

УДК 616-092

Влияние релиз-активных антител к гистамину на функциональную активность H_4 -рецепторов *in vitro*

Наплёкова П.Л.¹, Емельянова А.Г.², Тарасов С.А.², Кожевникова Е.Н.², Морозов С.Г.²¹ ООО «НПФ Материя Медика Холдинг», 129272, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Целью исследования являлось изучение влияния релиз-активных антител (РА АТ) к гистамину на функциональное состояние H_4 -рецепторов с использованием $GTP\gamma S$ анализа *in vitro*. Тестирование было проведено на мембранах, полученных из клеток CHO-K1, экспрессирующих рекомбинантные H_4 -рецепторы гистамина человека. Функциональную активность H_4 -рецептора оценивали по количеству метки $GTP\gamma[^{35}S]$, связавшейся на мембранах. Показано, что РА АТ к гистамину проявляют свойства антагониста в отношении H_4 -рецепторов.

Ключевые слова: гистамин; релиз-активные антитела; аллергия; H_4 -рецептор; $GTP\gamma S$ анализ.

Для цитирования: Наплёкова П.Л., Емельянова А.Г., Тарасов С.А., Кожевникова Е.Н., Морозов С.Г. Влияние релиз-активных антител к гистамину на функциональную активность H_4 -рецепторов *in vitro*. Патогенез. 2018; 16(3): 135–137

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.135-137

Для корреспонденции: Наплёкова Полина Леонидовна, e-mail: naplyokovapl@materiamedica.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 22.08.2018

Effect of release-active antibodies on the *in vitro* functional activity of H_4 -receptors

Naplyokova P.L.¹, Emelyanova A.G.², Tarasov S.A.², Kozhevnikova E.N.², Morozov S.G.²¹ LLC NPF Materia Medica Holding, Trifonovskaya Str. 47, Bldg. 1, Moscow 129272, Russian Federation² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the effect of released-active antibodies (RA Abs) to histamine on the functional state of H_4 -receptor using the $GTP\gamma S$ assay *in vitro*. Experiments were performed on CHO-K1 cell membranes expressing the human recombinant H_4 -receptor. The functional activity of H_4 -receptor was assessed by the amount of $GTP\gamma[^{35}S]$ bound to the membranes. It was shown that RA Abs to histamine were antagonistic to H_4 -receptors.

Key words: histamine; released-active antibodies; allergy; H_4 -receptor; $GTP\gamma S$ assay.

For citation: Naplyokova P.L., Emelyanova A.G., Tarasov S.A., Kozhevnikova E.N., Morozov S.G. [Effect of release-active antibodies on the *in vitro* functional activity of H_4 -receptors]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(3): 135–137 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.135-137

For correspondence: Naplyokova Polina Leonidovna, e-mail: naplyokovapl@materiamedica.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 22.08.2018

Введение

Открытие H_4 -рецепторов гистамина произошло сравнительно недавно и вызвало большой интерес мирового научного сообщества и фармацевтической промышленности к исследованию гистамина и этой новой фармакологической мишени [1]. H_4 -рецепторы экспрессируются на клетках иммунной системы, включая тучные клетки, моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и естественные киллеры; в периферических тканях локализуется в таких органах, как селезенка, тимус, толстая кишка, лейкоциты крови и костный мозг [2]. В многочисленных исследованиях было показано, что H_4 -рецепторы вовлечены в хемотаксис и высвобождение медиаторов аллергии

[3], а также в миграцию тучных клеток, при этом не влияя на их дегрануляцию [4]. H_4 -рецепторы, экспрессируемые на дендритных, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, модулируют синтез цитокинов и хемокинов [2]. Снижение количества данных рецепторов приводит к снижению количества Т-регуляторных клеток во время острой стадии инфекции, что проявляется в снижении противовоспалительного ответа [5]. Имеются сведения о положительных эффектах антагонистов H_4 -рецепторов в нескольких моделях повреждения слизистой желудочно-кишечного тракта [1]. Доказано вовлечение H_4 -рецепторов гистамина в патогенез атопических заболеваний (ринит, экзема, астма, атопический дерматит). В виду этого, антагонисты H_4 -рецеп-

**Влияние релиз-активных антител к гистамину на функциональную активность H₄-рецептора
(данные приведены в виде медианы и межквартильного размаха)**

Образец	% от ответа агониста	% ингибирования ответа агониста
РА АТ к гистамину	9,6 (0,2 – 16,9)	23,7* (22,6 – 26,1)
Контроль	16,5 (16,1 – 16,9)	4,8 (2,6 – 6,6)
Примечание. * – достоверность различий по сравнению с Контролем		

торов имеют потенциал стать эффективными кандидатами для лечения хронических воспалительных процессов, таких, как аллергия, бронхиальная астма и аутоиммунные заболевания [2].

Целью исследования являлось изучение влияния релиз-активных антител (РА АТ) к гистамину на функциональную активность H₄-рецепторов.

Материалы и методы исследования

Исследование было выполнено на мембранах, полученных из клеток CHO-K1, экспрессирующих рекомбинантные H₄-рецепторы (Euroscreen, Бельгия). РА АТ к гистамину были предоставлены ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» в зашифрованном виде, в качестве водного раствора, готового к использованию. В качестве контроля использовали очищенную воду. Поскольку H₄-рецепторы относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками, механизм действия которых связан с замещением ГДФ (гуанозиндифосфат) на ГТФ (гуанозинтрифосфат) в активном центре G-белка при связывании лиганда, то влияние тестируемого образца на связывание гистамина с рецептором изучали с использованием GTPγS анализа.

В качестве референсных препаратов использовали агонист R-альфа-метил-гистамин (Tocris, 0569) и антагонист тиоперамид (Tocris, 0644). Мембраны (10 мкг/лунку) смешивали с ГДФ и инкубировали не менее 15 мин. на льду. Параллельно GTPγ[³⁵S] (Perkin Elmer, NEG030X) смешивали с гранулами (PVT-WGA, Amersham, RPNQ0001) непосредственно перед началом реакции. Следующие реагенты последовательно добавляли в лунки планшета Optiplate (Perkin Elmer): 25 мкл испытуемого образца доводили буфером до конечного объема 50 мкл или референсных лигандов, разведенных в аналитическом буфере (20 мМ HEPES pH 7,4; 100 мМ NaCl, 10 мкг/мл сапонины, 3 мМ MgCl₂), 20 мкл смеси «мембраны:ГДФ», затем 10 мкл аналитического буфера для тестирования в режиме «агониста» либо, по прошествии 15 минут инкубации для тестирования в режиме «антагониста», 10 мкл референсного агониста для получения конечной концентрации, равной ранее установленной EC₈₀ и 20 мкл смеси GTPγ[³⁵S]:гранул. Планшеты запечатывали пленкой, встряхивали на орбитальном встряхивателе в течение 2 мин., а затем инкубировали в течение 1 часа при 21°C. Затем планшеты центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 2000 об./мин и инкубировали при 21°C в течение 1 часа, после чего производили расчет в течение 1 мин/лунку с помощью считывателя PerkinElmer TopCount™.

Исследуемое соединение тестировали в трёх повторах. Агонистическая активность тестируемого образца выражалась в виде процента активности референсного агониста при его EC₁₀₀ концентрации. Антагонистическая ак-

тивность тестируемого образца выражалась в виде процента ингибирования активности референсного агониста при его EC₈₀ концентрации.

Для оценки статистической достоверности различий между экспериментальной и контрольной группами использовали непараметрический критерий Манна—Уитни (ПО STATISTICA 6.0). Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В режиме агониста ни образец РА АТ к гистамину, ни контрольный образец не оказывали значимого эффекта. В режиме антагониста образец РА АТ к гистамину статистически значимо по сравнению с контролем ингибировал ответ агониста R-альфа-метил-гистамина, снижая количество метки, связанной с мембраной (таблица). В то же время контрольный образец не оказывал какого-либо значимого эффекта. Выявленный антагонизм к H₄-рецепторам, вероятно, опосредует ранее выявленные противоаллергические эффекты РА АТ к гистамину (см. обзор [6]).

Список литературы

- Zampeli E., Tiligada E. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 157(1): 24-33. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00151.x
- Tiligada E. Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? *J. Leukoc. Biol.* 2012, 92(1): 4-6. DOI: 10.1189/jlb.0212093
- Khan M.M. *Effects of Histamine on Lymphocytes*. In: Khardori N., Khan R., Tripathi T. (eds) Biomedical Aspects of Histamine. Springer, Dordrecht, 2010.
- Thurmond R.L., Desai P.J., Dunford P.J., Fung-Leung W.P., Hofstra C.L., Jiang W., Nguyen S., Riley J.P., Sun S., Williams K.N., Edwards J.P., Karlsson L. A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 309: 404-413. DOI: 10.1124/jpet.103.061754
- Del Rio R., Noubade R., Saligrama N., Wall E.H., Krementsov D.N., Poynter M.E., Zachary J.F., Thurmond R.L., Teuscher C. Histamine H₄ receptor optimizes T regulatory cell frequency and facilitates antiinflammatory responses within the central nervous system. *J. Immunol.* 2012, 15; 188 (2): 541-547. DOI: 10.4049/jimmunol.1101498
- Жавберт Е.С., Дугина Ю.Л., Эпштейн О.И. Противовоспалительные и противоаллергические свойства антител к гистамину в релиз-активной форме: обзор экспериментальных и клинических исследований. *Детские инфекции*. 2014, 1: 40-43.

References

- Zampeli E., Tiligada E. The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 157(1): 24-33. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00151.x
- Tiligada E. Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? *J. Leukoc. Biol.* 2012, 92(1): 4-6. DOI: 10.1189/jlb.0212093
- Khan M.M. *Effects of Histamine on Lymphocytes*. In: Khardori N., Khan R., Tripathi T. (eds) Biomedical Aspects of Histamine. Springer, Dordrecht, 2010.

10. Thurmond R.L., Desai P.J., Dunford P.J., Fung-Leung W.P., Hofstra C.L., Jiang W., Nguyen S., Riley J.P., Sun S., Williams K.N., Edwards J.P., Karlsson L. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 309: 404-413. DOI: 10.1124/jpet.103.061754

11. Del Rio R., Noubade R., Saligrama N., Wall E.H., Kremontsov D.N., Poynter M.E., Zachary J.F., Thurmond R.L., Teuscher C.

Histamine H4 receptor optimizes T regulatory cell frequency and facilitates anti-inflammatory responses within the central nervous system. *J. Immunol.* 2012, 15; 188 (2): 541-547. DOI: 10.4049/jimmunol.1101498

12. Zhavbert E.S., Dugina Yu. L., Epstein O.I. [Anti-inflammatory and antiallergic properties of antibodies to histamine in release-active form: a review of experimental and clinical studies]. *Detskie infekcii [Children's infections]*. 2014, 1: 40-43. (in Russian)

Сведения об авторах:

Наплёкова Полина Леонидовна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-аналитического отдела ООО «НПФ Материа Медика Холдинг»

Емельянова Александра Геннадиевна — научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Тарасов Сергей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Кожевникова Елена Николаевна — кандидат медицинских наук, ведущий сотрудник научно-аналитического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Сергей Георгиевич Морозов — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»