

577.27:616.097.3:606(045)

P19

Г.С. Рамазанова*, Ж.Ә. Сұраншиев, Ш.С. Серикова

ҚР БҒМ С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Астана қ.

*e-mail: agun.katu@gmail.com

Описторхоз антигеніне телімді моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің иммунды химиялық сипаттамасы

Мақалада описторхоз антигеніне телімді моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің иммунды химиялық қасиеттерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Моноклоналды антиидиотиптік антиденелер өзінің иммунды химиялық қасиеттері жағынан барлық талаптарға сай келеді және описторхоз антигенінің «ішкі сипаты» бола алатындықтан оларды биологиялық қауіпсіз балау және дауалау препараттарын әзірлеуде қолдануға болады.

Түйін сөздер: Описторхоз, антиидиотиптік антидене, моноклоналды антидене, балау, иммунды ферменттік талдау.

Г.С. Рамазанова, Ж.Ә. Сұраншиев, Ш.С. Серикова

Имунохимическая характеристика моноклональных антиидиотипических антител специфичных к антигенам описторхоза

Целью настоящей работы явилось определение возможности использования антиидиотипов в качестве антигена в ИФА при серологических исследованиях на описторхоз. Для этого проводилась работа по определению иммунохимических свойств АИАТ. Результаты исследований свидетельствуют о возможности использования АИАТ гибридомы 4Н10 в качестве антигена при разработке иммунологических тестов для диагностики описторхоза.

Ключевые слова: описторхоз, диагностика, экскреторно-секреторный антиген, иммуноферментный анализ, гибридома, моноклональные антитела, антиидиотипические антитела.

G.S. Ramazanova, Zh.A. Suranshiev, Sh.S. Serikova

Immunochemical characterization of monoclonal anti-idiotypic antibodies specific to antigens opisthorchiasis

Great interest is the use of "internal image" of the antigen, i.e. anti-idiotypic antibodies (AIAB) against Fab-antibody fragments that are specific to ES-AG epitopes.

The aim of this research was to determine the possibility of using anti-idiotypes as an antigen in ELISA for serological diagnosis of Opisthorchiasis.

To do this, were conducted determine immunochemical properties of anti-idiotypic antibodies.

The results of research suggest the possibility of using Hybridomas 4H10 as an antigen in the development of immunoassays for the diagnosis of Opisthorchiasis.

Key words: opisthorchiasis, diagnostics, excretory-secretory antigen, enzyme immunoassay, hybridoma, monoclonal antibodies, anti-idiotypic antibodies.

Әлемде шамамен 45 млн. адам *Opisthorchis felinus* және басқа да бауыр трематодаларымен (*Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis*) жұқтырылған. Олар клиникасы және патогенезі бойынша ұқсас ауруларды туғызады [1]. Бұдан басқа описторхоздың гепатобилиарлы жүйедегі катерлі ісік ауруларының пайда болуына әсер ететіні анықталған [2,3,4].

Описторхоз – табиғи ошақты антропозоозды гельминтоз. Аурудың қоздырғышы адамның, иттің, мысықтың, кейбір терісі бағалы аңдардың – түлкі, көгілдір түлкі, бұлғын, дала күзені, қара күзен, су тышқаны – өт жолдары мен өт қалтасында, кейде ұйқы безі түтіктерін мекендейтін сорғыш құрт – *Opisthorchus felinus*. Бұл гельминт жабайы шошқада табылған.

Лабораториялық жануарлардан қоян мен теңіз шошқасы да зақымданады. Аталған хайуанаттар мен адам трематоданың ақтық иелері болып саналады [5].

Қазақстанда адамдардың описторхозбен ауруы ТМД елдері арасында жоғары орын алады. Бұл аурумен күресу шаралары жүйесіндегі негізгі рольді аурудың уақытындағы диагностикасы болып табылады. Описторхоз диагностикасында қолданылатын әдістердің нәтижелілігі (дуоденалдық сұйықтықты және копроовоскопия) біршама төмен. Описторхозға диагноз қоюда иммунды диффузиялық реакция (ИДР) және бейтараптаушы гемагглютинация реакциясы (БГАР) қолданылады. Бұл тест-жүйелер аурудың ерте сатысындағы ақпараттың анықталуын, яғни паразиттен жұмыртқа бөлінбей тұрғандағы кезеңде жақсы жұмыс істейді. Бірақ аурудың созылмалы жағдайларында нәтижелілігі төмен болып келеді. Бұдан басқа, бұлар еңбекті көп қажет етіп, жаппай скрининг жасауда көп қолданысқа иеленбеген. Осыған байланысты, иммунды ферменттік талдау (ИФТ) негізінде әзірленген диагностикалық тест-жүйелердің болашағы белгілі. Описторхоздың серологиялық диагностикасында оңтайлы антиген ретінде экскреторлы-секреторлы антиген (ЭС-АГ) қолданылады. Өкінішке орай, бұл антигенді пайдаланатын ИФТ тест-жүйелерінің тиімділігі шамалы, себебі паразиттің стандартталған метаболитін бөліп алу көптеген қиындықтарды туғызады. Осыған байланысты, антигеннің «ішкі ортасына», яғни (ЭС-АГ) эпителийіне телімді антиденелердің Fab-фрагменттеріне қарсы антиидиотиптік антиденелерге (АИАД) үлкен қызығушылық туып отыр. Антиидиотиптік антиденелердің иммунды химиялық сипаттамасы, олардың иммуногендік белсенділігі, молекулалық салмағы, ақуыз концентрациясы, класы, антигенмен байланысу константасы алынатын өнімнің сапасына тікелей байланысты.

Зерттеу жұмыстарының басты мақсаты ИФТ-да антиген ретінде қолдануға болатын *Opisthorchis felinus* ЭС-АГ эпителийіне телімді антиидиотиптік антиденелерге иммунды химиялық сипаттама беру болып табылды.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмыстарын орындау кезінде *Opisthorchis felinus* экскреторлы-секреторлы антигеніне қарсы моноклоналды антиденелердің Fab-фрагментіне телімді 4Н10 гибридті штамы

көлемі 50 мл полистеролды матрацтарда өсірілді [6]. Құрамында антиидиотиптік антиденелері бар культуралдық сұйықтық бөлек флакондарға құйылып алынды. Гибридті жасушалардың 300 мл супернатанты көлемі 10 мл мөлшерге дейін ПЭГ-де концентрацияланды. Ақуыз концентрациясы Бредфорд әдісімен айқындалды.

4Н10 гибридті штамының моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің препаративті мөлшерін *in vivo* жағдайында жинап алу үшін BALB/c тышқандары қолданылды [7].

Моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің белсенділігі мен телімділігі ИФТ-дың жанама қойылымы арқылы тексерілді [8].

Антиидиотиптік антиденелердің класын анықтау үшін тышқандардың IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 иммуноглобулиндеріне қарсы монотелімді қан сарысулары пайдаланылды («Sigma» АҚШ). Моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің класы ИДР және ИФТ әдістерімен анықталды. ИФТ реакциясында 1:1000 сұйылтымындағы IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 иммуноглобулин изотиптері 0,01 мл мөлшерінде планшет ұяшықтарына енгізіліп, +4°C температурада 18 сағат бойы инкубацияланды. Фосфатты тұз ерітіндісімен 3 рет шайылған соң планшет ұяшықтарына антиидиотиптік антиденелердің 0,005 мг/мл мөлшерінде енгізіліп, 1 сағат 37°C-ге қойылды. Инкубация уақыты өткен соң пероксидазасымен таңбаланған тышқан антиденелеріне қарсы алынған қоянның иммуноглобулиндері (конъюгат) енгізілді [9].

10% және 12%-ды полиакриламидті геліндегі электрофорезі жүргізіліп, полиакриламидті геледегі ақуыз фракцияларының иммунды химиялық жолмен нитроцеллюлозды мембранаға көшіру жұмыстарында – иммуноблотинг әдісі пайдаланылды. Иммуноблотинг жұмысын жүргізу барысында *Opisthorchis felinus* ЭС-АГ-мен иммунделген иттің тазартылған қан сарысуы мен 4В3D9 моноклоналды антиденелері пайдаланылды. Моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің антигенмен байланысу беріктілігі J.Beatty et al. тәсілімен анықталды [10,11].

Зерттеу нәтижелері мен тұжырымы

4Н10 гибридті жасушалары сиыр ұрығының қан сарысуы қосылған RPMI-1640 қоректік ортасында өсірілді. Супернатант тазартылғаннан кейін ондағы ақуыз концентрациясы 0,03-0,06



Иммуноглобулин изотиптері 1-IgA; 2-IgG1; 3-IgG2a; 4-IgG2b; 5-IgG3; 6-IgM.

1 сурет – 4Н10 гибридті жасуша штамының моноклоналды антиидиотиптік антиденелердің класын радиалды иммундық диффузия реакциясында анықтау нәтижесі

1 кесте – 4Н10 гибридті жасуша штамының моноклоналды антиденелерінің класын иммунды ферменттік талдау реакциясында анықтау нәтижесі

Иммуноглобулиндер изотипі	ИФТ оптикалық тығыздығы, нм
IgM	1,305±0,070
IgA	0,03±0,002
IgG1	0,041±0,004
IgG2a	0,045±0,006
IgG2b	0,124±0,023
IgG3	0,043±0,009
Ескерту – Аталмыш тәжірибе 5 рет жүргізіліп, кестеде көрсеткіштің М+m көрсеткіштері келтірілген	

мг/мл-ден 2 мг/мл-ге жетті. Аталмыш гибридті жасушалар 7-10 тәулік бұрын 2,4,10,14 – тетраметилпентадеканмен егілген BALB/c тышқандарының құрсақ қуысында өсіріліп, жалпы мөлшері 15 мл болатын асцит сұйықтығы жинап алынды. Асцит сұйықтығынан моноклоналды антиидиотиптік антиденелер аммоний сульфатының қаныққан ерітіндісімен тұндырылған соң, фосфатты тұз ерітіндісінде бірнеше рет диализдеу арқылы тазартылды. Тазартылғаннан кейінгі ақуыз концентрациясы 4 мг/мл құрады.

Иммунды ферменттік талдау арқылы асцит сұйықтығындағы *Opistorchus felineus*-тің антигендеріне телімді моноклоналды антиидиотиптік антиденелерінің титрі 1:800 және 1:1200 көрсетті, ал өсінді сұйықтығында 1:8 болды.

Антиидиотиптік антиденелердің класын анықтау ИДР әдісімен тышқандардың IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 иммуноглобулиндеріне

қарсы монотелімді қан сарысуын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Аталмыш тәсілдің нәтижелері 4Н10 штамы өндіретін антиидиотиптік антиденелердің IgM класына жататындығы дәлелденді (1-сурет).

4Н10 гибридті жасушалар штамының моноклоналды антиидиотиптік антиденелер класын иммунды ферменттік талдау реакциясында анықтау нәтижесінде IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 иммуноглобулиндерінің изотиптері бекітілген планшет ұяшықтарында, гибридті жасуша штамы түзетін антиидиотиптік антиденелер IgM класына жататын иммуноглобулиндермен әрекеттесті (1-кесте).

Кесте деректері бойынша, 4Н10 гибридті жасушалар штамы өндіретін антиидиотиптік антиденелер IgM класына жататыны анықталды.

4Н10 штамы өндіретін антиидиотиптік антиденелердің гомогенділігін 0,1% натрий додецилсульфаты қосылған 12% полиакриламидті геліндегі электрофорез әдісімен анықталды.

4Н10 гибриді жасуша штамы өндіретін антиидиотиптік антиденелердің қандай эпитоптарға бағытталғанын анықтау үшін 12%-ды полиакриламидті геліндегі фракцияларды иммунды химиялық жолмен қатты фазаға – нитроцеллюлозалық мембаранаға көшіріп, одан әрі иммунды ферменттік талдау жүргізілді. ИФТ барысында 4Н10 гибриді жасушалар штамы өндіретін телімді антиидиотиптік антиденелер *Opisthorchis felinus* ЭС-АГ-мен иммунделген иттің тазартылған қан сарысуымен және 4В3D9 моноклоналды антиденелермен байланысқа түсетіні анықталды. Нитроцеллюлозалық мембранада пайда болған жолақша, алынған гибриді жасушалар штамы түзетін антиидиотиптік антиденелердің 4В3D9 моноклоналды антиденелердің описторхоз антиген эпитоптарына бағытталғандығын айқындады.

Антиидиотиптік антиденелердің антигенмен байланысу беріктілігін анықтау үшін иммунды ферменттік талдаудың жанама әдісі пайдаланылды. Планшет позитивті сарысуымен сенсбилизацияланып, 18 сағатқа +4°C-ге тоңазытқышқа

қалдырылды. Кейін оны фосфатты тұз ерітіндісімен 3 рет шайып, асцит сұйықтығын 0,010 мг/мл және 0,005 мг/мл ерітіндісінен бастап титрленді.

Зерттеу нәтижелері бойынша қорыта айтқанда, гибридомдық технология әдісімен *Opisthorchis felinus* антигендеріне бағытталған 4Н10 гибриді жасушалар штамы өндіретін телімді антиидиотиптік антиденелердің молекулалық салмағы анықталып, олардың IgM класына жататындығы айқындалды. Сонымен қатар, бұл антиидиотиптік антиденелердің антигенмен әрекеттесу константасы $2,6 \times 10^{-9}$ М шамасында болды. Яғни, 4Н10 штамының гибриді жасушаларының өндіретін моноклоналды антиидиотиптік антиденелері өзінің иммунды химиялық қасиеттері жағынан барлық талаптарға сай келеді және описторхоз антигенінің «ішкі сипаты» бола алатындықтан оларды иммунологиялық балау және дауалау препараттарын әзірлеуде қолдануға болатындығы айқындалды.

Әдебиеттер

- 1 Petney T.N. and Andrews R.H. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* // *International Journal for Parasitology*. – 2013.- Vol.43, №12-13. – P.1031-1046.
- 2 Thidarut B., Wu Z., Boonjaraspinyo S., Pinlaor S., Nagano I., Takahashi Y., Kaewsamut B., Yongvanit P. Alterations of gene expression of RB pathway in *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma // *Parasitology Research*. – 2009. – Vol.105, №5. – P.1273-1281.
- 3 Wu Z., Thidarut B., Nagano I., Boonjaraspinyo S., Pinlaor S., Pairojkul S., Chamgramol Y., Takahashi Y. Alteration of galectin-1 during tumorigenesis of *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma and its correlation with clinicopathology // *Tumor Biology*.- 2012. – Vol.33, №4 – P.1169-1178.
- 4 Khoontawad J., Hongsrichan N., Chamgramol Y., Pinlaor P., Wongkham C., Yongvanit Y., Pairojkul P., Khuntikeo N., Roytrakul S., Boonmars T. Increase of exostosin 1 in plasma as a potential biomarker for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma // *Tumor Biology*.- 2013. – Vol.36. – P.1275-1283.
- 5 Абуладзе К.И., Демидов Н.В., Непоклонов А.А., Никольский С.Н., Павлова Н.В., Степанов А.В. Паразитология и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных. – М.: Агропромиздат, 1990. – 464 с.
- 6 Инновационный патент 23891 Республика Казахстан, G01N 33/53 A61B 10/00. Способ приготовления экскреторно-секреторного антигена для серологической диагностики описторхоза / А.К. Булашев, С.Н.Боровиков, М.А.Куйбагаров и соавт.; заявитель и патентообладатель АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина». – № 68176; заявл. 11.02.2010; опубл. 15.04.2011, Бюл. №4. – 4 с.
- 7 Булашев А.К., Сұраншиев Ж.Ә., Серикова Ш. *Opisthorchis felinus* экскреторлы-секреторлық антигеніне телімді моноклоналды антиденелердің иммунды химиялық сипаттамасы // С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы. – Астана, 2013.- №4(79). – Б. 3-8.
- 8 Разработка способов иммуноферментной диагностики описторхоза человека и животных: отчет о НИР (заключительный) / АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина»: рук. Булашев А.К.; исполн.: Боровиков С.Н. – Астана, 2011. – 60 с. – №0109РК00476. – Инв. №0211РК00426.
- 9 Дыкман Л.А. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение/ Л.А.Дыкман, В.А.Богатырев, С.Ю.Щёголов, Н.Г.Хлебцов; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. – М.:Наука, 2008. – С.234-256.
- 10 Kohler G and Milstin C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predetermined specificity // *Nature*.-1975.-Vol.256.-P.495-497.
- 11 Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – competitive immunoassay // *J. Immunol. Meth.* – 1987. – Vol. 100, №3. – P. 173-179.

Reference

- 1 Petney T.N. and Andrews R.H. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* // *International Journal for Parasitology*. – 2013.- Vol.43, №12-13. – P.1031-1046.
- 2 Thidarut B., Wu Z., Boonjaruspinyo S., Pinlaor S., Nagano I., Takahashi Y., Kaewsamut B., Yongvanit P. Alterations of gene expression of RB pathway in *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma // *Parasitology Research*. – 2009. – Vol.105, №5. – P.1273-1281.
- 3 Wu Z., Thidarut B., Nagano I., Boonjaruspinyo S., Pinlaor S., Pairojkul S., Chamgramol Y., Takahashi Y. Alteration of galectin-1 during tumorigenesis of *Opisthorchis viverrini* infection-induced cholangiocarcinoma and its correlation with clinicopathology // *Tumor Biology*.- 2012. – Vol.33, №4 – P.1169-1178.
- 4 Khoontawad J., Hongsrichan N., Chamgramol Y., Pinlaor P., Wongkham C., Yongvanit Y., Pairojkul P., Khuntikeo N., Roytrakul S., Boonmars T. Increase of exostosin 1 in plasma as a potential biomarker for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma // *Tumor Biology*.- 2013. – Vol.36. – P.1275-1283.
- 5 Abuladze K.I., Demidov N.V., Nepoklonov A.A., Nikolskiy S.N., Pavlova N.V., Stepanov A.V. *Parazitologiya i invazionnyie bolezni selskohozyaystvennyih zivotnyih*. – M.: Agropromizdat, 1990. – 464 s.
- 6 Innovatsionniy patent 23891 Respublika Kazahstan, G01N 33/53 A61B 10/00. Sposob prigotovleniya ekskretorno-sekretornogo antigena dlya serologicheskoy diagnostiki opistorhoza / A.K. Bulashev, S.N.Borovikov, M.A.Kuybagarov i soavt.; zayavitel i patentoobladatel AO «Kazahskiy agrotehnicheskii universitet im.S.Seyfullina». – # 68176; zayavl. 11.02.2010; opubl. 15.04.2011, Byul. #4. – 4 s.
- 7 Bulashev A.K., Suranshiev Zh.A., Serikova Sh. *Opisthorchis felinus* ekskretoriyi-sekretoriylik antigenine telimdi monoklonaldyi antidenelerdin immundy himiyalyik sipattamasyi // S.Seyfullin atyindagyi Kazak agrotehnikalyik universitetinin Gyilyim zharshyisyi. – Astana, 2013.- #4(79). – B. 3-8.
- 8 Razrabotka sposobov immunofermentnoy diagnostiki opistorhoza cheloveka i zivotnyih: otchet o NIR (zaklyuchitelnyiy) / AO «Kazahskiy agrotehnicheskii universitet im.S.Seyfullina»: ruk. Bulashev A.K.; ispoln.: Borovikov S.N. – Astana, 2011. – 60 s. – #0109RK00476. – Inv. #0211RK00426.
- 9 Dyikman L.A. *Zolotyie nanochastitsyi: sintez, svoystva, biomeditsinskoe primeneniye*/ L.A.Dyikman, V.A.Bogatyirev, S.Yu. SchYogolov, N.G.Hlebtsov; Institut biohimii i fiziologii rasteniy i mikroorganizmov RAN. – M.:Nauka, 2008. – S.234-256.
- 10 Kohler G and Milstin C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predetermined specificity // *Nature*.- 1975.-Vol.256.-P.495-497.
- 11 Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – copetitive immunoassay // *J. Immunol. Meth.* – 1987. - Vol. 100, №3. - P. 173-179.