НЕЙРОХИМИЯ
г. 6, № 2, 1987

УДК 612.822.1:547.952

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ К ГАЛАКТОЦЕРЕБРОЗИДАМ МИЕЛИНА С РАЗЛИЧНЫМИ ПО ЛИПИДНОМУ СОСТАВУ АНТИГЕНАМИ

ТАРАНОВА Н. П., ЛУЧАКОВА О. С.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Проведено исследование иммунологической реактивности сывороток, полученных при иммунизации кроликов галактоцереброзидами (ГалЦ), которые являются специфическими антигенами миелина и клеточной поверхности миелинобразующих клеток. При помощи реакции связывания комплемента с использованием двух различных по составу антигенов, содержащих варьирующее количество хроматографически чистых ГалЦ и вспомогательных липидов, показано, что противо-ГалЦ антитела выявляются в широком диапазоне концентраций ГалЦ и вспомогательных липидов. Аутоантитела к ГалЦ обнаружены также в сыворотке крови больных с различными поражениями НС, и при помощи кривых изофикации продемонстрировано, что эти антитела идентичны противо-ГалЦ антителам, полученным при иммунизации кроликов, и обладают одинаковой с ними иммунологической реактивностью.

Гликолипиды цереброзиды, построенные из аминоспирта сфингозина, длинноцепочечной жирной кислоты и моносахарида галактозы, являются специфическими структурными компонентами миелиновых оболочек и плазматических мембран миелинформирующих клеток нервной ткани [1—3]. ГалЦ обладают выраженными антигенными свойствами, но из-за низкой величины M_r являются неполными антигенами, и для получения противо-ГалЦ антител животных иммунизируют смесью ГалЦ с белком-носителем и полным адъювантом Фрейнда [2—6]. ГалЦ обладают более сильной иммуногенностью по сравнению с другими гликолипидными антигенами нервной ткани—ганглиозидами, сульфоцереброзидами, моногалактозилдиглицеридом [7].

Противо-ГалЦ антитела, получаемые в эксперименте, высокоспецифичны, так как направлены против единственной в молекуле ГалЦ антигенной детерминанты (β-D-галактоза) и не дают перекрестных реакций с гомогенатами и экстрактами никаких других органов и тканей, кроме нервной ткани и миелина [8]. Исследованиями на культуре нервной ткани показано, что эти антитела играют важную роль в развитии демиелинизации и задержке миелиногенеза [9—12]. Аналогичным дейст-

вием обладает также сыворотка крови некоторых больных с аутоиммунными демиелинизирующими заболеваниями НС [13, 14]. В связи с тем, что эти заболевания занимают значительное место среди тяжелых поражений НС, становится очевидной необходимость изучения иммунологической реактивности антител к ГалЦ и их роли в механизмах, участвующих в повреждении миелиновой оболочки.

Присутствие антител в организме обычно выявляют при помощи различных иммунологических реакций со специфическим антигеном, подбирая оптимальное соотношение антител и антигена. Выявление антител к липидным антигенам встречает дополнительные трудности в связи с тем, что они могут вступать во взаимодействие с антигеном только в присутствии «вспомогательных липидов»—холестерина и лецитина или других фосфолипидов, без которых эти антитела вообще не удается обнаружить [7]. Мы исследовали иммунореактивность антител к ГалЦ в зависимости от содержания ГалЦ и состава и соотношения вспомогательных липидов в суспензии антигена. Кроме того, сравнительный анализ иммунологической реактивности противо-ГалЦ антител животных и человека может дать дополнительную информацию о степени их идентичности и специфичности. В связи с этим проведено также сравнительное исследование иммунологической реактивности антител к ГалЦ, полученных в эксперименте на животных и обнаруженных в сыворотке крови больных с поражениями НС.

Материалы и методы

Опыты ставили на взрослых кроликах-самцах массой 2,4—2,8 кг, которых однократно иммунизировали путем введения эмульсии, содержащей 3 мг хроматографически чистых ГалЦ, 1,5 мг яичного альбумина, 1,0 мл 0,15 М фосфатного буфера, pH 7,4 и 1,0 мл полного адъюванта Фрейнда с содержанием микобактерий 2,5 мг/мл. Эмульсию вводили по 0,4 мл в подушечки задних лап, по 0,25 мл в подушечки передних лап, 0,3 мл внутрикожно в область спины и 0,4 мл подкожно в область шеи животного. Кровь брали до иммунизации и на 25—30-й день после иммунизации. Кроме того, использовали сыворотку 11 здоровых взрослых доноров и 40 неврологических больных, находившихся на лечении в различных стационарах Ленинграда. Для отбора больных использовали диагнозы, указанные в историях болезни.

Иммунореактивность обнаруженных противо-ГалЦ антител исследовали в реакции связывания комплемента (РСК) [15] с использованием метода построения кривых изофиксации, предложенного Rapport, Graf [16]. РСК проводили в полистироловых панелях с визуальным учетом результатов реакции по 80—100%-ному гемолизу эритроцитов. Для проведения реакции применяли веронал-мединаловый буфер, pH 7,35 (0,1 М), бараньи эритроциты в растворе Олсвера, которые перед опытом, по меньшей мере три раза, отмывали буфером, центрифугируя по 15 мин при 500g, и затем 0,8 мл осадка разводили в 100 мл того же

буфера для приготовления 0,8%-ной суспензии. В реакции использовали «Сухую гемолитическую сыворотку» производства НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова МЗ СССР (Москва), имевшую титр 1:1200, и «Комплемент сухой» (морских свинок) производства НИИ вакцин и сывороток МЗ СССР (Пермь). Эти препараты разводили перед опытом согласно инструкциям.

В качестве антигенов в РСК использовали различные по липидному составу суспензии, приготовленные по методу Niedieck [17], но отличающиеся по содержанию ГалЦ и вспомогательных липидов. Антиген I: суспензия ГалЦ — холестерин — лецитин в весовом соотношении 0,18:0,62:0,60 мг/мл. Антиген II: суспензия ГалЦ—холестерин—фосфолипиды мозга в соотношении 0,18:0,25:0,14 мг/мл. Из исходных суспензий антигенов I и II готовили серии 2-кратных разведений от 1:2 до 1:256, с уменьшающимся содержанием ГалЦ от 90 до 0,7 мкг/мл суспензии антигена. Соответственно уменьшалось и содержание вспомогательных липидов в суспензии.

Для приготовления липидных суспензий антигенов I и II использовали очищенные ГалЦ, полученные хроматографией хлороформ-метанолового экстракта мозга быка в системе растворителей хлороформ—метанол—NH_4OH (80:20:0,4) на силикагеле марки «Woelm» (ФРГ). В этой системе липиды экстракта разделяются на 2 фракции фосфолипидов, 1, реже 2 фракции сульфоцереброзидов, 3 фракции ГалЦ, фракцию холестерина и фракцию жирных кислот, которая движется с фронтом растворителя [18]. Обе фракции фосфолипидов после элюции разделяли повторным хроматографированием в смеси растворителей хлороформ—метанол—уксусная кислота—H_2O—петролейный эфир (50:25:7:3:15). Оказалось, что стартовая фракция фосфолипидов содержала в основном холинфосфатид (лецитин) с примесью сфингомиелина и в дальнейшем была использована нами как источник лецитина. Содержание ГалЦ в элюатах с хроматограмм определяли колориметрически модифицированным методом Radin [19], содержание фосфолипидов — по методу Bartlett [20]. В работе использован холестерин фирмы «Serva» (ФРГ).

Результаты и обсуждение

Определяли титры антител к ГалЦ в сыворотке крови в параллельных опытах одновременно с антигенами I и II. В преиммунной сыворотке кроликов противо-ГалЦ антитела отсутствовали. Результаты, полученные при исследовании иммунных сывороток, свидетельствуют о том, что в реакции с антигеном I (табл. 1) антитела к ГалЦ выявляются в широком диапазоне концентраций ГалЦ, однако для выявления максимальной реактивности антител требуется концентрация не менее 11,2 мкг ГалЦ/мл при исследовании сывороток как с высокими, так и с низкими титрами антител.

Эта закономерность полностью подтвердилась в параллельных исследованиях, выполненных с антигеном II. Более того, выявлено близкое совпадение уровней титров противо-ГалЦ антител при определении

их с антигеном I и антигеном II (табл. 1). При повышении концентрации ГалЦ до 45 мкг/мл (соответственно в антигене I повышается содержание лецитина до 150 мкг/мл и содержание холестерина до 155 мкг/мл, а в антигене II содержание фосфолипидов—до 35 мкг/мл, и содержание холестерина—до 63 мкг/мл) сохраняется максимальный уровень титров как в реакции с антигеном I, так и в реакции с антигеном II. Это позволяет сделать вывод, что при концентрациях ГалЦ свыше 11,2 мкг/мл противо-ГалЦ антитела проявляют максимальную иммунологическую реактивность в РСК, несмотря на варьирующий липидный состав анти-

Таблица 1

Титры противо-галактоцереброзидных антител, выявленные в реакции связывания комплемента в сыворотке кроликов, иммунизированных галактоцереброзидами (ГалЦ) при различных концентрациях в суспензии антигена

Содержание ГалЦ в суспензии антигена (мкг/мл)	Кролик 1		Кролик 2		Кролик 3	
	антиген		антиген		антиген	
	I	II	I	II	I	II
180	—*	—	—	—	—	—
90	—	1:16	—	1:256	—	—
45	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
22,5	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
11,2	1:16	1:32	1:256	1:512	1:128	1:256
5,6	1:8	1:8	1:256	1:512	1:64	1:64
2,8	1:8	1:4	1:128	1:256	1:64	1:64
1,4	1:1**	1:2	1:4	1:16	нет данных	
0,7	1:1	1:2	1:4	1:8	0	0

Примечание. *Здесь и в табл. 2 учет результатов невозможен из-за высоких антикомплементарных свойств суспензии антигена при данной концентрации липидов; **цельная, неразведенная сыворотка.

гена в широком диапазоне концентраций ГалЦ и вспомогательных липидов в суспензии антигена, что обеспечивает надежность выявления противо-ГалЦ антител. Наглядно демонстрируют сходство иммунологической реактивности противо-ГалЦ антител с антигенами I и II кривые изофиксации, полученные в РСК с противо-ГалЦ сыворотками (рис. 1). Это сходство проявляется как при высокой, так и при низкой концентрации антител в сыворотке в реакциях с различными разведениями антигенов I и II. Кроме того, анализ кривых позволяет несколько расширить диапазон оптимальных концентраций ГалЦ до 6,0—50,0 мкг ГалЦ/мл суспензии антигена. При концентрации ГалЦ ниже, чем 6,0 мкг/мл антитела к ГалЦ выявляются не полностью (титры занижены), а при концентрации ГалЦ свыше 50 мкг/мл, фосфолипидов—свыше 39 мкг/мл, а холестерина—свыше 69 мкг/мл резко возрастают антикомплементарные свойства суспензии антигена, что делает невозможным полное определение противо-ГалЦ антител в РСК. По-видимому, при концентрации липидов в суспензии, превышающей указанные цифры, происходит инактивация комплемента за счет сорбции его компонентов

на липидных мицеллах [21], о чем свидетельствует отсутствие гемолиза эритроцитов при взаимодействии с антиэритроцитарной сывороткой, если концентрация липидов в суспензии антигена превышает названные пределы.

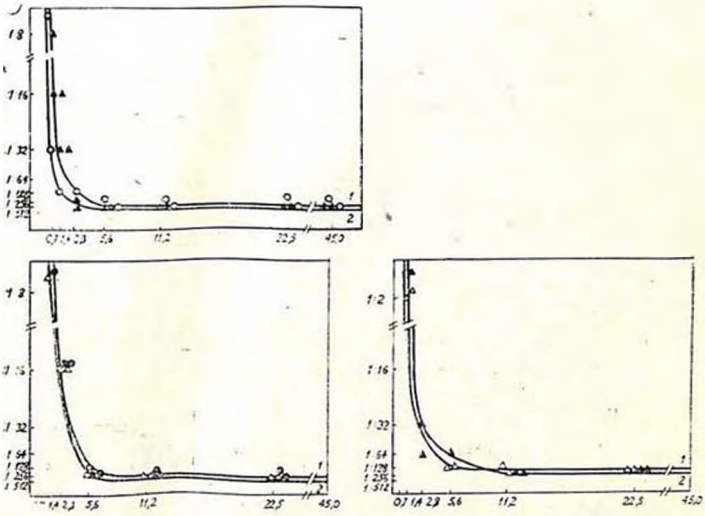


Рис. 1. Кривые изофиксации, полученные для противо-ГалЦ сыворотки кролика с антигенами I *(1)* и II *(2)*

Рис. 2. Кривые изофиксации, полученные для сыворотки больного со спинномозговой травмой в РСК с антигенами I *(1)* и II *(2)*

Рис. 3. Кривые изофиксации, полученные для противо-ГалЦ сыворотки кролика *(1)* и сыворотки больного рассеянным склерозом *(2)* в РСК с антигеном I

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать для оптимального выявления противо-ГалЦ антител использование липидных суспензий антигена с содержанием ГалЦ от 6,0 до 50,0 мкг/мл, фосфолипидов—от 18.0 до 39 мкг/мл и холестерина—от 18,6 до 69 мкг/мл.

Собственные ГалЦ мозга не вызывают антителообразования в здоровом организме. Однако иммуногенные свойства собственных ГалЦ все же реализуются при некоторых патологических состояниях, приводя к образованию циркулирующих противо-ГалЦ антител. Так, противо-ГалЦ антитела обнаружены нами в сыворотке крови у 5 детей с инфекционными энцефаломиелитами в титрах от 1:32 до 1:512, у 6 из 35 больных рассеянным склерозом в титрах от 1:8 до 1:32 и у больного с травмой спинного мозга в титре 1:512. Исследование иммунологической реактивности этих аутоантител установило, что в сыворотке больных противо-ГалЦ антитела тоже выявляются в широком

диапазоне концентраций антигенов I и II (табл. 2) и проявляют максимальную иммунореактивность при концентрации ГалЦ не менее 11,2 мкг/мл, уровень которой сохраняется при 4-кратном повышении концентрации ГалЦ. Это подтверждается кривыми изофиксации, полученными с сыворотками этих больных в РСК с антигенами I и II (рис. 2). Эти кривые имеют полное сходство с кривыми, представленными на рис. 1. Таким образом, противо-ГалЦ аутоантитела, обнаруженные в сыворотке больных, тоже проявляют сходную иммунологическую реактивность в РСК с различными по составу антигенами, несмотря на различную концентрацию антител в исследуемых сыворотках.

Таблица 2

Титры противо-галактоцереброзидных антител в реакции связывания комплемента в сыворотке больных людей при различных концентрациях галактоцереброзидов (ГалЦ) в суспензии антигена

Содержание ГалЦ в суспензии антигена (мкг/мл)	Травма спинного мозга		Энцефаломиелит		Рассеянный склероз	
	антиген		антиген		антиген	
	I	II	I	II	I	II
180	—*	—	—	—	—	—
90	—	1:128	—	—	—	1:128
45	1:512	1:512	нет данных		1:256	1:256
22,5	1:512	1:512	1:32	1:32	1:256	1:256
11,2	1:512	1:512	1:32	1:32	1:128	1:256
5,6	1:128	1:256	1:32	1:32	1:128	1:128
2,8	1:16	1:16	1:4	1:2	1:4	1:128
1,4	1:2	1:4	нет данных	1:1**	1:4	1:1
0,7	0	нет данных	1:2	нет данных	1:1	1:2

Сравнение кривых изофиксации, полученных при параллельном исследовании противо-ГалЦ сыворотки кролика и сыворотки крови больного рассеянным склерозом (содержащих одинаковую концентрацию противо-ГалЦ антител) с одним и тем же антигеном I показало полное слияние кривых как в зоне избытка антител, так и в зоне избытка антигена (рис. 3). Это свидетельствует об идентичности и одинаковой специфичности противо-ГалЦ антител, содержащихся в этих сыворотках, и об их одинаковой реактивности при взаимодействии с ГалЦ в реакции антиген—антитело. Такое же сходство иммунологической реактивности противо-ГалЦ антител отмечено нами при исследовании сывороток больных острым энцефаломиелитом, рассеянным склерозом и травмой спинного мозга. Тот факт, что противо-ГалЦ антитела, полученные при иммунизации животных ГалЦ, и аутоантитела, обнаруженные в сыворотке больных, имеют одинаковую иммунологическую реактивность при взаимодействии с варьирующими по составу суспензиями антигена, свидетельствует об идентичности и одинаковой специфичности этих антител.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что в ряде патологических состояний в организме человека создаются условия, при которых ГалЦ, низкомолекулярные соединения, локализованные в мембранах олигодендроглиальных структур, изолированных в норме от иммунной системы, реализуют свои иммуногенные свойства и индуцируют образование циркулирующих антител. Какую роль играют противо-ГалЦ аутоантитела, обнаруженные у больных, пока не ясно. Однако не исключено, что высокая иммунореактивность этих аутоантител может играть важную роль в патогенезе аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний, поскольку ГалЦ локализованы в нативных мембранах миелина и олигодендроцитов таким образом, что антигенная детерминанта доступна для взаимодействия с антителами [7, 17, 22] и может сказаться вовлеченной в иммунологические реакции, развивающиеся *in situ* в самой нервной ткани и приводящие к ее разрушению.

IMMUNOLOGICAL REACTIVITY OF ANTIBODIES TO MYELIN GALACTOCEREBROSIDES WITH ANTIGEN SUSPENSIONS VARYING IN LIPID COMPOSITION

TARANOVA N. P., LUCHAKOVA O. S.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad

The immunological reactivity of antibodies against the specific glicolipid antigen of myelin and myelin-producing cells, galactocerebroside (GalC), was studied in complement fixation test (CFT). Two different antigen suspensions varying in lipid composition and content were used in CFT. It was shown that the antibody to GalC may be detected in the serum of GalC-immunized rabbits in CFT using a wide range of variations of lipids content and composition in antigen suspensions. The antibodies against GalC were also found in the serum of patients with some diseases of the nervous system. The isofixation curves with the used antigen suspensions have provided evidence for the identity and similar immunoreactivity of the anti-GalC antibodies detected in the patients serum and of the anti-GalC antibodies in the serum of GalC-immunized rabbits.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Таранова Н. П.* Успехи соврем. биол., т. 80, № 6, с. 423—440, 1975.
2. *Kishimoto J.*—In: Handbook of neurochemistry, sec. ed., v. 3. Metabolism in the nervous system (ed. A. Lajtha), p. 179—199, New-York, London, Plenum Press, 1983.
3. *Poduslo S. E.* J. Neurochem., v. 24, p. 647—654, 1975.
4. *Alving C. R., Fowble J. W., Joseph K. C.* Immunochemistry, v. 11, № 8, p. 475—481, 1974.
5. *Dorfman S. H., Fry J. M., Silberberg D. H., Grose C., Manning M. C.* Brain Res., v. 147, p. 410—415, 1978.

6. *Fry J. M., Lisak R. P., Manning M. C., Silberberg D. H.* J. Immunol. Meth., v. 11, p. 183—185, 1976.
7. *Таранова Н. П.* Нейрохимия, т. 3, с. 419—433, 1984.
8. *Таранова Н. П., Кирчик О. С.* Журн. невропатол. и психиатрии, т. 85, с. 1863—1872, 1985.
9. *Dubois-Dalcq M., Niedieck B., Buyse M.* Path. Europ., v. 5, p. 331—347, 1970.
10. *Fry J. M., Weissbarth S., Lehrer G. M., Bornstein M. B.* Science, v. 183, № 4124, p. 540—542, 1974.
11. *Johnson A. B., Bornstein M. B.* Brain Res., v. 159, № 1, p. 173—182, 1978.
12. *Saida T., Silberberg D. H., Fry J. M., Manning M. C.* Neuropathol. Exp. Neurol., v. 36, № 3, p. 627, 1977.
13. *Ulrich J., Largi H.* J. Neurol., v. 218, № 1, p. 7—16, 1978.
14. *Seil F. J.* Adv. Cell. Neurobiol., v. 3, p. 235—274, 1982.
15 *Зейфарт М.*—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х. Фримель), с. 136—140, М., Мир, 1979.
16. *Rapport M. M., Graf L.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 69, p. 608—632, 1957.
17. *Niedieck B.* Progr. Allergy, v. 18, p. 353—422, 1975.
18. *Таранова Н. П.* Вопр. мед. химии, т. 22 ,с. 567—569, 1976.
19. *Radin N. S., Lavin F. B., Brown J. R.* J. Biol. Chem., v. 217, p. 789—796, 1955,
20. *Bartlett G. R.* J. Biol. Chem., v. 234, p. 466—471, 1959.
21. *Бродянский Ю. М.*—В кн.: Иммунологическая диагностика вирусных инфекций (под ред. Т. В. Перадзе, П. Халонен), с. 77—97, М., Мир, 1985.
22. *Dupouey P., Billecocq A., Lefroit M.* Immunochemistry, v. 13, № 4, p. 289—294, 1976.

Поступила 17. VIII 1986