

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ДЕТАРМИНАНТ ВИРУСА ГРИППА А (H₂ N₂)

Валиев Р.- доцент, ТАУ им. Ш. Шотемур

Ключевые слова: антиген, антитела, вирус, грипп, гексапептид.

Нами было сообщено о «Синтезировании функционально – активных детерминант на примере гемагглютинаина вируса гриппа А (H₂ N₂) и получение его конъюгатов» [1].

Как оказалось, эти конъюгаты после трехкратного введения мышам, индуцировали образование специфических антител в достаточном высоком титре, которые взаимодействовали не только гексапептидом, но и с гемагглютинином и вирусом гриппа А (H₂ N₂). Эти антитела, по-видимому, обладали выраженной типовой специфичностью, так как не взаимодействовали перекрестно с вирусом гриппа свиньи H₁ (табл.1). Анализ тонкой специфичности антигексапептидных антител выявил их гетероклеточные свойства. Об этом свидетельствуют данные, представленные в таб.2. В реакции кокурентного ингибирования гексапептид практически полностью подавлял взаимодействие антител с идентичным антигеном, но не с гемагглютинином и вирусом гриппа. В тоже время, молекула гемагглютинаина и вирусные частицы полностью ингибировали взаимодействие антител с собственными антигенами и гексапептидом. Вероятно, антигексапептидные антитела действительно гетероклеточные, т.е. обладают более высокой авидностью к участку молекулы гемагглютинаина, включающему, возможно, последовательность, аналогичную гексапептиду, чем к антигенному детерминанту, индуцировавшей их образование. Следует отметить, что характер иммунного ответа зависел от белка – носителя. Если им был тироглобулин, то у подопытных животных определялся высокий уровень антител к гексапептиду, которые перекрестно взаимодействовали с гемагглютинином и вирусом. Когда же, в качестве носителя применяли гемоцианин, уровень антител к гексапептиду был низок, хотя и эта сыворотка в довольно высоком титре реагировала и с гемагглютинином, и вирусом гриппа (табл. 1).

Таблица 1 - Титр взаимодействия иммунных сывороток различного происхождения с соответствующими антигенами в реакции ELISA (log₂)

Препарат для получения антител	Антигены, иммобилизованные на полистироловых платах			
	Гексапептид	Гемагглютинин вируса гриппа А (H ₃ N ₂)	Вирус гриппа А (H ₃ N ₂)	Вирус гриппа свиньи H ₁
Гексапептид - тироглобулин	11,10 10,5 – 11,20	10,30 9,5 – 10,50	8,70 8,6 – 9,50	0
Гексапептид - гемоцианин	4,0 3,80 – 4,2	6,40 6,20 – 6,5	7,30 7,0 – 7,50	0
Вирус гриппа А (H ₃ N ₂)	0	8,50	8,50	Не определено
Бычий сывороточный альбумин	0	0	0	0

Таблица 2 - Конкурентное ингибирование (в %) взаимодействия мышинных антител против конъюгатов гексапептид – тироглобулин различными антигенами, а реакции ELISA (log₂)

Антигены, иммобилизованные на полистироловых платах	Антигены, используемые для ингибирования, 250 мкг/мл					
	Гексапептид	Гемагглютинин	Вирус гриппа А (H ₃ N ₂)	Тироглобулин	Гемоцианин	Столбнячный анатоксин
Гексапептид	95	95	95	15	10	10
Гемагглютинин	0	95	95	Не определено		
Вирус гриппа А (H ₃ N ₂)	0	95	95	-----\ -----		

Мы принимали в расчет и то, что при использовании полного адъюванта Фрейнда и белков – носителей в иммунной сыворотке, наряду с антителами против гексапептида, могли содержаться антитела и против эпитопов носителя и компонентов полного адъюванта Фрейнда. Поэтому, чтобы исключить возможность перекрестного взаимодействия последних с гексапептидом или молекулой гемагглютинина, были проведены соответствующие контрольные эксперименты. Так, было обнаружено, что введение одного полного адъюванта Фрейнда контрольным мышам, практически не вызвало образование антител, перекрестно реагирующих с гексапептидом. Антитела, индуцированные с помощью тироглобулина или гемоцианина, взаимодействовали с этими антигенами в высоком титре ($9 - 10, \text{Iog}_2$), но очень слабо реагировали с гексапептидом, гемагглютинином и вирусом гриппа ($1 - 1,5 \text{Iog}_2$). Аналогичные результаты в отношении этих носителей были получены и в работе [2]. С другой стороны, и антитела против гексапептида очень слабо взаимодействовали с тироглобулином и гемоцианином ($1,5 - 2,0, \text{Iog}_2$). Отсутствие выраженной перекрестной реактивности было четко показано в эксперименте с конкурентным ингибированием. Для этого в тест – систему, состоящую из антигена (гексапептида, иммобилизованного на полистироле) и антител (иммунная сыворотка, содержащая антитела против гексапептида), вводили препараты тироглобулина и гемоцианина, а в качестве контроля – столбнячный анатоксин. Как следует из табл. 2, ингибирование взаимодействия антигексапептидных антител с гексапептидом при этом не превышало $10 - 15\%$. В том случае, когда, а систему вводили адекватное количество гексапептида, происходило практически полное ингибирование реакции антитело – антиген. Следовательно, антитела против гексапептида были индуцированы гексапептидной детерминантой, а не носителем. Таким образом, полученные нами результаты могут указать на то, что подобное конструирование функционально – активных детерминант на базе очень коротких пептидных фрагментов может быть достаточно перспективным.

Экспериментальная часть. В работе использованы тироглобулин (Calbichem, США), гемоцианин улитки, бычий сывороточный альбумин, пероксидаза хрена (Sigma, США), столбнячный анатоксин, адъювант Фрейнда (Difco, США), вирус гриппа А ($\text{H}_3 \text{N}_2$), вирус гриппа свиней H_1 , кроличьи антитела против вируса гриппа А ($\text{H}_3 \text{N}_2$), мыши самцы линии СВА массой $20 - 25$ г.

Иммунизация мышей конъюгатам гексапептида с тироглобулином и гемоцианином. Полученные конъюгаты использовались для иммунизации мышей. Первые два введения конъюгатов использовали в дозе 150 мкг на инъекцию под кожу холки и корень хвост, в полном адъюванте Фрейнда, с $3 -$ недельным интервалом. Разрешающую дозу вводили через 4 недели внутрибрюшинно, без адъюванта в дозе 100 мкг/мышь, вместе с клетками карциномы Эрлиха $2 \cdot 10^6$. На $5-6$ сутки извлекли перитональный экссудат и центрифугировали клеточные элементы. Недостаточную жидкость использовали в качестве источника антител для исследования. Контрольным животным вводили полный адъювант Фрейнда без антигена или белков – носителей. Эти препараты вводили в той же дозе и по той же схеме, что и изучаемые конъюгаты.

Определение титров антител против гексапептида, индуцированных его конъюгатами с тироглобулином и гемоцианином иммуноферментным методом. В стандартные плоскодонные $96 -$ луночные полистирольные планшеты вносили по 100 мкл препаратов (10 мкл/мл); гексапептид, гемагглютинин вирус гриппа А ($\text{H}_3 \text{N}_2$), вирус гриппа А ($\text{H}_3 \text{N}_2$), вирус гриппа свиньи H_1 , тироглобулин быка), гемоцианин улитки или столбнячный анатоксин в забуференный фосфатами растворе с $\text{pH } 7,5$ (ЗФР). Инкубировали 1 сут. при 40°C . Планшеты отмывали 3 раза водой, с заключительным промыванием $0,05\%$ водным раствором твина – 20 в течение 3 мин. Не связавшиеся с антигеном участки полистирола блокировали $0,5\%$ раствором бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на ЗФР, в течение 40 мин при 37°C и отмывали по вышеуказанной схеме. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора ЗФР и проводили титрование путем последовательного $2 -$ кратного разведения мышинных антисывороток. Планшеты выдерживали 45 мин при 37°C . После промывания в лунки вносили по 100 мл кроличьей антисыворотки против IgG мыши, инкубировали 45 мин при 37°C и

промывали. После этого прибавляли по 100 мкл ослиной иммунной сыворотки против IgG кролика, меченной пероксидазой хрена, выдерживали 45 мин при 37⁰ С, собирали конъюгат и повторяли промывание. Готовили свежий раствор хромогена (5 мл фосфатно – цитратного буфера, рН 5, с 2 мг о – фенилендиамина и 20 мкл 3 % H₂ O₂) и добавляли в полистирольные лунки. Спустя 30 мин экспозиции ферментативную реакцию останавливали 2 н. H₂SO₄, после чего проводили фотометрическое измерение при 492 нм. За титр антител принимали последнее разведение сыворотки, при котором величина экстинкции отличалась в 2 раза от контроля. Результаты даны в Iog.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валиев Р. // Журн Кишоварз, 2019. - №2(82). – С.20 – 24
2. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe I.G., Lerner R.A. // Ceell. 1982. V. 28. № 3. P. -477- 487

АННОТАЦИЯ

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ДЕТАРМИНАНТ ВИРУСА ГРИППА А (H₂ N₂)

В составе конъюгата с тиреоглобулином или гемоцианином гексапептид индуцировал у мышей СВА специфические антитела, взаимодействующие не только с гомологичным антигеном, но также с гемагглютинином и вирусом гриппа А (H₃ N₂).

АННОТАЦИЯ

ҲОСИЛКУНИИ АНТИТЕЛАҲОИ МАҲСУС МУҚОБИЛИ ДЕТЕРМИНАНТҲОИ ФУНКЦИОНАЛИИ ФАЪОЛИ ВИРУСИ ЗУКОМ А (H₃ N₂)

Гексапептид дар таркиби коъюгат бо тиреоглобулин ё гемотсианин дар мушҳои СВА анителаҳои маҳсус ҳосил мекунад, ки на танҳо бо антигени гомологӣ, ҳамчунин бо гемагглютинин ва вируси зуком А (H₃ N₂) таъсир мекунад.

Калимаҳои калидӣ: *антиген, антитела, вирус, зуком, гексапептид.*

ANNOTATION

THE OBTAINING SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST THE FUNCTIONALLY ACTIVE DETERMINANTS OF THE INFLUENZA VIRUS A (H₃ N₂)

Conjugat with thyreoglobulin and hemocianine, but also the hexapeptide induced formation of highly specific antibodies with the heterolitic properties of the CBA mice. Anti-hexapeptide antibodies interact not only with homologous antigene but also with hemagglutinin and influenza virus.

Key words: *antigen, antibody, virus, flu, hexapeptide.*