

Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение иммуноглобулина G лошади

А.Г. Берзина¹, Н.В. Станкова², Л.И. Ульянова¹, Н.Б. Гамалея¹,
Г.Д. Капанадзе²

¹ – НИИ наркологии – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, sinayva@yandex.ru

Оптимизирована методика определения свиных антител против иммуноглобулина (Ig) класса G лошади методом иммуноферментного анализа (ИФА). На мини-свиньях светлогорской популяции исследовано формирование иммунного ответа на введение Ig G лошади. Свиноматку иммунизировали Ig G лошади в дозе 0,2 мг/кг, через 14 дней антиген вводили повторно. Через 6 мес. цикл инъекций повторяли с использованием меньшей дозы антигена (0,1 мг/кг). Потомство, рождённое после реиммунизации свиноматки, подвергалось проверке на содержание антител к Ig G лошади в возрасте 5 и 10 мес. В качестве контроля в реакции ИФА использовали сыворотку крови неиммунной свиньи. Определение титра антител проводили на 21-й и 142-й день от произведенных инъекций. Полученные результаты свидетельствуют о высокой иммуногенности антигена – Ig G лошади. После одного цикла иммунизации титр антител к Ig G лошади составил 1:100000. Реиммунизация животного через 6 мес. позволяет увеличить титр антител до 1:1000000. Содержание антител в сыворотке крови иммунной свиньи сохраняется высоким на протяжении 1,5 лет (титр 1:100000). Антитела к Ig G лошади, полученные поросятами внутриутробно из кровяного русла матери и присутствовавшие в титрах от 1:1000 до 1:10000 в возрасте 5 мес., постепенно исчезали. К 10 мес. титр антител уменьшался до 1:100.

Ключевые слова: иммуноглобулин G лошади, иммунный ответ, светлогорские мини-свиньи, потомство, биомодель.

Введение

Экспериментальные исследования на животных, позволяющие моделировать необходимые состояния и изучать динамику процесса, играют важную роль в решении многих проблем медицины. Одной из таких проблем является разработка антиидиотипических вакцин к психоактивным веществам (ПАВ). Антиидиотипические (вторичные) антитела, как известно, в их поливалентной форме могут быть использованы в качестве антигена при создании вакцинных препара-

тов [1, 2]. Ранее были получены данные, согласно которым антиидиотипические антитела способны выполнять сигнальную функцию антигена в том случае, когда они являются гетерологичными для реципиента [5]. В списке иммунобиологических препаратов, разрешённых к применению в лечебных целях у людей, основное место занимают иммуноглобулины человека, а также гетерологичные иммуноглобулины лошади.

Имуноглобулин лошади класса G (Ig G) обладает высокой иммуногенностью,

широко применяется в медицинской практике для лечения столбняка, дифтерии и бешенства. Однако при его применении у человека возможны аллергические реакции. При разработке антиидиотипических вакцин с использованием Ig G лошади нужно иметь представление о реакции иммунной системы на данный антиген. Для выяснения особенностей иммунного ответа необходимо проводить эксперименты на лабораторных животных–биомоделях. В последние годы в качестве биомодели человека при проведении биомедицинских исследований успешно используются мини-свиньи светлогорской популяции [3, 4, 7]. В связи с этим, при изучении вопроса о создании антиидиотипической вакцины от ПАВ нами было принято решение исследовать формирование иммунного ответа на Ig G лошади у светлогорских мини-свиней.

Цель данной работы – оптимизировать методику определения свинных антител против Ig G лошади методом ИФА и проследить динамику накопления в крови мини-свиньи светлогорской популяции антител к Ig G лошади с исполь-

зованием малых доз антигена в процессе иммунизации на протяжении 1,5 лет, а также выявить наличие антител к Ig G лошади у потомства иммунной мини-свиньи в разные возрастные периоды.

Материалы и методы

В работе в качестве антигена для иммунизации был использован коммерческий препарат Ig G лошади фирмы «Sigma» (США). В качестве биомоделей были использованы светлогорские мини-свиньи, которые содержались в оборудованном виварии с оптимальными условиями [6]. Свиноматке (в возрасте 8 мес. и массой 15 кг) вводили Ig G лошади в дозе 0,2 мг/кг в две точки задних конечностей внутримышечно в смеси 1:1 с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). Через 14 дней эти же дозы антигена вводили подкожно в область шейных лимфоузлов в смеси 1:1 с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ). Третью инъекцию проводили аналогичным образом через 14 дней. Заборы крови осуществляли из краниальной полой вены на 21-й день от последней инъекции (рис. 1).



Рис. 1. Забор крови у мини-свиньи из краниальной полой вены.

Через 6 мес. цикл инъекций повторяли с использованием меньшей дозы препарата (0,1 мг/кг). Титр специфических антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА с использованием антивидового иммунопероксидазного конъюгата фирмы «Sigma» (США). Для блокировки неспецифической реакции в буфер (PBST) добавляли 0,3% бычьего сывороточного альбумина (БСА). За величину титра принимали максимальное разведение сыворотки, при котором оптическая плотность (ОП) при длине волны 490 нм превышала значения в контроле в два раза. В качестве контроля в реакции ИФА использовали сыворотку крови неиммунной свиньи. Потомство, рождённое после реиммунизации свиноматки в период первой беременности, подвергалось проверке на содержание антител к Ig G лошади в возрасте 5 мес. (первая проверка), вторую проверку поросётам проводили в возрасте 10 мес. Одному из поросётов того же потомства в возрасте 5 мес. вводили внутримышечно антиген в дозе 0,1 мг/кг в смеси 1:1 с ПАФ. Определение титра антител проводили на 21-й и 142-й день от произведенной инъекции.

Физиологическое состояние животных оценивали визуально, проводили

взвешивание в начале эксперимента и через полгода, а также измеряли ректальную температуру.

Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные условия для определения свинных антител к Ig G лошади методом ИФА. Поскольку, по литературным данным, у свиньи и лошади имеется частичное серологическое родство между иммуноглобулинами класса G, то в реакции с контрольной сывороткой неиммунной свиньи возможны высокие фоновые значения. Для снижения фоновых значений были подобраны оптимальные условия постановки ИФА (концентрация антигена, сорбированного на твердой фазе – 2 мкг/мл, разведение антивидового конъюгата 1:10000, концентрация субстрата орто-фенилендиамина (ОФД) – 2мг/мл). Несмотря на оптимизацию условий, значения ОП в контроле оставались довольно высокими (0,2 ед. ОП). Определение титра специфических антител к Ig G лошади в сыворотке мини-свиньи №454 после первого цикла иммунизации, проведенного в апреле 2015 г., показало наличие антител в разведении сыворотки 1:100000 (май 2015 г., рис. 2).

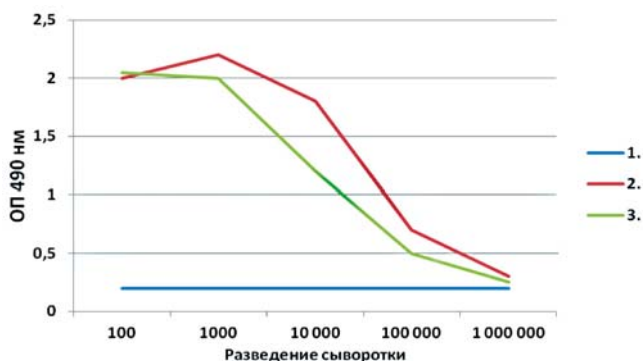


Рис. 2. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после первого цикла иммунизации в 2015 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунной свиньи (май 2015 г.); 3 – сыворотка иммунной свиньи (сентябрь 2015 г.).

На протяжении 4 мес. (с мая по сентябрь 2015 г.) титр антител оставался практически неизменным. Вторым циклом иммунизации проводили в октябре 2015 г. (через 6 мес. от начала иммунизации) с использованием меньших доз антигена – 0,1 мг/мл. В результате, к концу декабря 2015 г. титр антител у свиноматки составил 1:1000000 (рис. 3).

На протяжении длительного времени титр антител оставался высоким (1:100000). Результаты тестирования антисывороток в июле и октябре 2016 г. представлены на рис. 4.

В потомстве свиноматки, рожденном вскоре после реиммунизации (январь 2016 г.), нами также был определен титр антител к Ig G лошади. Обнаруже-

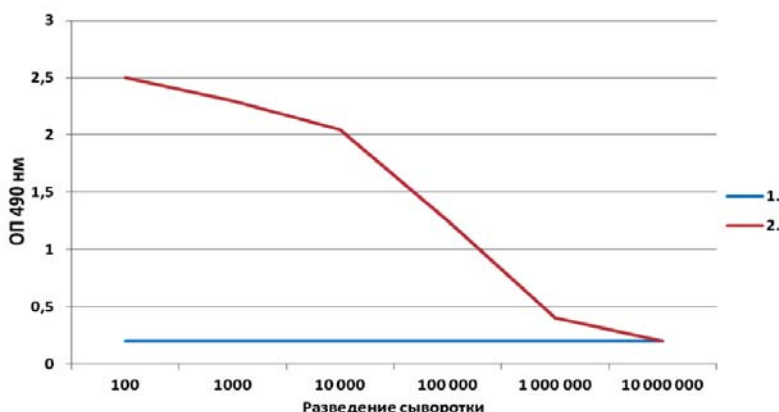


Рис. 3. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после второго цикла иммунизации в 2015 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунной свиньи (декабрь 2015 г.).

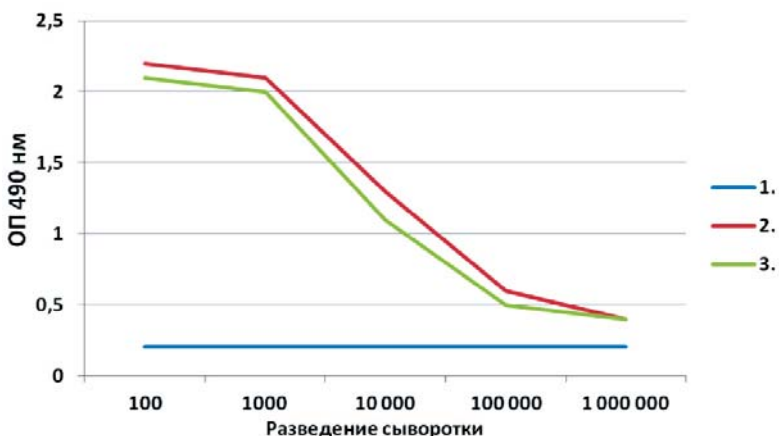


Рис. 4. Титры антител в сыворотках крови свиноматки № 454 против Ig G лошади после однократной внутримышечной инъекции в июне 2016 г.: 1 – контроль, сыворотка неиммунной свиньи; 2 – сыворотка иммунной свиньи (июль 2016 г.); 3 – сыворотка иммунной свиньи (октябрь 2016 г.).

но, что все поросята в возрасте 5 мес. обладали материнским иммунитетом к данному антигену, однако антитела в их сыворотках присутствовали в меньших количествах (титры от 1:1000 до 1:10000), чем у матери. Через 5 мес. в сыворотках десятимесячных поросят антител практически не осталось (титр 1:100, рис. 5).

Однако у поросенка из данного потомства, получившего всего одну инъекцию антигена в дозе 0,1 мг/кг в возрасте 5 мес., титр антител сохранялся высоким (1:10000) до 10 мес. (рис. 6).

Ректальная температура у животных не изменялась в процессе иммунизации и оставалась на уровне 38,6°C, что свидетельствует об отсутствии неблагопри-

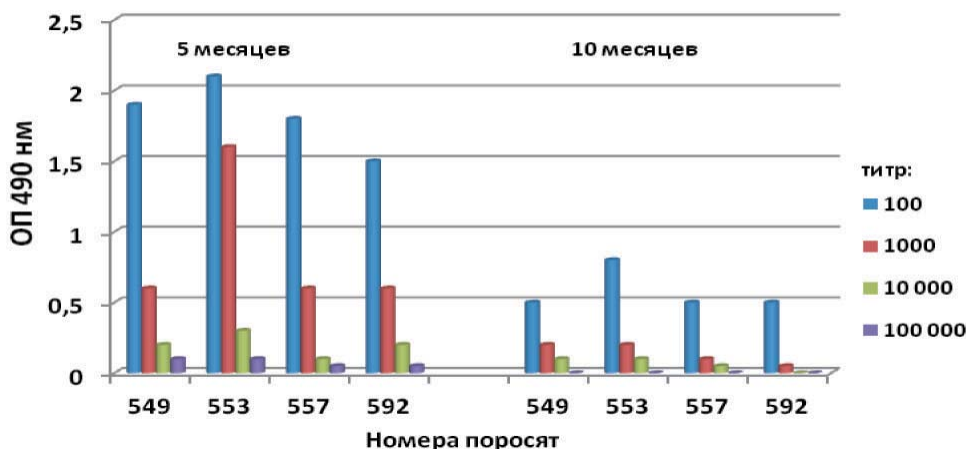


Рис. 5. Титры антител против Ig G лошади в сыворотках крови потомства свиноматки № 454 (в возрасте 5 и 10 мес.).

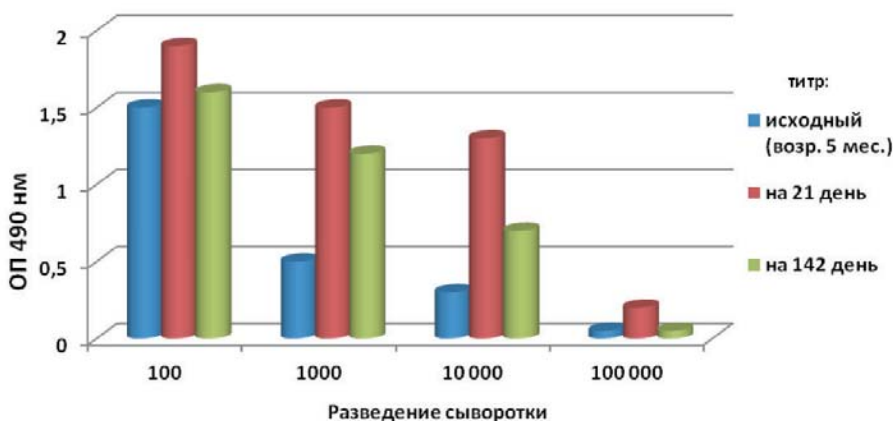


Рис. 6. Титры антител против Ig G лошади в сыворотке крови поросёнка № 555, получившего в 5 мес. одну внутримышечную инъекцию антигена.



Рис. 7. Свиноматка № 454 со вторым пометом (ноябрь 2016 г.).

ятного влияния Ig G лошади на организм свиней. Животные нормально росли и развивались согласно своему возрасту, имели хороший аппетит и адекватное поведение. Масса свиноматки № 454 через 6 мес. от начала иммунизации составила 30 кг, что также является нормой для данного вида, позже от нее было получено еще одно здоровое потомство (рис. 7).

Заклучение

Таким образом, полученные нами результаты по иммунизации мини-свиньи светлогорской популяции антигеном Ig G лошади свидетельствуют о высокой иммуногенности данного антигена. Оптимизирована методика определения свинных антител против Ig G лошади методом ИФА. После одного цикла иммунизации титр антител к Ig G лошади составил 1:100000. Реиммунизация животного через 6 мес. позволяет увеличить титр антител до 1:1000000. Содержание антител в сыворотке крови иммунной свиньи сохраняется высоким на протяжении 1,5 лет (титр 1:100000). Антитела к иммуноглобулину лошади,

полученные поросятами внутриутробно из кровяного русла матери и присутствующие в титрах от 1:1000 до 1:10000 в возрасте 5 мес., постепенно исчезают. К 10 мес. титр антител уменьшается до 1:100. Однократная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг свиноматке и ее пятимесячному поросенку позволила продлить высокое содержание антител в крови матери (титр 1:1000000) и поросенка (титр 1:10000) до полугода. Побочных эффектов у животных при иммунизации с использованием предложенной нами схемы не наблюдалось.

Список литературы

1. *Бяловский Ю.Ю., Булатецкий С.В.* Изменения иммунологических показателей в условиях увеличенного сопротивления дыханию у спортсменов // Спортивная медицина: наука и практика. 2016. № 2. С. 29-34.
2. *Гамалея Н.Б., Берзина А.Г.* Вакцины от наркотиков – новое перспективное направление профилактики злоупотребления ПАВ // Наркология. 2011. № 10. С. 70-83.
3. *Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В.* Получение диагностических антисывороток к морфину на мини-свиньях светлогорской популяции // Биомедицина. 2014. № 3. 96 с.

4. *Капанадзе Г.Д.* Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина. 2006. № 2. С.40-51.
5. *Кульберг А.Я.* Антииммуноглобулины. - М.: Медицина. 1978. 183 с.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
7. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина. 2012. № 1. С 49-53.

Svetlogorsk mini-pigs as a biomodel for studying the immune response of the horse immunoglobulin G

**A.G. Berzina, N.V. Stankova, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleyа,
G.D. Kapanadze**

The technique of detecting pig antibodies against the horse immunoglobulin (Ig) of the G class was optimized by the method of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Formation of the immune response against the horse Ig G was investigated on Svetlogorsk mini-pigs. The sow was immunized with the horse Ig G at a dose of 0.2 mg/kg, 14 days after the antigen was administered again. After 6 months, the injection cycle was repeated using a smaller dose of the antigen (0.1 mg/kg). The offspring born after reimmunization of the sow was tested for the content of antibodies against the horse Ig G at the age of 5 and 10 months. Blood serum of non-immune pigs was used as a control in ELISA. Determination of the antibody titers was conducted on the 21st and 142nd day after injections. The results indicated the high immunogenicity of the antigen, horse Ig G. After one cycle of immunization, the titer of antibodies against horse IgG was 1:100000. Reimmunization of the animal after 6 months allows increasing the antibody titer up to 1:1000000. The content of antibodies in the blood serum of immune pigs remains high for 1.5 years (the titer was 1:100000). Antibodies against the horse IgG received by piglets in utero from the blood stream of their mother presented in titers from 1:1000 to 1:10000 at the age of 5 months and disappeared gradually. By the 10 months the antibody titer reduced to 1:100.

Key words: horse immunoglobulin G, immune response, Svetlogorsk mini-pigs, offspring, biomodel.