Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях

А.Г. Берзина[1], Н.Б. Гамалея[1], Г.Д. Капанадзе[2]

[1] – ФГБУ «ННЦ Наркологии» Минздрава России
[2] – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, giyak@yandex.ru

В статье рассматриваются методические подходы к получению антивидовых антисывороток. Предложены удобные схемы иммунизации различных лабораторных животных – кроликов, мини-свиней, крыс. Титры полученных антисывороток, определенные с помощью непрямого метода твердофазного иммуноферментного анализа, составили для кроличьих антисвиных сывороток 1 : 512000, для свиных антикроличьих – 1 : 256000, для крысиных антикроличьих – 1 : 128000 и крысиных антисвиных –1 : 12800.

Ключевые слова: антивидовые сыворотки, иммуноглобулины класса G, кролики, мини-свиньи, крысы, иммунизация.

В настоящее время в нашей стране и за рубежом разрабатывается иммунологическая защита от целого ряда вредных химических соединений: канцерогенов, мутагенов, тератогенов и лекарств в случае их передозировки. В области наркологии работы ведутся для изучения возможности лечения отравлений наркотиками введением специфических антител, а также лечения и профилактики наркотической зависимости путем вакцинации специфическими антителами к наркотикам [3].

В доклинических иммунофармакологических исследованиях чаще всего в качестве продуцентов антител используют кроликов. При этом образуются поликлональные антитела различной специфичности. В последние годы стала широко применяться гибридомная технология получения мышиных моноклональных антител.

Скрининг получаемых антител проводится, как правило, с помощью непрямого метода иммуноферментного анализа (ИФА) [2]. Успех тестирования зависит от качества используемых в анализе антивидовых сывороток, которые должны обладать высокими титрами и специфичностью.

Ввиду того, что в иммунофармакологической практике используются различные виды животных, актуальным является получение антивидовых анти-

сывороток к каждому виду животных, участвующих в эксперименте.

В 2011 г. в ННЦ наркологии совместно с НЦБМТ ФМБА России была начата работа по получению антител к психоактивным веществам. Целью настоящего исследования была разработка методических подходов к получению антивидовых антисывороток с высокими титрами и хорошей специфичностью.

Материалы и методы

Опыты проведены на 10 кроликах различных пород (серый великан, советская шиншилла, калифорнийская порода), 3 мини-свиньях светлогорской популяции и 20 крысах линии Wistar.

Нормативные ссылки

В наших исследованиях мы придерживались требований, утвержденных протоколами исследования, и стандартными операционными процедурами ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России».

Данное исследование было выполнено в соответствии со следующими документами:

— Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

— Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. №708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";

— Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [8];

— Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [9];

— Guide for the care and use of laboratory animals [10].

Распределение по группам

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого всех животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (статистическая программа Statistica 6.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

Идентификация животных

Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату начала эксперимента, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Мини-свиней маркировали бирками на ушной раковине, кроликов — с помощью ушных выщипов, мелких грызунов — с помощью меток на хвосте.

Содержание животных

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

В период акклиматизации и эксперимента животные были размещены в индивидуальных станках и в клетках в соответствии с требованиями GLP.

В качестве подстила использовались стерилизованные опилки из нехвойных пород деревьев.

Брикетированные комбикорма для лабораторных животных давались *ad*

libitum в кормушки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

Животным давалась очищенная вода *ad libitum*.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (20-22°С и относительной влажности воздуха 50-70%). В помещениях для содержания животных поддерживался 12-час цикл освещения.

Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

Клинические наблюдения

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно. Выполняли тщательный осмотр животного в клетке содержания. Фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, органов чувств, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи.

Подготовка антигенов для иммунизации

Поскольку при повторных иммунизациях основная масса продуцируемых антител принадлежит к классу иммуноглобулинов G, то в нашу задачу входило выделение из нормальных сывороток крови кроликов иммуноглобулинов G класса [1]. Выделение проводили с помощью метода ионообменной хроматографии на ДЭАЭ сефадексе А-50 известным способом [5]. Схемы очистки IgG из сывороток крови мини-свиньи и кролика представлены на рис. 1

На первом этапе к 6 мл сыворотки кролика добавляли равный объем 20% водного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) мол. массой 6000 при помешивании в течение 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 1000g 20 мин. Преципитат растворяли в 3 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера (КФБ), рН 7,4, содержащего 0,1 М натрия хлорида, и диализовали против того же буфера при +4ºС в течение 18–20 ч. Колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (1,5 × 30 см) уравновешивали стартовым калий-фосфатным буфером, рН 7,2. На колонку наносили 4 мл IgG после диализа с концентрацией 30 мг/мл. Первую фракцию IgG элюировали тем же буфером. Вторую фракцию элюировали градиентом 0,01–0,2М калий-фосфатного буфера (рН 8).

Из сыворотки крови свиньи выделяли иммуноглобулины класса G (IgG) методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50 по методу Клюкиной В.С. [6]. Для этого сначала выделяли суммарную фракцию иммуноглобулинов методом осаждения 20% водным раствором ПЭГ-6000. Для этого к 5 мл сыворотки медленно, при помешивании добавляли равный объем раствора ПЭГ-6000, встряхивали в течение 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали полученную смесь при 1000g в течение 20 мин. Преципитат растворяли в 2,5 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,1 М натрия хлорида, и диализовали против того же буфера при +4ºС в течение 18–20 ч. Затем 2 мл полученного раствора IgG с концентрацией 50 мг/мл наносили на колонку с ДЭАЭ-

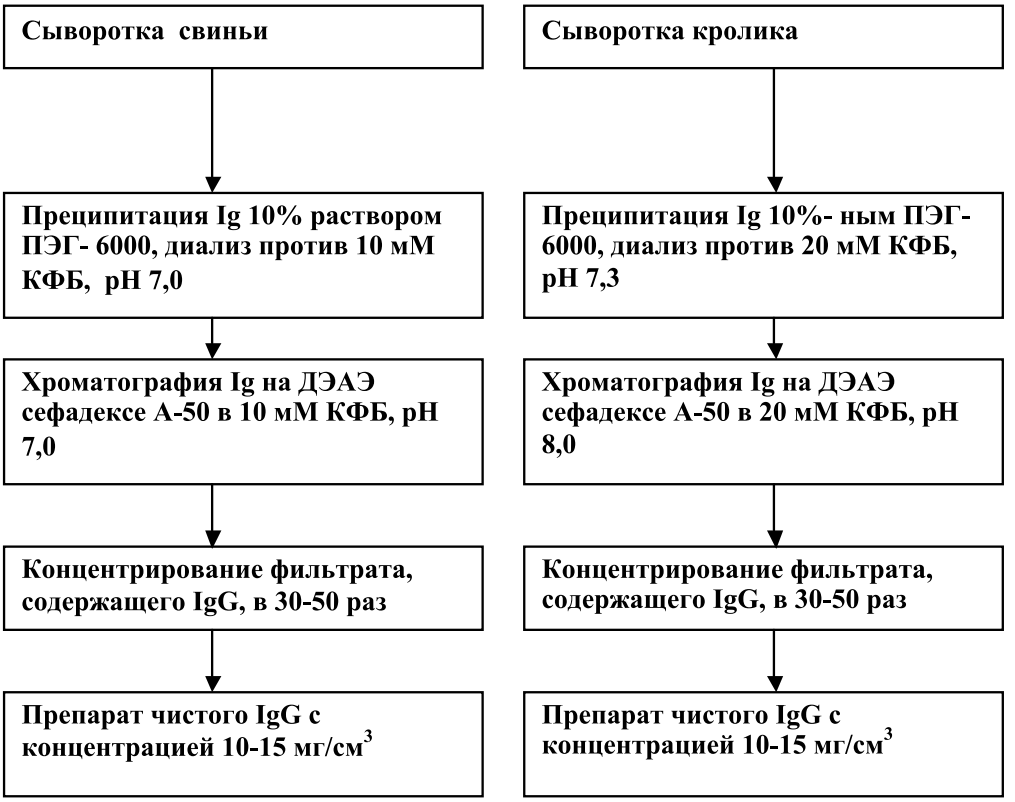

Рис. 1. Схема очистки IgG из сыворотки крови мини-свиньи (а) и кролика (б).

сефадексом А-50 (1,5 × 30 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером, pH 7,0, и элюировали IgG тем же буфером.

Скорость элюции во всех экспериментах составляла 75 мл/ч. Объем фракций составлял 3 мл. Оптическую плотность фракций измеряли на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Для определения концентрации полученного препарата IgG использовали коэффициент молярной экстинкции ε=1,2. Отобранные фракции, содержащие IgG, объединяли и концентрировали в 3 раза с помощью концентраторов (Spin-X UF 6, Corning) и центрифугирования при 4000 g в течение 30 мин.

Выделенные антигены хранили при -20°С. Перед иммунизацией иммуноглобулины растворяли в стерильном физиологическом растворе для внутривенных инъекций. Для подкожных и внутримышечных инъекций растворы антигенов смешивали с адъювантом Фрейнда (полным или неполным) в объемном соотношении 1 : 1.

Методики проведения инъекций животным

Кроликов иммунизировали внутривенно, вводя препарат в объеме 1,0 мл в краевую ушную вену. Подкожные инъекции осуществляли в 8 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 0,25 мл в каждую точку.

Внутривенные инъекции мини-свиньям проводили, вводя препарат в

объеме 2,0 мл в хвостовую вену. Подкожные инъекции осуществляли в область шейных лимфоузлов, вводя препарат в 2 точки в объеме 1,5 мл. Внутримышечные инъекции проводили в область задних конечностей, вводя препарат в 2 точки в объеме 1,5 мл.

Крысам вводили антиген подкожно в 4 точки вдоль хребта в объеме 0,25 мл или внутрибрюшинно в объеме 1,0 мл.

Забор крови у экспериментальных животных

Забор крови осуществляли у кроликов и свиней на 7-й, 14-й и 21-й день от последней инъекции. У крыс кровь забирали на 14-й день от последней инъекции.

Кровь забирали у кроликов из краевой ушной вены (10-20 мл), у свиньи — из хвостовой вены (20 мл), у крыс — после декапитации — 5-7 мл.

Техника проведения подкожных инъекций на мини-свинье показана на рис. 2.

Рис. 2. Техника проведения подкожных инъекций в область шейных лимфоузлов мини-свинье.

Техника забора крови у кролика представлена на рис 3.

Получение и хранение антисывороток

Полученную кровь инкубировали 1 ч при 37ºС, далее выдерживали на холоде при +4 ºС в течение 24 ч и отделяли образовавшуюся сыворотку центрифугированием при 3000 g. Сыворотки хранили при -20 ºС в смеси с глицерином 1 : 1.

Тестирование антисывороток непрямым методом ИФА

Определение титров полученных антисывороток проводили по стандартной методике непрямого варианта ИФА [2] с использованием полистирольных 96-луночных плоскодонных планшетов для ИФА фирмы Nunc (Дания), антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена, фирмы Sigma. Субстрат-хромогенная смесь состояла из перекиси водорода и ортофенилендиамина производства фирмы Sigma. За титр сыворотки принимали величину, обратную разведению

Рис. 3. Забор крови из краевой ушной вены кролика.

сыворотки, которое дает в ИФА значение оптической плотности (ОД), превышающее значение в контроле на 0,1 ед. оптической плотности (о.е.).

Результаты и их обсуждение

Гельхроматография суммарных фракций иммуноглобулинов, выделенных из нормальных сывороток лабораторных животных, позволила освободиться от других классов иммуноглобулинов и получить чистые препараты IgG.

На рис. 4 и 5 представлены элюционные профили очистки иммуноглобулинов кролика и свиньи методом ионной хроматографии на колонках с сефадексом ДЭАЭ А-50.

Практический выход IgG в результате очистки сывороток кролика составил 60%, а сывороток мини-свиней — 20%.

Для получения антивидовых антисывороток нами были предложены следующие схемы иммунизации (табл. 1).

Результаты тестирования антисывороток на наличие антивидовых антител в ИФА представлены в табл. 2.

Тестирование антисывороток в ИФА после проведенного цикла иммунизации кроликов иммуноглобулинами

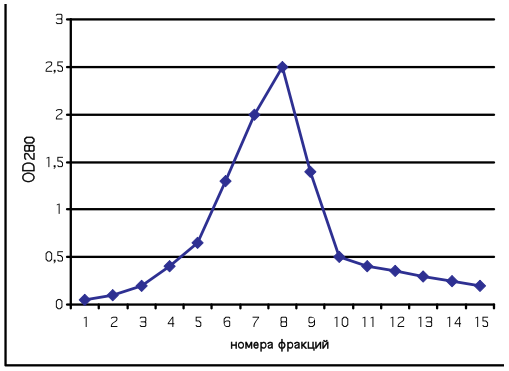

Рис. 4. Элюционный профиль очистки IgG кролика на сефадексе ДЭАЭ А-50.

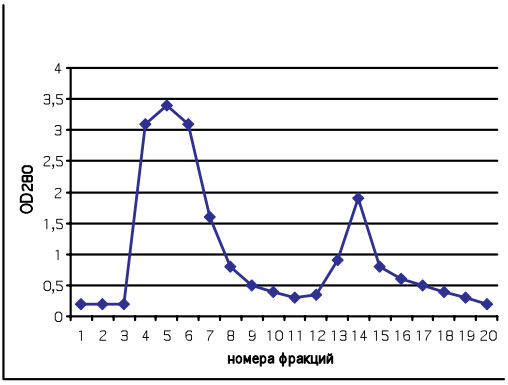

Рис. 5. Элюционный профиль очистки IgG свиньи на сефадексе ДЭАЭ А-50.

Таблица 1

Схема иммунизации лабораторных животных

Вид животных	Масса, кг	Вводимый антиген, вещество	Доза вводимиго антигена, мг/кг	Способ введения антигена		
				1-я инъекция*	2-я инъекция*	3-я инъекция
Кролики калифорнийской породы	5	IgG свиньи	1	внутривенно	Подкожно, в 8 точек вдоль хребта, с ПАФ	Подкожно, в 8 точек вдоль хребта, с НАФ
Мини-свинья	9	IgG кролика	1	внутривенно	в/м, в 2 точки задних конечностей, с ПАФ	Подкожно, в 2 точки в область шейных лимфоузлов, с НАФ
Крысы линий Вистар	0,3	IgG свиньи, IgG кролика	1	Подкожно, в 4 точки вдоль хребта, с ПАФ	Подкожно, в 4 точки вдоль хребта, с НАФ	Внутрибрюшинно, с НАФ

* Инъекции проводились с интервалом в 14 дней.

Сокращения: ПАФ – полный адъювант Фрейнда, НАФ – неполный адъювант Фрейнда.

Таблица 2

Титры антивидовых антител в сыворотках иммунизированных животных, определенные непрямым методом твердофазного ИФА

№ п/п	Сыворотка крови	Титр в ИФА	
		После первичной иммунизации	После реиммунизации
1.	Кроличья против IgG свиньи	1 : 128000	1 : 512000
2.	Свиная против IgG кролика	1: 2000	1 : 256000
3.	Крысиная против IgG кролика против IgG свиньи	 1 : 128000 1 : 12800	 — —

мини-свиньи показало, что наиболее высокие титры наблюдались при использовании кроликов калифорнийской породы, независимо от пола животного. Реиммунизация кроликов теми же антигенами позволила повысить титры антивидовых антител в 2 раза. При иммунизации мини-свиней иммуноглобулинами кролика наибольшие титры были получены только после реиммунизации, причем реиммунизация позволяла повысить титры более чем в 100 раз. Схемы иммунизации мини-свиней кроличьими иммуноглобулинами, предложенные другими авторами [4, 7], отличались большей трудоемкостью и позволяли получать сыворотки с меньшими титрами.

При обследовании сывороток иммунизированных крыс было отмечено, что титры антител против IgG кролика были в 10 раз выше, чем титры антител против IgG свиньи. По-видимому, это можно объяснить большей иммуногенностью IgG кролика, чем IgG свиньи, что объясняется серологическим родством иммуноглобулинов крысы и свиньи. Данный факт был отмечен в работе Клюкиной В.С. при тестировании антиглобулинового пероксидазного конъюгата свиньи с антителами крысы [6].

Выводы

Предложенная нами методика иммунизации животных позволяет получить антивидовые антисыворотки с высокими титрами, что говорит о ее преимуществах перед методиками, описанными другими авторами.

Удобство и простота исполнения данной методики делают ее полезной в иммунофармакологических исследованиях.

Полученные результаты могут представлять также интерес для исследователей в области биотехнологии и ветеринарии.

Список литературы

1. Антитела. Методы. Книга 1 / под ред. Д. Кэтти. М.: «Мир». 1991. 287 с.
2. Антитела. Методы. Книга 2 / под ред. Д. Кэтти. М.: «Мир». 1991. 382 с.
3. ***Гамалея Н.Б., Берзина А.Г.*** Вакцины от наркотиков — новое перспективное направление профилактики злоупотребления ПАВ // «Наркология». 2011. № 10. С. 70-83.
4. ***Дибиров Ш.С.*** Разработка и усовершенствование средств и методов диагностики чумы плотоядных животных. Автореф. дисс. канд. вет. наук. Покров. 1997.
5. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М.: Изд-во «Мир». 1979. 267 с.

6. ***Клюкина В.С.*** Промышленные технологии производства тест-систем для диагностики инфекционных болезней свиней. Дисс. докт. биол. наук. Щелково. 2002.
7. ***Хруленко В.Н.*** Анализ эпизоотических и эпидемических процессов при туберкулезе и совершенствование методов диагностики. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Щелково. 2002.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО Издательство «Медицина». 2005. 832 с.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль — 2С. 2010. 358 с.
10. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. Washington. D.C. 1996.

Methodical approaches to production of antispecies antisera for immunopharmacological studies

A.G. Berzina, N.B. Gamaleya, G.D. Kapanadze

The paper describes the methodological approaches to production of antispecies antisera. Convenient patterns of immunization of different species of laboratory animals are proposed, i.e. rabbits, mini-pigs, and rats. The titers of antisera were determined by an indirect method of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). These titers were 1 : 512000 for the rabbit anti-pig antsera, 1 : 250000 for the pig anti-rabbit antisera, 1 : 128000 for the rat anti-rabbit antisera, and 1 : 12800 for the rat anti-pig antisera.

Key words: antispecies antisera, immunoglobulin G class, rabbits, mini-pigs, rats, immunization.