

Определение естественных антител к эндогенным биорегуляторам у больных игроманией методом иммуноферментного анализа

МЯГКОВА М.А.

д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимии
Института физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

ДУДКО Т.Н.

д.м.н., директор Института реабилитации ННЦ наркологии Росздрава, Москва

ПАНЧЕНКО Л.Ф.

д.м.н., профессор, академик РАМН, рук. лаборатории биохимии ННЦ наркологии Росздрава, Москва

ПЕТРОЧЕНКО С.Н.

инженер-исследователь лаборатории иммунохимии

Института физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

МОРОЗОВА В.С.

н.с. лаборатории иммунохимии Института физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

БОНДАРЕНКО С.Н.

зав. отделением внебольничной помощи и реабилитации ННЦ наркологии Росздрава, Москва

ТЕРЕБИЛИНА Н.Н.

с.н.с. Института реабилитации ННЦ наркологии Росздрава, Москва

В группе больных игроманией (14 чел.) проведено сравнительное определение естественных антител (е-АТ) к эндогенным биорегуляторам: опиоидным пептидам, биогенным аминам, катехоламинам. Установлено достоверное снижение уровня антител к β -эндорфину у больных обследованной группы. Обнаружена корреляция между уровнем реабилитационного потенциала и содержанием антител к β -эндорфину, дофамину и серотонину. Полученный результат может быть использован для диагностики, терапии и прогноза течения заболевания.

Введение

В последние 10—15 лет в иммунологии сформировалось новое научное направление, изучающее роль естественных, природных антител (е-АТ) в течении биохимических процессов, происходящих в организме человека. Естественные антитела существуют в норме в кровотоке доноров. Эти молекулы способны связываться с эндогенными биорегуляторами и участвовать в регуляции гомеостаза. Ранее нами были выполнены фундаментальные исследования, позволившие установить новые данные о естественных антителах [10, 11]. Так, при патологии в сыворотке крови человека увеличивается уровень специфических естественных антител по сравнению с нормой и изменяются их свойства. Они превращаются в высокоспецифичные молекулы, которые способны с высокой аффинностью (Ка) связываться с эндогенными биорегуляторами, устраняя тем самым на первом этапе их нежелательное, повреждающее действие.

На сегодняшний день установлено, что при развитии некоторых видов наркомании происходит специфическое изменение гуморального иммунитета, выражающееся в увеличении уровня антител, связывающих как экзогенный наркотик, так и эндогенные нейромедиаторы [6, 7, 9]. Для определения естественных антител к эндогенным биорегуляторам разработаны новые способы с использованием процедуры иммуноферментного анализа (ИФА).

Останавливаясь подробнее на проблеме наркомании, следует отметить, что в последние годы зарегистрировано значительное возрастание количества людей с игровой зависимостью, которая выражается комплексом клинических проявлений, среди которых ведущее значение имеет патологическое влечение к азартным играм. Эти люди нуждаются в специализированной лечебно-реабилитационной помощи. Рядом исследователей, специализирующихся в области наркологии, высказано предположение, что в основе подобного поведения лежат те же патогенетические механизмы, что и при развитии классических случаев зависимости от психоактивных веществ (нарко-

тиков и алкоголя) [2, 3, 4]. Сложность состоит в том, что так называемая игромания не связана с прямым действием экзогенного токсического вещества на центральную нервную систему и обменные процессы, как это наблюдается при алкоголизме и наркомании. Как было указано выше, е-АТ отражают биохимическую индивидуальность организма человека и представляют тонкую и всеохватывающую систему регуляции гомеостаза на молекулярном уровне, которая координирует различные процессы, происходящие в организме, путем взаимодействия с соответствующими антигенами. В связи с этим содержание е-АТ может коррелировать с характером и тяжестью течения заболевания, эффективностью проводимой терапии. Создание новых методов выявления уровня е-АТ (которые, как было сказано выше, могут являться природными маркерами, отражающими течение заболевания игроманией), позволит впервые получить не использовавшийся ранее в медицинской практике диагностический тест.

Целью настоящего исследования являются определение естественных антител к эндогенным биорегуляторам у больных игроманией методом иммуноферментного анализа и установление взаимосвязи иммунного статуса и уровня реабилитационного потенциала больных с клиническими проявлениями заболевания.

Материалы и методы

Обследование проводилось у 14 больных с патологической зависимостью от азартных игр. Возраст от 20 до 49 лет (преобладают лица групп от 20 до 24 лет и от 30 до 35 лет). Давность заболевания игроманией от 2 до 12 лет (в среднем 5,5 года). Возраст начала систематического участия в азартных играх варьирует от 15 до 40 лет. Давность патологического влечения к играм от 6 мес. до 10 лет.

На момент обследования в браке состояло 8 чел. (66,6%), в гражданском браке — 2 чел. (16,7%) и 4 чел. были холосты (16,7%). Из них 2 чел. (16,7%) имели высшее образование, 5 — незаконченное высшее (41,7%) и 7 чел. (41,7%) — среднее образование. В группе обследованных 8 чел. (66,6%) работали, 4 чел. (16,7%) учились и 4 чел. (16,7%) —

находились на иждивении. Количество времени, отводимого на игру, имело тенденцию к быстрому увеличению: с 30 мин до 2 суток, от 1 раза в 1—2 недели до ежедневного пребывания в игровом заведении. Периоды воздержания от игры были в основном связаны с отсутствием денег или, в меньшей степени, с вынужденным пребыванием на работе или болезни.

Исследование проводилось по специально разработанной системе, включающей клинико-диагностическое, экспериментально-психологическое обследование и выявление уровня реабилитационного потенциала. У 30% больных выявлена склонность к комбинированным формам аддиктивного поведения (злоупотребление алкоголем, наркотиками, транквилизаторами).

Для наблюдаемых больных были характерны следующие психопатологические синдромы: патологическое влечение к азартным играм, игровой абстинентный синдром, синдром выигрыша, синдром проигрыша во время и по завершении игры (концепция Т.Н. Дудко). У всех без исключения больных отмечалась различной степени выраженности игровая деградация, включающая морально-этические, интеллектуальные, эмоциональные и поведенческие нарушения, приводящие к личностной и социальной дезадаптации. Только у семи пациентов отмечались терапевтические ремиссии сроком от 1 мес. до 1 года.

В работе использованы следующие биохимические реагенты: конъюгаты кроличьих антител против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой хрена, тетраметилбензидин, перекись водорода 30%, твин-20 (Sigma). ИФА проводили на 96-луночных планшетах фирмы Nunc. Результаты анализа учитывали на спектрофотометре Multiskan при 450 нм. Конъюгированные антигены эндогенных биорегуляторов: ангиотензина II (AngII), вазопрессина (Вп), гистамина (Гс), дофамина (Да), -эндорфина (Энд) синтезировали на полимерном носителе по методу, описанному ранее [5, 6, 7].

Для проведения ИФА осуществляли забор крови у больных в начале лечебного процесса. В качестве группы сравнения использовали сыворотки крови здоровых доноров (15 чел.) в возрасте от 20 до 40 лет.

Получение сыворотки крови для анализа на содержание естественных антител

В стеклянную пробирку отбирают 1—5 мл крови, добавляют и оставляют в термостате при $t +56^{\circ}\text{C}$ на 30 мин. Далее пробирку с образовавшимся сгустком переносят в холодильник ($+4^{\circ}\text{C}$) и оставляют на ночь (18 ч). Образовавшуюся сыворотку отделяют декантированием или центрифугируют при 3—5 тыс. об/мин. Полученные образцы сыворотки хранят при -20°C .

ИФА определения антител к эндогенным биорегуляторам в сыворотке крови человека

Планшеты сенсibilизировали раствором конъюгата эндогенного биорегулятора (по 100 мкл в лунку) в концентрации 3 мкг/мл для гистамина и серотонина, а для вазопрессина и ангиотензина II концентрация составляла 1 мкг/мл, в случае дофамина и -эндорфина она равнялась 0,1 мкг/мл. Разведение конъюгатов проводили в 0,02 М карбонатном буфере (рН 9.5). Планшеты инкубировали в течение 18 ч при температуре 4°C .

После сорбции каждый планшет отмывали трижды (3×100 мкл) 0,005%-ным раствором твин-20 в забуференном физрастворе (ЗФР, рН 7.2) и вносили в лунки в двух повторях по 100 мкл исследуемой сыворотки в забуферен-

ном физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 0,01% твин-20, в разведении 1/200 для -эндорфина, серотонина, дофамина, в случае гистамина и ангиотензина в разведении 1/400, для вазопрессина 1/100. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C .

После инкубации планшеты отмывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 100 мкл раствора антивидовых антител против IgM человека, меченных пероксидазой хрена в разведении 1/2000. Планшеты инкубировали еще раз в течение 1 ч при температуре 37°C .

Затем планшеты снова промывали, как описано выше, и заполняли (по 100 мкл в лунку) субстратной смесью, содержащей 0,4% тетраметилбензидина и 0,4% H_2O_2 в 0,05 М фосфатно-цитратном буфере. Планшет инкубировали в течение 20 мин в темноте.

Далее останавливали ферментативную реакцию добавлением в лунки по 50 мкл 10% H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность (OD_{450}) на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

На основании результатов ИФА проводили анализ содержания иммуноглобулинов класса М (IgM) в индивидуальных сыворотках больных и доноров, определяя достоверное изменение уровня антител.

За величину порогового уровня, разделяющего сыворотки доноров и больных, имеющих повышенный либо пониженный уровень антител к исследуемым антигенам, принимали значение OD_{450} в ИФА, отличающееся от среднего значения OD_{450} в ИФА для группы доноров, на величину трехкратного стандартного отклонения. Полученные данные обработали статистически по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Развитие патологического состояния зависимости от наркотиков сопровождается перестройкой биохимических и иммунологических процессов организма. Известно, что при хроническом употреблении психоактивных наркотических веществ происходит качественное и количественное изменение уровня специфических естественных антител к ряду эндогенных биорегуляторов, участвующих в патогенезе заболевания [5, 8]. Клинические особенности проявления болезни игромании связаны с нарушением деятельности таких нейрорегуляторных систем, как опиоидергическая, серотонинергическая, ренин-ангиотензиновая. Выполнение исследования проведено на стыке иммунологии и медицины и стимулировано поиском новых диагностических маркеров заболевания для создания дифференцированной системы комплексной диагностики, лечения и реабилитации больных игровой зависимостью.

Проведено сравнительное выявление естественных антител в сыворотке крови больных игроманией и здоровых доноров. Панель антигенов включала эндогенные биорегуляторы — опиоидные пептиды (-эндорфин, дерморфин), биогенные амины (серотонин, гистамин), катехоламины (дофамин, норадреналин), вазопрессин, ангиотензин II. Выявление антител к указанным выше веществам выполняется при помощи твердофазного ИФА. Процедура проведения ИФА традиционно включает в себя стадии иммобилизации антигена на полистирольный планшет, инкубацию с анализируемым образцом сыворотки крови и детекцию образовавшихся иммунных комплексов. Для реализации первой стадии ИФА были получены конъюгированные антигены низкомолекулярных соединений: -эндорфина, дерморфина, дофамина, серотонина, гистамина

и ангиотензина по специально разработанной нами технологии с применением полимерной матрицы (4-поли-нитрофенилакрилата). Использование этого приема позволяет полностью сохранить структуру исходных высоколабильных гаптенов [6].

При анализе результатов ИФА достоверные изменения уровней е-АТ в сыворотке крови больных игроманией по сравнению с нормой обнаружены в следующих случаях. У 12 чел. достоверно повышен уровень антител к ангиотензину II и к гистамину. Для четырех пациентов отмечено достоверное увеличение содержания е-Ат к серотонину и дофамину. Важно отметить, что у 10 обследованных больных достоверно снижен уровень антител к -эндорфину.

При определении антител к вазопрессину, дерморфину в сыворотке крови больных данной группы была отмечена лишь тенденция к изменению содержания е-Ат, однако достоверных различий по сравнению с группой здоровых доноров не было обнаружено. Результаты анализа и распределение по антигенам представлены в табл. 1.

Дальнейший анализ результатов ИФА в группе больных игроманией провели, сопоставляя наиболее значимые данные, полученные при определении уровня е-Ат к опиоидным пептидам и биогенным аминам, включая катехоламины. Известно, что в механизме формирования психофизической зависимости от наркотика ведущая роль принадлежит медиаторам именно опиоидной и катехоламиновой систем. Существует мнение, что возникновение и прогрессирование болезни *игромания* имеет одинаковые с наркоманией патогенетические механизмы, хотя эта зависимость и не связана с прямым действием экзогенного токсического вещества на организм человека [1,4]. Индивидуализация полученных результатов ИФА для каждого больного стала первым подтверждением высказанного предположения. Было установлено, что из 14 обследованных пациентов-игроманов у 10 чел. (72%) в 2 раза снижен уровень специфических естественных антител к -эндорфину. Среднее значение оптической плотности по группе составляет $0,23 \pm 0,02$ (группа II). А у четырех больных игроманией в обследованной группе зна-

чение оптической плотности соответствует норме и составляет $0,45 \pm 0,06$ (группа I).

При следующем рассмотрении результатов ИФА было обнаружено, что в этой же группе (I) при нормальном содержании антител к -эндорфину достоверно увеличивается уровень специфических естественных антител к серотонину и дофамину. В этом случае среднее значение оптической плотности по группе составляет для серотонина $0,82 \pm 0,09$, для дофамина $0,80 \pm 0,06$. В группе II больных-игроманов (10 чел.) с пониженным содержанием антител к -эндорфину установлено, что уровень естественных антител к серотонину и дофамину оставался в норме. Среднее значение оптической плотности в ИФА по группе II составляло $0,55 \pm 0,07$ и $0,52 \pm 0,04$ для серотонина и дофамина соответственно. Таким образом, сравнительное определение уровней естественных антител к опиоидным пептидам, катехоламинам и биогенным аминам свидетельствует об участии указанных нейромедиаторов в заболевании.

Для практической оценки полученных результатов для клиники и возможности их использования в дальнейшем в качестве дополнительного диагностического критерия проведено сопоставление результатов ИФА естественных антител с уровнем реабилитационного потенциала — УРП [2, 3].

При сопоставлении результатов ИФА естественных антител к опиоидным пептидам и биогенным аминам с УРП было установлено, что высокий УРП в диапазоне 146—135 обнаружен у больных с достоверно повышенным содержанием естественных антител к серотонину и дофамину, при этом уровень антител к -эндорфину остается нормальным (группа I). Средний УРП 67—78 соответствует пациентам в группе II больных-игроманов. Именно для этой категории больных обнаружен специфический иммунодефицит, т.е. у данных лиц достоверно снижено содержание естественных антител к -эндорфину.

По научным данным ряда исследователей, содержание и репертуар естественных антител отражают биохимическую индивидуальность организма человека [10, 11]. В связи с этим, полученные результаты могут стать началом создания новых способов диагностики, помогающих кли-

Таблица 1

Данные ИФА определения антител к эндогенным биорегуляторам у больных игроманией

Исследуемый антиген	Средние по группе значения OD ₄₅₀ в ИФА				Доноры
	Больные игроманией				
	Выше нормы		Ниже нормы		
	OD ₄₅₀ ИФА	Кол-во чел.	OD ₄₅₀ ИФА	Кол-во чел.	
Ангиотензин II	0,92±0,12	12	—	—	0,55±0,09
-эндорфин	—	—	0,23±0,02	10	0,45±0,06
Дофамин	0,80±0,06	4	—	—	0,52±0,04
Серотонин	0,82±0,09	4	—	—	0,55±0,07
Гистамин	1,06±0,12	12	—	—	0,74±0,08

Таблица 2

Сравнительные результаты ИФА антител к в-эндорфину, дофамину, серотонину и определения УРП в группе больных игроманией

Больные игроманией (14 чел.)	Диапазон УРП	Уровень е-Ат / Серотонин	Уровень е-Ат / -эндорфин	Уровень е-Ат / Дофамин
Группа I (4 чел.)	146—135	Повышен	Норма	Повышен
Группа II (10 чел.)	67—78	Норма	Понижен	Норма

цистам в выборе методов лечения больных игроманией. В конечном итоге комплексный подход в лечении с использованием новейших разработок ученых — это основа современной медицинской технологии. Определение естественных антител к этим биорегуляторам позволит пополнить арсенал методов ранней диагностики игромании.

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что при развитии «игровой» зависимости происходит изменение в иммунной системе, проявляющиеся в увеличении синтеза иммуноглобулинов, связывающих нейромедиаторы опиоидной и моноаминовой природы. Выявление уровней этих иммуноглобулинов твердофазным ИФА может быть использовано в клинической практике, возможно для ранней диагностики заболевания, контроля эффективности проводимой терапии, осуществления профилактики и своевременной диспансеризации.

Список литературы

1. Даренский И.Д. Зависимость от азартных игр // Современные достижения наркологии. — М., 2005. — С. 44—45.
2. Дудко Т.Н. и др. Дифференцированная система реабилитации в наркологии: Методические рекомендации. — М., 2001.
3. Дудко Т.Н. Реабилитация наркологических больных // Руководство по наркологии / Под ред. члена-корреспондента РАМН, профессора Н.Н. Иванца. — М., 2002. — Т. II. — С. 222—271.
4. Егоров А.Ю. К вопросу о новых теоретических аспектах аддиктологии // Наркология и аддиктология (сборник научных трудов). — Казань, 2004. — С. 80—87.
5. Мягкова М.А., Лушников М.В., Полевая О.Ю. Иммунохимические свойства естественных и индуцированных антител человека к морфину // Вопр. наркологии. 1989. — Т. 4. — С. 7—11.
6. Мягкова М.А., Савицкий А.А., Бачурин С.О. Иммунохимические свойства антител к дерморфину и его аналогам у больных с нейродегенеративными расстройствами // Иммунология. — 1999. — №4. — С. 52—55.
7. Мягкова М.А., Панченко Л.Ф. Естественные антитела к эндогенным биорегуляторам в патогенезе наркомании // Наркология. — 2002. — №10. — С. 31—44.
8. Мягкова М.А., Панченко Л.Ф. Новый подход в диагностике и профилактике наркомании на основе определения антител к наркотическим веществам и эндогенным биорегуляторам // Наркология. — 2004. — №6. — С. 49—51.
9. Мягкова М.А., Брюн Е.А., Копоров С.Г., Панченко О.Н., Абраменко Т.В. Иммуноглобулины, связывающие опиоидные пептиды, биогенные амины и опиаты у больных наркоманией // Судбно-медицинская экспертиза. — 2001. — Т. 44, №1. — С. 18—20.
10. Мягкова М.А. Естественные антитела к низкомолекулярным соединениям. — М.: МГУЛ, 2001.
11. Полевая О.Ю., Лушников М.В., Мягкова М.А., Ярова Е.А. Сравнительная характеристика специфичности антител к опиатам, индуцированных свободным и ковалентно связанным с белком морфином // Иммунология. — 1990. — №3. — С. 19—22.

DETECTION OF NATURAL ANTIBODIES TO ENDOGENOUS BIOREGULATORS AMONG GAMBLING ADDICTS BY MEANS OF ELISA

MYAGKOVA M.A.
DUDKO T.N.
PANCHENKO L.F.
PETROCHENKO S.N.
MOROZOVA V.S.
TEREBILINA N.N.

In a group of gambling addicts (14 persons) comparative detection of natural antibodies to endogenous bioregulators: opioid peptides, biogenic amines, catecholamines was performed. Reliable decrease of antibody level to β -endorphin was found among the investigated patients. The correlation between the level of rehabilitation potential and concentration of antibodies to β -endorphin, dopamine, and serotonin was discovered. The obtained data can be used for diagnostics, therapy and prognosis for a disease course.