

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Оспанова С.Г., Букеева А.Б.

Аннотация

В данной работе определены иммунохимические свойства антиидиотипических антител (АИАТ), специфичных к иммуноглобулинам, направленных к липополисахаридному (ЛПС) антигену бруцелл в непрямом и конкурентном ИФА. В непрямом варианте ИФА активность АИАТ в реакции с позитивной сывороткой составила 1:6400. В конкурентном ИФА в присутствии постоянной концентрации липополисахаридного антигена титр АИАТ снизился до 1:800. Результаты исследований показывают, что данные АИАТ можно использовать в иммуноферментном анализе вместо нативного антигена.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, иммуноферментный анализ.

В связи с ухудшением экологии, увеличением роста социально-значимых болезней человека и животных наиболее остро стоит вопрос поиска эффективных и биологически безопасных средств для профилактики и диагностики заболеваний человека и животных. В настоящее время перспективной альтернативой химическим препаратам являются средства на биологической основе. В медицине и ветеринарии широко ведутся исследования по разработке терапевтических, профилактических и диагностических средств на основе антиидиотипических антител.

Антиидиотипические антитела в настоящее время успешно применяются многими исследователями в ветеринарии и

медицине в качестве «суррогата» антигена или его от-дельных детерминант для индукции иммунного ответа против бактериальных ЛПС, токсинов, ряда внутриклеточных паразитов – возбудителей малярии, лейшманиоза, трипаносомоза, бактериальных и вирусных инфекций, аутоиммунных и онкологических заболе-ваний [1-3].

В литературе встречается ряд работ, в которых АИАТ рассматриваются как перспективные аналоги нативных антигенов для диагностических целей. Так, В.А.Федорова в своих исследованиях для определения антиидиотипических антител как аналогов исходного антигена в иммуноферментном анализе использовала ксеногенные сыворотки. Планшет

сенсibilизировали ксеногенными чумными анти-ЛПС сыворотками мыши, кролика, лошады, морской свинки. Сверху наносили разведения ЛПС *Y. pestis* и обрабатывали образовавшиеся иммунные комплексы АИАТ к ЛПС, мечеными пероксидазой хрена. Связавшийся с анти-ЛПС антителами нативный антиген препятствовал взаимодействию АИАТ, несущих «внутренний образ» самого ЛПС с той же областью варибельной части Ig, использованных для сорбции и соответственно, реакция в этих лунках была отрицательной. По мере снижения количества молекул ЛПС, участвующих в реакции, эпитопы АТ1 освобождаются и реагируют с АИАТ, реакция становится положительной [4]. В данной работе путем многочисленных экспериментов достоверно установлена возможность использования антиидиотипических антител для разработки иммунологических средств для диагностических целей.

А. А. Куц, Т. А. Посевая и соавторы также исследовали АИАТ против вируса герпеса 1 типа - ВПГ1 в различных вариантах ИФА с использованием ксеногенных сывороток. При постановке непрямого ИФА авторы вносили человеческие антигерпетические иммуноглобулины в лунки 96-луночного планшета в концентрации 10 мкг/мл. Затем после обработки планшета в течение 1 ч. при 37⁰ 1% БСА, растворенным в ФСБ (рН 7,4), и

последующей отмывки 0,01 М ФСБ, содержащим 0,05% твина-20, добавляли по 100 мкл разведений исследуемых антиидиотипических антител, и обрабатывали соответствующим антивидовым конъюгатом. В конкурентном варианте в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили антиген ВПГ1. Затем титровали тестируемые антиидиотипические антитела в присутствии постоянной концентрации кроличьих иммуноглобулинов к антигену ВПГ 1 и обрабатывали антивидовым конъюгатом [5].

Л. И. Кулик и др. исследовали АИАТ в непрямом варианте ИФА. Планшет сенсibilизировали человеческими антителами против вируса гепатита А в концентрации 2 мкг/мл в бикарбонатном буфере, затем титровали антиидиотипические антитела, после инкубации и отмывки проявляли пероксидазным конъюгатом кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши. В блок-варианте лунки планшета обрабатывали человеческими анти-ВГА-антителами, затем вносили препарат вируса. После процедур инкубирования и отмывки вносили раствор, содержащий серийные разведения моноклональных антиидио-типических антител (от 0,2 мкг/мл до 2 мг/мл). Проявляли реакцию кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши [6].

Б.Б.Гнеденко, С.Г.Морозов, И.Е.Грибова, Т.П. Ключник и др. сообщают о том, что использование модифицированных ИФА тест-систем с сорбцией на планшет

F(ab)₂ фрагментов АИАТ, как иммунохимических аналогов соответствующих нейроантигенов, может быть более информативным, чем использование стандартных тест-систем при диагностике приступообразно-прогредиентной шизофрении [7].

Булашев А.К. и соавторы получили моноклональные антиидиотипические антитела, имеющие специфичность к паратопу моноклональных антител (МКА) 4B3D9 против эпитопа белка метаболита паразита с молекулярной массой 28 кД. Авторы определили возможность использования антиидиотипов в различных вариантах ИФА в качестве антигена гельминта для обнаружения специфических антител в образцах антисывороток экспериментально зараженных собак и сывороток людей, подозреваемых в заражении описторхозом.

Авторами предложен конкурентный вариант ИФА на основе полученных АИАТ. Планшет сенсibilизируют АИАТ, затем вносятся образцы исследуемых сывороток в растворе ЗФР-Тв. После процедур инкубации и отмывки вносятся конъюгат МКА 4B3D9 с пероксидазой хрена. При отсутствии в исследуемом образце специфических антител конъюгат связывается с АИАТ. В случае присутствия в исследуемом образце специфических антител, последние занимают антиидиотипы МКА и тем самым препятствуют

взаимодействию конъюгата с АИАТ [8].

Материалы и методы

В работе использовали моноклональные антиидиотипические антитела, направленные против иммуноглобулинов, специфичных к полисахаридному антигену бруцелл, продуцируемые штаммом гибридных клеток G9 [9]. Липополисахаридный антиген бруцелл (ЛПС) («Sigma», USA) референтные поликлональные моноспецифические бруцелл-лезные сыворотки крупного рогатого скота (КРС) (НПО «Антиген», Алматы), антиидиотипические иммуноглобулины, меченые пероксидазой хрена («Sigma», USA) – для постановки иммуноферментного анализа.

Конкурентный ИФА. В лунки 96-луночного планшета сенсibilизировали позитивную и негативную сыворотки крупного рогатого скота, фетальную сыворотку плода коровы, блокировали бычьим сывороточным альбумином (БСА), затем вносили разведения антиидиотипических антител штамма 2G9, в присутствии постоянной концентрации – 5 мкг/мл липополисахаридного антигена, обрабатывали антимишиными антителами с пероксидазой.

Непрямой вариант ИФА. Планшет сенсibilизировали референтными поликлональными сыворотками КРС – позитивной и негативной, по 5 мкг в лунку. После процедур инкубирования и отмывки вносили разведения исследуемых АИАТ и

обрабатывали антивидовым конъюгатом.

Результаты и обсуждение

В данной работе апробированы непрямой и конкурентный варианты ИФА с использованием АИАТ, специфичных к иммуноглобулинам, направленных к липополи-сахаридному антигену бруцелл.

Результаты экспериментов показали, что исследуемые АИАТ специфически взаимодействуют с референтными позитивными сыворотками.

Согласно результатам исследований вышеуказанных и других авторов [5,6], АИАТ взаимодействовали с поликлональными сыворотками в различных концентрациях - от 0,2 мкг/мл до 10 мкг/мл. В наших исследованиях оптимальное количество для сенсibiliзации планшета, как АИАТ, так и поликлональных сывороток составило 5 мкг в лунку, что несколько выше чем описанные в литературе значения. Возможно,

это объясняется сравнительно небольшим количеством антител вида Ат2β в популяции исследуемых АИАТ.

Как показывает рисунок 1, в непрямом варианте ИФА исследуемые АИАТ не взаимодействовали с отрицательным контролем, на что указывает отсутствие титрации. Наличие незначительного неспецифического взаимодействия АИАТ в разведении 1:100 с негативной сывороткой, на что указывает низкий показатель экстинкции 0.200, является допустимым. Фоновая реакция наблюдается в некоторых случаях и при постановке ИФА с нативным антигеном.

Сравнительно высокая титрация АИАТ – до 1:6400, о чем свидетельствуют высокие показатели экстинкции 1.200-0.300, показывает, что исследуемые антиидиотипы специфически связываются с соответствующими антисыворотками (рисунок 1).

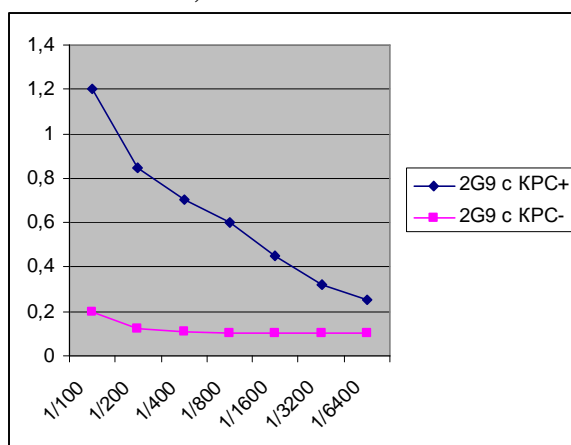


Рисунок 1 – Взаимодействие АИАТ с ксеногенными сыворотками в непрямом варианте ИФА

Примечание - По оси абсцисс – разведения сывороток, по оси ординат – оптическая плотность.

Взаимодействие исследуемых антиидиотипов с негативной, фетальной, и позитив-ной сыворотками в конкурентном ИФА представлено на рисунке 2.

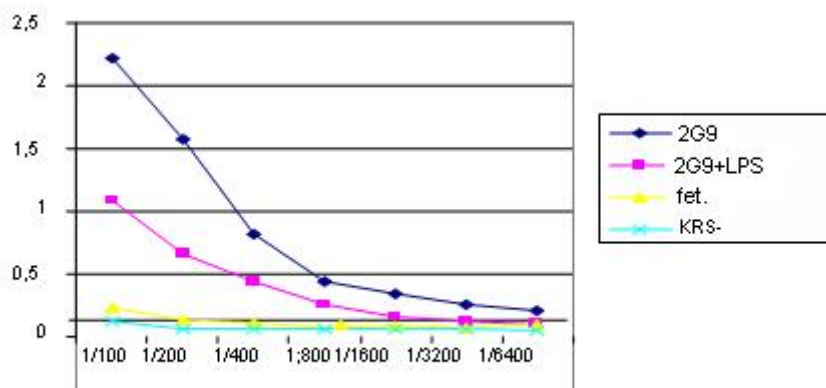


Рисунок 2 - Результаты конкурентного ИФА

Примечание. По оси абсцисс – титр антиидиотипических антител; по оси ординат -оптическая плотность.

Также как и в непрямом варианте ИФА, наблюдается незначительное неспецифическое взаимодействие АИАТ с обоими образцами негативного контроля, на что указывают низкие показатели экстинкции – 0,100-0,200.

В реакции с поликлональной сывороткой антиидиотипы титровались до разведений 1:3200-1:6400.

В присутствии постоянной концентрации нативного антигена титр антиидио-типических антител снизился с 1:3200-1:6400 до 1:800-1:1600.

Сравнение двух графиков, отражающих взаимодействие АИАТ с позитивной сывороткой в присутствии и без липополисахаридного антигена, показывает, что последний

ингибирует специфическое взаимодействие, о чем свидетельствует слабая титрация АИАТ при наличии нативного антигена.

На основе полученных данных можно заключить, что антиидиотипические антитела и липополисахаридный антиген конкурируют за специфическое взаимодействие с позитивной сывороткой, что согласуется с результатами других научных исследований [4,7].

Таким образом, результаты исследований показывают иммунохимическую гомологию антиидиотипических антител с исходным антигеном и могут быть использованы в иммуноферментном анализе

Список литературы

1 Gomez R.E, Ardigo M.L. Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment // Front.Oncol. – 2012. -2. –P.147.

2 Lee G., Ge B. Inhibition of in vitro tumor cell growth by RP215 monoclonal antibody and antibodies raised against its anti-idiotypic antibodies // *Cancer Immunol. Immunother.* -2010. – 59. –P.1347-1356.

3 Tomoko K., Atsuko T., Tetsuo Y., et. al. Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking antibody – and receptor-binding sites on hepatitis A virus // *Archives of Virology.* – 2009. - Vol. 154, № 8. - P. 1263–1269.

4 Федорова В.А. Теоретико-экспериментальные аспекты изучения белковых и углеводородсодержащих антигенов возбудителей чумы и холеры с использованием поли- и моноклональных антител: дис ... канд.мед.наук: 03.00.07. Саратов. 2004, - С.318.

5 Куш А.А., Посевая Т.А., Симонов В.И. и др. Антиидиотипические антитела к ви-рису простого герпеса типа 1 нейтрализуют инфекционную активность вируса // *Вопросы вирусологии.* - 1991. - № 4. - С.312- 314.

6 Кулик Л. И., Ибанов В. С., Беркова И.П. и др. Получение антиидиотипических антител моделирующих эпитопы нейтрализации вируса гепатита А. *Ж. Иммунология* 1193. № 5, стр. 4-7.

7 Гнеденко Б.Б., Морозов С.Г., Грибова И.Е., Ключник Т.П. и др. Иммунофер-ментный анализ с использованием F(ab)₂ фрагментов антиидиотипических антител вместо нативных антигенов. *Иммунология*, № 6, , стр. 364-367, 2006 г.

8 Серикова Ш.С., Булашев А.К., Сураншиев Ж.А. Использование антиидиоти-пических антител в серологической диагностике описторхоза // *Материалы межд. научно-теор.конф. «Сейфуллинские чтения-10: Новые перспективы подготовки конкуренто-способных кадров и роль науки в формировании индустриально-инновационной политики страны»*, посв. 120-летию со дня рождения С.Сейфуллина. -2014. –Т.1., ч.1. – С.132-134

9 Пат. 2009/0083.1 Республика Казахстан. Штамм гибридных, культивируемых клеток животных *Mus. musculus L.*- используемый для получения моноклональных антиидиотипических антител к иммуноглобулинам против антигенов бруцелл (Оспанова С.Г., Булашев А.К., Серикова Ш. и др.; заявитель и патентообладатель АО «КАТУ им. С.Сейфуллина». - №68706; заявл. 20.01 2009; опубл. 15.06.2011, Бюл.№ 6. – 4 с.).

Түйін

Бруцеллалардың липополисахаридті (ЛПС) антигеніне бағытталған иммуногло-булиндерге телімді антиидиотипті антиденелердің (АИАД) иммунохимиялық қасиеттері жанама және конкуренттік иммуноферменттік талдауда анықталған. ИФТ жанама вариан-тында АИАД позитивті сарысумен белсенділігі 1:6400 құрады. Конкурентті иммуно-ферменттік талдауда липополисахаридті антигеннің қатысуында АИАД титрі 1:800 дейін төмендеді. Зерттеулердің нәтижесі берілген АИАД иммуноферменттік талдауда нативті антигеннің орнына қолдануға болатынын көрсетеді.

Summary

In indirect and competitive ELISA the immunochemical properties of anti-idiotypic antibodies (AIAB) against immunoglobulins specific for the lipopolysaccharide antigen of *Brucella* antigen were identified. In indirect ELISA activity of AIAT in the reaction with the positive serum was 1:6400. Titer AIAB in the competitive ELISA with a constant concentration of lipopolysaccharide antigen was 1: 800. Results show that these AIAB may be used as an analog of the original antigen in ELISA.