazieva¹

THE METHOD TO DETECT SIGE TO THYROID PEROXIDASE IN CASES OF THE PATIENTS WITH AUTOIMMUNE AND ALLERGIC DISEASES

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Kazan State Medical Academy, Russia

Aim of this research has been to create a method to detect sIgE to thyroid peroxidase (TPO) in serum of the patients with autoimmune and allergic diseases. *Materials and methods.* In this research native affine-purified TPO (more the 95% clean, enzyme activity 60 ± 15 of enzyme unit per mg) with immune dominant elements only (confirmed by inhibitory ELISA) has been used. The detection of sIgE in serum, combined with TPO, was carried out with monoclonal antibodies to IgE (8E/4F4) conjugated with horseradish peroxidase. *Results.* In serum of patients with bronchial asthma, allergic rhinitis and chronic spontaneous urticarial sIgE to TPO has been detected in 18—21% of cases. The healthy people and the patients with autoimmune thyroiditis had no sign of sIgE to TPO in their serum. *Conclusion.* The detection of sIgE to TPO in cases of patients with chronic spontaneous urticarial and allergic diseases will make possible to perform the early diagnosis of thyroid autoimmune disorders and provide timely and adequate therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 31—36

Key words: sIgE to TPO, allergic diseases, autoimmunity, chronic spontaneous urticarial

ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы нередко сочетаются с бронхиальной астмой (БА) и хронической спонтанной крапивницей (ХСК) [6, 7]. При этом наиболее частым в этой ассоциации является болезнь Хашимото или аутоиммунный тиреоидит (АИТ). Болезнь поражает преимущественно женщин в возрасте 30—50 лет и мужчин 40—65 лет. Но существуют также риски возникновения подобных эндокринных нарушений у молодых девушек (после беременности), у подростков и детей. Диагностируют заболевание у 3—5% людей в периоды гормональных сбоев и дисфункций щитовидной железы.

Диагностика аутоиммунных заболеваний щитовидной железы выполняется с использованием клинических лабораторных и инструментальных методов анализа и содержит такие показатели, как изменение уровня гормонов, повышение концентрации антител к аутоантигенам щитовидной железы — тиреоглобулину (ТГ), тиреопероксидазе (ТПО) и рецептору тиреотропного гормона (рТТГ), а также оценивают

гипоэхогенность железы методом УЗИ и клинические симптоматические признаки. В 85% случаев АИТ протекает бессимптомно в течение нескольких лет. Выявление аутоантител свидетельствует о наличии аутоиммунного процесса. При этом следует отметить, что развитие аутоиммунных реакций в щитовидной железе, прежде всего, связано с определением IgG-аутоантител, тогда как роль IgE-аутореактивности при этих заболеваниях до конца не изучена. В то же время, IgE-аутоантитела к соответствующим аутоантигенам как показатель сниженной функции регуляторного звена иммунитета определяются при многих аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз) [12], а также при тяжелых формах бронхиальной астмы [3] и атопическом дерматите[5].

В связи с этим целью работы явилось создание метода определения sIgE к ТПО в сыворотке крови и его апробация у пациентов с аутоиммунными и аллергическими заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

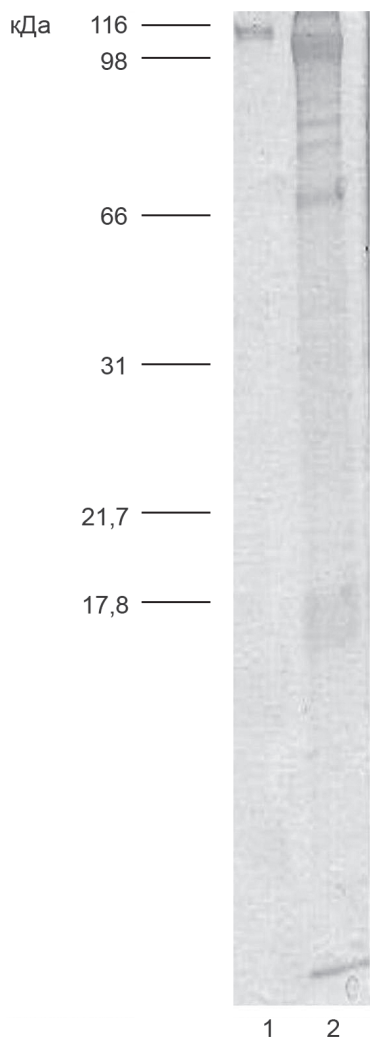
Материалом для исследования служили сыворотки крови 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК, 47 больных БА, аллергическим ринитом (АР) и 25 образцов сывороток крови здоровых лиц. Возраст пациентов варьировал от 17 до 65 лет.

Антиген ТПО из ткани щитовидной железы получали из предварительно осажденной микросомальной фракции тиреоцитов путем солиubilизации с последующей очисткой методом аффинной хроматографии на колонке с CN-Br сефарозой 4В, конъюгированной с МкАТ к ТПО [2, 4]. На всех этапах выделения ТПО чистоту белка контролировали методами ИФА, электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. По результатам проверки, чистота препарата составляла более 95%. Эпитопную специфичность выделенного антигена ТПО изучали методом конкурентного ИФА с использованием панели моноклональных антител [1, 2]. sIgE к ТПО в сыворотках крови определяли с помощью непрямого твердофазного ИФА. Для этого в лунки полистиролового планшета высокой сорбции производства «Nunc» (ThermoFisherScientific, США) вносили полученный нативный антиген ТПО в оптимальной концентрации 7,5 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буферном растворе, pH 9,6. Выдерживали планшет в течение 18 часов при 4 °С. Затем после 3-кратной отмывки 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором с 0,05 % твин-20 pH 7,2 (ФСБ-Т) в лунки планшета вносили исследуемые образцы сыворотки крови человека в разведении 1:10 в ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, далее отмывали 3 раза ФСБ-Т. Выявление в сыворотке крови sIgE, связавшихся с ТПО, осуществляли с помощью моноклональных антител к IgE (8E/4F4), конъюгированных с пероксидазой хрена (ООО «Полигност», Санкт-Петербург). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, после отмывали 3 раза в ФСБ-Т. Ферментативную реакцию регистрировали по изменению окраски субстратно-хромогенной смеси (ТМБ) в течение 20 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора в лунках планшета измеряли на фотометре вертикального сканирования Anthos 2020 при длине волны 450 нм. Результаты считали положительными при значениях ОП, превышающих удвоенное значение ОП порогового уровня в лунках отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали пул сывороток здоровых доноров.

Во всех исследованных образцах сыворотки больных и здоровых лиц исследовали уровень гормонов щитовидной железы (ТТГ, Т₄ свободный, Т₃) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов производства фирмы «Алкор Био» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов был получен высокоочищенный препарат ТПО (рис.), чистота >95 %, с ферментативной активностью 60 ± 15 ед. акт./мг. По данным электрофореза и иммуноблоттинга визуализировался белок с м.м. 110 кДа. Полученный образец нативной пероксидазы щитовидной железы содержал пять иммунодоминантных участков, определенных при исследовании эпитопной структуры антигена [1]. Кроме того, ТПО содержала сложный конформационный эпитоп, образованный двумя линейными участками 606-617 а.о. и 706-720 а.о., к которому выявляются аутоантитела (IgG) у 82% больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.



Электрофореграмма препаратов ТПО на стадии аффинной очистки в 10 % ПААГ (концентрация белка равнялась 10 мкг/трек): дорожка 1 — препарат ТПО, очищенный методом аффинной хроматографии; дорожка 2 — супернатант солибилизированной МФТ.

На следующем этапе разработан иммуноферментный метод определения sIgE к ТПО в сыворотке крови человека, в основе которого — аффинно-очищенный белок ТПО и конъюгат моноклональных антител к IgE. Апробацию метода проводили с образцами 25 сывороток крови здоровых лиц, 25 больных АИТ, 94 пациентов с ХСК и 47 больных аллергическими заболеваниями. Все пациенты с установленным диагнозом АИТ (длительность заболевания более 10 лет) и повышенным уровнем IgG-аутоантител к ТПО находились на гормонозаместительной терапии, при этом уровень гормонов (ТТГ, T_3 , T_4 свободный) находился в пределах нормы. Аллергические заболевания были представлены аллергическим ринитом (АР) интермиттирующего и персистирующего течения ($n=6$) и БА среднетяжелого и тяжелого персистирующего течения с длительностью заболевания более 10 лет ($n=41$). Длительность заболевания ХСК составила от 1 года до 25 лет. У 34 (36%) больных ХСК с помощью кожного тестирования с аутосывороткой была подтверждена аутоиммунная форма заболевания (ХАК); у 60 — крапивница была идиопатической (ХИК).

Определение sIgE к ТПО показало, что в сыворотке крови пациентов с ХСК аутоантитела выявляются у 17 (18%) из 94 человек. При этом sIgE к ТПО в сыворотке крови определялись как при аутоиммунной, так и при идиопатической форме заболевания и не были связаны с гендерным распределением и возрастом пациентов. Следует отметить, что sIgE-аутоантитела обнаруживали у больных ХСК с длительностью заболевания менее 4 лет. У больных аллергическими заболеваниями sIgE к ТПО выявлены у 1 из 6 пациентов с АР и у 9 из 41-с БА. Обращает на себя внимание отсутствие sIgE к ТПО в сыворотках больных АИТ, тогда как IgG-аутоантитела определяли в диапазоне от 70 до 500 МЕ/мл при норме до 50 МЕ/мл. В сыворотке крови здоровых лиц sIgE к ТПО не были обнаружены.

В последнее время все большее внимание привлекают исследования, посвященные изучению аутореактивности у больных с аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. Снижение в ряде случаев регуляторных механизмов иммунитета может привести к нарушению толерантности к собственным аутоантигенам, циркулирующим в крови. Одним из таких аутоантигенов является ТПО.

В нашей работе был разработан метод твердофазного ИФА определения аутоантител sIgE класса к ТПО в сыворотке крови больных с разными хроническими воспалительными заболеваниями. Был получен высокоочищенный препарат нативной ТПО, по своим характеристикам: чистоте, иммунологическим свойствам и ферментативной активности, не уступающий зарубежным аналогам.

Проведенное нами ограниченное авторское испытание метода определения sIgE к ТПО с 25 образцами сыворотки крови больных АИТ, 94 образцами сыворотки больных ХСК, 47 образцами сывороток больных аллергией и 25 образцами сывороток здоровых лиц, позволило выявить в ряде из них наличие sIgE аутоантител. Появление sIgE к ТПО, также как и к другим тканевым аутоантигенам в сыворотке крови больных БА, отражает проявление аутореактивности у пациентов с более тяжелым и длительным течением заболевания [3]. В то же время, у больных ХСК эти антитела выявлялись у лиц с длительностью заболевания менее 4 лет. При АИТ не выявлялись sIgE к ТПО, что, может быть, связано как с наличием выраженного дозозависимого IgG иммунного ответа к ТПО при интерференции с IgE антителами, с одной стороны, так и с возможным снижением sIgE в циркуляции, связанным с высокой цитотоксичностью sIgE, с другой стороны. В этом наши результаты согласуются с данными зарубежных исследований. Так, Concha L.V. et al. показали, что в сыворотке крови 32 больных, содержащей IgG к антигенам щитовидной железы, только у 2 из 20 пациентов с ХСК были обнаружены IgE аутоантитела: у 1 пациента антитела выявлялись к ТПО и у одного — к ТГ. В то же время, у 12 лиц без крапивницы таковые не обнаружены [8]. Исследованию sIgE к антигенам щитовидной железы (ТПО, ТГ) у больных ХСК посвящены еще несколько работ. В двух из них авторам удалось выявить повышенный, более чем в 2 раза, уровень sIgE к ТПО в образцах сыворотки крови пациентов с ХСК в сравнении с образцами сывороток крови здоровых лиц [7,14]. В двух исследованиях результаты детекции sIgE к ТПО были отрицательными [11, 15].

Как известно, аутоиммунное воспаление щитовидной железы начинается постепенно и протекает бессимптомно длительное время. При этом в сыворотке крови под влиянием различных стрессорных факторов, в том числе вирусных инфекций, появляются аутоантигены, стимулирующие иммунную систему. На минимальные дозы аутоантигенов иммунная система реагирует прежде всего IgE-аутореактивностью. По мере увеличения антигенной нагрузки (при более выраженном воспалительном повреждении ткани) иммунный ответ переключается на IgG. Данные о том, что IgE-аутоантитела, включая sIgE к ТПО, могут индуцировать симптомы ХСК, подтверждаются активацией тучных клеток и базофилов [10, 13, 14], а также эффективностью терапии омализумабом у пациентов с ХСК [9].

Таким образом, ранняя диагностика аутоиммунных процессов в щитовидной железе с использованием метода определения sIgE к ТПО, наряду с IgG-аутоантителами, у больных с иммуно-опосредованными заболеваниями, в том числе при ХСК, позволит своевременно диагностировать патологию щитовидной железы и обеспечить адекватную своевременную терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубков А.В., Свиридов В.В., Кириллова Г.А. и др. Изучение эпитопной специфичности аутоантител к тиреоидной пероксидазе при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Клиническая и экспериментальная тиреодология. 2011, 7(2):43-48.
2. Зубков А.В., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела в исследовании структуры тиреопероксидазы — ведущего аутоантигена щитовидной железы. Физиология и патология иммунной системы. 2005, 9(8):25-30.
3. Конищева А.Ю., Штерншис Ю.А., Гервазиева В.Б. IgE-аутоантитела у больных атопической бронхиальной астмой. Медицинская иммунология. 2007, 9(2-3):181-182.
4. Кузьмина Н.С., Яковлева И.В., Свиридов В.В. и др. Моноклональные антитела к человеческой пероксидазе щитовидной железы. Биотехнология. 2005, 1:51-57.
5. Самойликов П.В., Гервазиева В.Б., Кожевников С.А. IgE- и IgG-аутореактивность у детей с атопическим дерматитом. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2012, 57(1) 6:97-103.
6. Abdel-Aziz M.F., Rafaat M.M., Sabry I.M. et al. Study of thyroid autoantibodies in patients with bronchial asthma and allergic rhinitis. Thyroid Science. 2010, 5(2):CLS1-5.
7. Altrichter S., Peter H.J., Pisarevskaja D. et al. IgE mediated autoallergy against thyroid peroxidase — A novel pathomechanism of chronic spontaneous urticaria? PLoS One. 2011; 6 (4): e14794.
8. Concha L.B., Chang C.C., Szema A.M. et al. IgE-antithyroid antibodies in patients with Hashimoto's disease and chronic urticaria. Allergy Asthma Proc. 2004, 25(5):293-296.
9. Chang T.W., Chen C., Lin C.J. et al. The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria. J. Allergy Clin. Immunol. 2015, 135(2):337-42. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.036.
10. Chen Q., Zhai Z., Xu J. et al. Basophil CD63 expression in chronic spontaneous urticaria: correlation with allergic sensitization, serum autoreactivity and basophil reactivity. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2017, 31(3):463-468. doi: 10.1111/jdv.13912.
11. Hatada Y., Kashiwakura J., Hayama K. et al. Significantly high levels of anti-dsDNA immunoglobulin E in sera and the ability of dsDNA to induce the degranulation of basophils from chronic urticaria patients. Int. Arch. Allergy Immunol. 2013, 161(2):154-158. doi: 10.1159/000350388.
12. Maurer M., Altrichter S., Schmetzer O. et al. Immunoglobulin E-Mediated Autoimmunity. Front Immunol. 2018 Apr 9;9:689. doi: 10.3389/fimmu.2018.00689.
13. Panaszek B., Pawłowicz R., Grzegorzółka J. et al. Autoreactive IgE in Chronic Spontaneous/Idiopathic Urticaria and Basophil/Mastocyte Priming Phenomenon, as a Feature of Autoimmune Nature of the Syndrome. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2017, 65(2):137-143. doi: 10.1007/s00005-016-0417-7.
14. Shin Y.S., Suh D.H., Yang M.E. et al. Serum Specific IgE to Thyroid Peroxidase Activates Basophils in Aspirin Intolerant Urticaria. J. Korean Med. Sci. 2015, 30:705-709.
15. Tedeschi A., Lorini M., Asero R. Anti-thyroid peroxidase IgE in patients with chronic urticaria. J. Allergy Clin. Immunol. 2001, 108 (3):467-468.

Поступила 18.12.18

Контактная информация: Зубков Александр Владимирович, к.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495) 917-52-42