

**ОДЕРЖАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ
НОВИХ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО IgM
ЛЮДИНИ**

О.Ю. Галкін, І.В. Ніколаєнко, О.М. Дуган
*Національний технічний університет України "Київський
політехнічний інститут",
Науково-виробнича компанія "Віротест"*

Вступ

Однією з головних задач імунної системи є захист організму від різноманітних інфекцій. Існує ряд факторів природного імунітету, клітинного та гуморального, які відповідають за боротьбу з інфекційними агентами. Імуноглобуліни, які знаходяться у біологічних рідинах організму, є найважливішими ефекторами гуморальної імунної відповіді [1]. IgM-антитіла синтезуються в початковій фазі імунної відповіді. Даному класу імуноглобулінів властива відносно низька спорідненість до антигену, яка не зростає в процесі імунної відповіді, що обмежує їх біологічну активність [2-4]. Визначення у сироватці крові загального IgM проводять для оцінки імунного статусу організму, а специфічних IgM - для діагностики низки інфекційних захворювань, зокрема у випадку TORCH-інфекцій [5-7]. Серед арсеналу реагентів, які застосовуються для визначення IgM, провідне місце належить відповідним специфічним антитілам. Поліклональні сироватки до імуноглобулінів людини мають низку недоліків (неспецифічне зв'язування, перехресна реактивність, недостатня відтворюваність досліджень тощо), які суттєво обмежують їх використання [8-9]. Більш вдалими реагентами у даному випадку є анти-IgM моноклональні антитіла. До переваг останніх можна віднести виключну специфічність, гомогенність та можливість одержання практично необмежених кількостей. Маючи на озброєнні панель МКАТ до імуноглобулінів людини певного класу можливо відібрати високоафінні та спе-

цифічні клони, ті, що дають найкращі результати у певній тест-системі. Відомо, що для розробки будь-якого імуноферментного тест-набору необхідно мати широкий набір відповідних МКАТ, адже, зазвичай, із всієї панелі антитіл лише одне чи декілька виявляють задовільні результати [10-12].

Метою нашої роботи було: вибір схеми імунізації та одержання моноклональних антитіл до IgM людини, вивчення їх властивостей та відбір діагностично значущих МКАТ.

Матеріали і методи дослідження

Одержання МКАТ. Для імунізації мишей лінії Balb/c використовували препарат IgM людини, одержаний за методикою [13]. Імунізацію проводили в подушечки задніх лапок мишей у сумарній дозі 50 - 60 мкг IgM на тварину. Перші дві ін'єкції здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда ("Sigma", США), а третю - без ад'юванта. Імунізація тривала 7 - 8 днів. На третій день після останньої ін'єкції антигену здійснювали гібридизацію лімфоцитів, отриманих з регіонарних лімфатичних вузлів мишей, із клітинами міеломи Sp 2/0. Злиття здійснювали за допомогою поліетиленгліколю 3500 - 3700 ("Sigma", США) за методикою G. Kohler і C. Milstein [14] у модифікації D. Lane [15]. Отримані клони гібридом вирощували на фідері з перитонеальних макрофагів у повному ростовому середовищі [H-Y ("Sigma", США) з 15% ембріональної телячої сироватки (ЕТС, "Sigma", США)] з додаванням середовища НАТ ("Sigma", США). Клітини культивували на 96-лункових планшетах для культур клітин ("Costar", США).

На 10 - 12 день зростаючі клони тестували на IgM людини в непрямому твердофазному імуноферментному аналізі (ТІФА). Позитивними вважали лунки, сигнал у яких у 2 - 3 рази перевищував контроль кон'югату. Гібридами з таких лунок пересажували на 24-лункові планшети з фідером з перитонеальних макрофагів і культивували в повному ростовому середовищу з додаванням середовища НТ ("Sigma", США), розмножували і заморожували в середовищі, що містить 50% сироватки новонароджених телят ("Sigma", США), 43% середовища DMEM ("Sigma", США), 7% диметилсульфоксиду ("Sigma",

США). Відібрані культуральні рідини використовували для визначення специфічності МКАТ, їхнього титру і константи афінності, а також ізотипу. Специфічність МКАТ перевіряли в непрямому ТІФА при тестуванні на IgA, IgG і IgM людини, а також на Fc-фрагменти останніх. Для наступного аналізу відбирали гібридами, що синтезують найбільш специфічні і високоафінні МКАТ, ті які давали позитивну відповідь при тестуванні на IgM людини і їх Fc-фрагменти і не мали перехресних реакцій з іншими класами імуноглобулінів. Відібрані клони гібридом розморожували і клонували кілька разів до повної стабільності за рівнем синтезу антитіл. Клонування здійснювали методом лімітувальних розведень на фідері з перитонеальних макрофагів у повному ростовому середовищу. Скринінг зростаючих клонів гібридом проводили на IgM у непрямому ТІФА.

Гібридами, що стабільно продукували антитіла, розмножували і для одержання асциту вводили мишам, які попередньо були праймовані пристаном ("Sigma", США). МКАТ виділяли з асцитної рідини дворазовим осадженням Na_2SO_4 у концентраціях 18% і 16% вага на об'єм [9]. Отримані в такий спосіб МКАТ використовували для приготування пероксидазних кон'югатів.

Процедура непрямого ТІФА. Сорбцію IgM і Fc-фрагментів проводили у 0,05 М карбонат-бікарбонатном буфері (рН 9,6) протягом ночі при 4 °С в концентрації 5 і 2,5 мкг/мл відповідно. Для відмивання використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), рН 7,2 - 7,4. Планшет інкубували 1 годину при 37 °С і потім відмивали. Для виявлення зв'язаних антитіл використовували кон'югат козячих антитіл до імуноглобулінів миші з пероксидазою хрому (ПХ), який інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз водою. Як субстрат використовували 0,003 % розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буфері, рН 5,0, а як хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). Реакцію зупиняли 2 М сірчаною кислотою. Оптичну щільність при довжині хвилі 450/620 нм вимірювали на спектрофотометрі (Multiskan Ascent 354, TermoLab).

Конкурентний ТІФА. Дану модифікацію аналізу використо-

ували для встановлення епітопної специфічності отриманих МКАТ. IgM людини сорбували в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 5 мкг/мл на 96-лункові планшети для ТІФА. Планшет інкубували протягом ночі при 4 °С та потім двічі відмивали ФСБТ. У всі лунки планшета вносили досліджуваній пероксидазний кон'югат МКАТ. Після чого в лунки різних рядів для конкуренції вносили МКАТ інших клонів у різних концентраціях: починали із 0,4 мг/мл та кожний наступний раз розводили вдвічі. Як контроль використовували різницю значення оптичної густини кон'югату МКАТ та оптичної густини аналізу при конкуренції однойменних МКАТ. Подальшу процедуру проводили як для непрямого ТІФА.

Визначення афінності антитіл. Константу афінності МКАТ визначали методом інгібування за А. Кулаковим [16]. Різні концентрації IgM (від 10^{-9} до 10^{-6} моль/л) змішували із зразками культуральних рідин, що містять МКАТ. Проінкубовані зразки (1 годину при 37°C) переносили в 96-лунковий планшет, попередньо сенсibilізований IgM людини. Далі здійснювали процедуру непрямого ТІФА. Як контроль використовували зразки культуральних рідин, що попередньо не інкубували з IgM.

Визначення ізотипу МКАТ. Ізотип отриманих моноклональних антитіл визначали із використанням стандартного набору для ізотипування ISO-2 ("Sigma", США). Ізотипування проводили за допомогою антигенопосередкованого ТІФА. Для цього в планшет сенсibilізований IgM людини вносили культуральні рідини гібридом у шести повторностях. Ізотип визначали за допомогою моноспецифічних козячих сироваток. Типуючі антитіла виявляли антикозячим пероксидазним кон'югатом ("Sigma", США). Облік результатів проводили відповідно до рекомендацій виробника.

Синтез пероксидазних кон'югатів. Кон'югування МКАТ з пероксидазою хрону проводили у масовому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 методом періодатного окислювання по Р. Tijssen [17] із модифікаціями. Пероксидазу хрону ("Sigma", США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буфері (рН 8,3) до концентрації 15 мг/мл і додавали рівний об'єм водного розчи-

ну періодату натрію із концентрацією 14 мМ. Для окислювання ПХ суміш інкубували 2 години при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М карбонатного буфера (рН 9,2). Суміш переносили в хроматографічну колонку і додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25 ("Fluka", Швейцарія), інкубували 3 години при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємну частину водного розчину NaBH_4 (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хвилин при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH_4 , інкубували 60 хвилин. Отриманий розчин пероксидазного кон'югату МКАТ діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Отримані результати і їх обговорення

У результаті здійсненої гібридизації було отримано більш ніж 1000 клонів гібридом. З метою ефективного відбору клонів супернатанти тестували: на IgM людини для первинного відбору, на Fc-фрагменти для визначення специфічності, а також на IgA та IgG людини для відсіву перехреснореагуючих МКАТ.

При первинному тестуванні після гібридизації антитіла специфічні до IgM людини були виявлені у всіх лунках семи планшетів. З метою виявлення найбільш активних клонів гібридом культуральні рідини при скринінгу розводили в кілька разів, що дозволяло відчутно знизити фоновий сигнал. Таким чином, було відібрано 82 клони, що мали найбільш високі сигнали за результатами ТІФА. Всі відібрані гібридами були кріо-консервовані, а культуральні рідини залишені для подальшого вивчення. Після повторного тестування на IgM людини висока активність МКАТ підтвердилася у 34 клонів гібридом.

Для забезпечення високої специфічності та чутливості МКАТ на наступному етапі перевіряли супернатанти відібраних клонів гібридом на перехресну активність з IgG та IgA людини, а також визначали специфічність МКАТ до Fc- або Fab-області молекули IgM. Аналіз результатів перевірки показав наступне: 15 клонів характеризувалися високими сигнала-

ми при тестуванні на IgM людини і Fc-фрагменти та не виявляли перехресної реактивності з IgG та IgA (клони 111C2, 111D2, 111G9, 112C7, 114C8, 114D12, 114G10, 115D5, 116F8, 116F12, 116A2, 116H6, 116E5, 117B4, 117D9); 10 клонів характеризувалися відносно низькими сигналами як на IgM людини, так і на Fc-фрагменти (клони 111A4, 111C9, 112C5, 112G9, 112H12, 112G11, 113F8, 114B8, 116C4, 117B5); 9 клонів відповідали більш інтенсивно на IgM людини ніж на Fc-фрагменти або засвідчували інтенсивну перехресну реактивність із IgG та IgA (клони 111A5, 112C12, 112B8, 113F3, 113G9, 113H9, 114D5, 115F8, 117C8).

Серед 34 гібридом, відібраних при повторному скринінгу, для подальшої роботи залишили лише 25 клонів, які характеризувалися відносно високими сигналами на IgM людини і Fc-фрагменти і не виявляли перехресної реактивності з IgA та IgG.

Оскільки перед нами стояло завдання розробити універсальну технологію отримання діагностично значущих антивидових МКАТ, то слід було визначити критерії оцінки антитіл, за якими проводити подальшу характеристику та подальший відбір клонів гібридом. Грунтуючись на літературних даних аналіз гібридом здійснювали за наступними ознаками: титром антитіл у культуральній рідині, афінністю моноклональних антитіл та їх ізотипом [8, 18, 19]. Відбір МКАТ за першими двома критеріями - титром та афінністю - мав забезпечити високі показники специфічності та чутливості імуноферментного аналізу із використанням таких антитіл.

При дослідженні ізотипів МКАТ синтезованих 25 отриманими гібридомами були одержані наступні результати: 14 антитіл мали IgG2b ізотип, 6 - IgG1 ізотип, 2 - IgM ізотип, 2 - IgG2a ізотип, а 1 МКАТ (112C5) виявило позитивну реакцію одночасно на IgG2b та IgM ізотипи. Такі результати щодо МКАТ 112C5 можна пояснити присутністю в одній лунці двох клонів гібридом, які продукують антитіла різного ізотипу.

Сукупність одержаних даних - активність у ТІФА, ізотип, титр та константа афінності МКАТ - використовували для остаточного відбору клонів гібридом для їх подальшого розмо-

рожування, клонування, нарощування та накопичення антитіл. Для подальших досліджень не використовували гібридами, що продукують антитіла ізотипу IgM. Крім того, перевагу надавали клонам з високим титром та константою афінності, а також інтенсивним сигналом у непрямому ТІФА. Таким чином, аналіз даних щодо 25 клонів гібридом призвів до того, що для подальших досліджень були відібрані 12 гібридом (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика моноклональних антитіл до IgM людини

№	Назва	Оплична густина у ТІФА*	Ізотип	Титр у КР	Константа афінності K_a , $10^9 \times$ моль/л	Епітоп, до якого спрямовано антитіло
1	111A4	2,324	IgG _{2b}	800	10,0	A1
2	111C2	2,660	IgG _{2b}	1000	10,0	A1
3	111C9	2,785	IgG _{2a}	500	14,0	A1
4	112C5.2	3,201	IgG _{2b}	1000	5,0	A1
5	112G9	2,004	IgG _{2b}	1000	5,0	A2
6	112H12	2,998	IgG ₁	1000	10,0	A2
7	113F8	3,012	IgG _{2b}	800	5,0	A1
8	114B8	2,825	IgG _{2b}	1000	5,0	A2
9	114G10	2,431	IgG ₁	1000	5,0	A3
10	116A2	3,021	IgG _{2b}	800	5,0	A3
11	116C4	3,010	IgG ₁	800	5,0	A2
12	117B5	3,003	IgG _{2b}	800	5,0	A3

Примітка: * тестування у непрямому ТІФА при сорбції IgM людини 0,5 мкг на лунку

Клонування гібридом здійснювали найбільш простим та ефективним способом - методом лімітуючих розведень. Всі клони пройшли по 2 - 3 клонування до майже повної стабільності по рівню синтезу специфічних МКАТ. Так при першому клонуванні гібридом позитивними виявилися від 40 до 60 % лунок. На другому та третьому клонуваннях частка позитивних лунок становила 90 - 100 %. Такий перебіг подій, скоріше за все, пояснюється поступовою загальною стабілізацією геному гібридних клітин після їх кріоконсервування, зокрема розблокуванням генів, які відповідають за синтез імуноглобулінів.

При клонуванні гібридами 112C5 її вдалося розділити на 2

клони (112С5.1 та 112С5.2) із різним сигналу у непрямому ТІФА. Повторне визначення ізотопів даних антитіл показало, що клон 112С5.1 має ізотип IgM, а клон 112С5.2 - ізотип IgG2b. Для подальших досліджень використовували лише клон 112С5.2.

Ізольовані позитивні клони з 96-лункового планшету пересажували на 24-лунковий, гібридами підрожували, заморожували та вводили у асцит мишам Balb/c. На 7 - 10 день у тварин накопичувався асцит, який відбирали. Одна миша у середньому давала до 10 мл асцитичної рідини. Після виділення з асцитичної рідини моноклональні антитіла використовували для синтезу пероксидазних кон'югатів.

Для оцінки можливості використання отриманої панелі МКАТ в ТІФА для діагностики інфекційних захворювань були проведені порівняльні дослідження моноклональних антитіл та їх пероксидазних кон'югатів в ТІФА для визначення антитіл класу IgM до збудника токсоплазмозу *Toxoplasma gondii* (IgM-"пастка") та до цитомегаловірусу людини (ЦМВ) (непрямий варіант ІФА). Дані дослідження проводили паралельно із науковою розробкою відповідних імуноферментних тест-систем на підприємстві Вітротест (Україна). Для цього використовували оціночні панелі сироваток (ОПС), сформовану із зразків сироваток крові, що містять відповідні специфічні антитіла і що не містять відповідних антитіл. Паралельно з перевіркою власних МКАТ та їх кон'югатів проводили тестування МКАТ СН2 (Сорбент, Росія) та пероксидазного кон'югата МКАТ МВ11 (Sigma, США). Результати оцінювали по величині коефіцієнта позитивності - співвідношенню величини оптичної густини досліджуваних сироваток до граничного значення (ОГ/ГЗ). Граничне значення визначали як суму середнього значення негативних сироваток і трьох середньоквадратичних відхилень [20].

За результатами дослідження 12 отриманих нами МКАТ та їх кон'югатів у ТІФА з використанням ОПС по середньому значенню ОГ/ГЗ у порівнянні із референтними антитілами два клони 112С5.2 та 111С2 були значно активнішими у модифікації IgM-"пастки" ТІФА, два клони були активнішим у непрямому ТІФА (112Н12, 116С4).

При дослідженні чутливості ТІФА на анти-*T.gondii* IgM-антитіла з іммобілізованими МКАТ 112С5.2 і 111С2 та ТІФА на анти-ЦМВ IgM-антитіла із кон'югатами 112Н12-*HRP* і 116С4-*HRP* відповідно на панелях стандартизованих охарактеризованих сироваток "Anti-Toxoplasma Mixed Titer Performance Panel РТТ201" (містить антитіла до *T.gondii* в різних концентраціях) та "Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel РТС202" (містить антитіла до цитомегаловірусу людини в різних концентраціях) (Boston Biomedica Inc., США) цей показник склав 100 %.

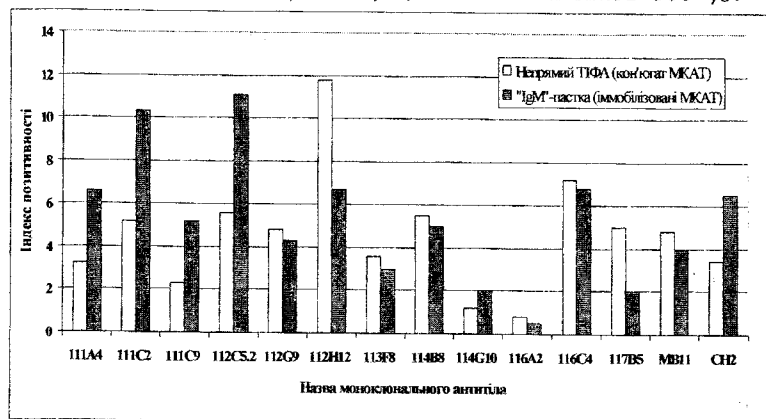


Рис. 1. Результати характеристики МКАТ у ТІФА для виявлення IgM-антитіл

Важливим чинником, що визначає можливість вживання МКАТ та їх пероксидазних кон'югатів у ІФА-тест-системах є стабільність протягом тривалого періоду в процесі зберігання. З цією метою нами була досліджена стабільність імуносорбента з МКАТ 112С5.2 і 111С2 й пероксидазних кон'югатів 112Н12-*HRP* і 116С4-*HRP* в стабілізуючому розчині оригінального складу при зберіганні протягом трьох місяців при температурі 37°C і впродовж 12 місяців при 4°C. МКАТ та їх кон'югати зберігали свою активність в процесі зберігання при температурі 4°C протягом року. Стабільність іммобілізованих МКАТ при 37°C зменшувалася у раді 112С5.2 > 111С2 > СН2 (рис. 2А). Найбільш стабільними виявилися МКАТ 112С5.2,

адже їх активність через 60 днів склала 71% від початкової. Менш активними виявилися МКАТ СН2, які за той же час втратили 44% своєї активності у ІФА. Залишкова активність кон'югатів 112Н12-НRP та МВ11-НRP після зберігання упродовж трьох місяців при температурі 37°C була дещо більш високою, ніж у кон'югата 116С4-НRP (рис. 2Б).

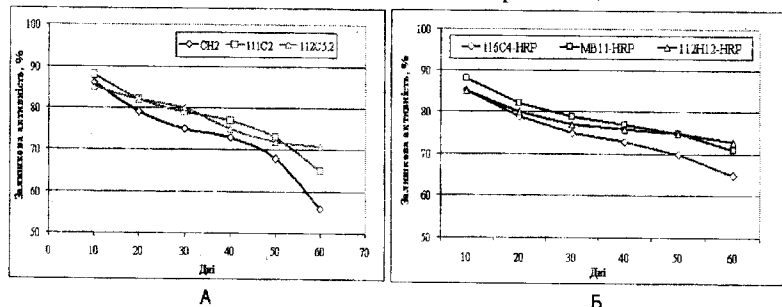


Рис. 2. Дослідження стабільності іммобілізованих МАА 112С5.2, 111С2, СН2 та пероксидазних кон'югатів 112Н12-НRP, МВ11-НRP

Епітопне картування проводили із використанням конкурентного ТІФА. Результати конкуруючого ефекту розраховувались як відсоток зниження активності кон'югату МКАТ у присутності конкуруючого антитіла. У такому варіанті постановки конкурентного ТІФА повне або часткове зниження активності є показником повної або часткової подібності епітопної специфічності досліджуваних моноклональних антитіл. Натомість порівняна із контрольною активність кон'югату МКАТ вказувала на різну із конкуруючим антитілом епітопну специфічність. Таким чином, в результаті проведених досліджень для кожного МКАТ було отримано порівняльний епітопний профіль із 11 варіантів конкуренції із іншими антитілами. Для полегшення аналізу такого великого масиву даних для порівняння профілей використовували кореляційний аналіз за Браве-Пірсаном. Мірою подібності був коефіцієнт кореляції профілів за умови його статистичної достовірності ($p < 0,05$). Високі значення позитивних коефіцієнтів кореляції між профілями ($0,75 \leq r \leq 1,00$) трактувалися як свідчення однакової епітопної спе-

цифічності, менші значення ($0,60 \leq r < 0,75$) вважалися показником перехресних епітопів, а статистично недостовірні коефіцієнти ($r < 0,60$) розцінювалися як доказ незалежних, повністю відмінних епітопів. Проведене епітопне картування моноклональних антитіл свідчить про наявність трьох імунодомінантних епітопів молекули IgM людини, до яких направлені досліджувані клони МКАТ (умовно позначені А1, А2 та А3): 5 антитіл (111А4, 111С2, 111С9, 112С5.2, 113F8) відноситься до епітопу А1, 4 антитіла відноситься до епітопу А2 та 3 антитіла (114G10, 116А2, 117В5) відноситься до епітопу А3. Слід зазначити, що між моноклональними антитілами епітопів А1 та А3, а також А2 та А3 спостерігається виражена перехресна реактивність (середні коефіцієнти складають 0,79 та 0,70, відповідно). У той же час між МКАТ епітопів А1 та А2 перехресна реактивність менш виражена (середній коефіцієнт - 0,46). Отримані дані свідчать про просторову близькість епітопів А1, А2 та А3.

Висновки

1. Отримано оригінальний набір з 12 клонів гібридом, продуцентів високоафінних і специфічних моноклональних антитіл до IgM людини, а також пероксидазних кон'югатів на їхній основі.
2. Запропоновано універсальну технологію отримання діагностично значущих антивидових МКАТ. Критеріями відбору таких антитіл визначено титр у культуральній рідині (більше 1/500), афінність (більше $5 \cdot 10^9$ моль/л) та їх ізотип (лише ізоטיפи IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3).
3. При регіонарній імунній відповіді для мишей лінії Balb/c імунодомінантною виявилася один епітопний район молекули IgM людини, що підтверджується близькою епітопною специфічністю одержаних МКАТ.
4. Доведена можливість використання отриманих МКАТ та їх пероксидазних кон'югатів у двох модифікаціях ТІФА (IgM-"пастка" та непрямий варіант) для виявлення специфічних антитіл класу IgM.

Література

1. Якобсяк М. Імунологія / М. Якобсяк ; пер. з польськ. за ред. проф. В.В.Чоп'як. - Вінниця: Нова книга, 2004. - 672 с.
2. Ройт А. Иммунология / А.Ройт, Дж.Бростофф, Д.Мейл. - М.: Мир, 2000. - 592 с.
3. Структура и функции антител / под ред. Л.Глин, М. Стьюард. ; пер. с англ. - М.: Мир, 1983. - 380 с.
4. Иммунология. Т.1 / под ред. У.Пола ; пер. с англ. - М.: Мир, 1987. - С. 204 - 254.
5. Материалы 1-ой международной научно-практической конференции "Специфическая диагностика инфекционных болезней" (20 - 21 января 2004 г., г. Киев) / под ред. Е.Г. Бочкарева, Л.Л. Громашевской, А.Л. Гуралья. - Киев, 2004. - 120 с.
6. Варшигора А.Ю. Імунологія / А.Ю.Варшигора. - Київ: Вища школа, 2005. - 736 с.
7. Принципи, особливості та застосування гібридомної технології / І.В.Ніколаєнко, Л.М.Шинкаренко, О.Ю.Галкін [та ін.] // Імунологія та алергологія. - 2003. - № 4. - С. 7-17.
8. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice / J.Goding. - San Diego: Academic press, 1996. - 492 p.
9. Harlow E. Antibodies. A laboratory manual / E.Harlow, D.Lane. - N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1988. - 726 p.
10. Одержання нових моноклональних антитіл до імуноглобулінів людини класу G, придатних для використання у діагностиці інфекційних захворювань // О.Ю.Галкін, І.В.Ніколаєнко, Г.Є.Раєвська [та ін.] // Мікробіологічний журнал. - 2005. - Т. 67, № 6. - С. 40 - 48.
11. Новые моноклональные антитела к HBs-антигену / И.В.Николаенко, Г.Е.Раевская, И.Г.Костенко [и др.] // Вирусный гепатит В - диагностика, лечение и профилактика (к 40-летию открытия HBsAg) : Российская научно-практическая конференция с международным участием, 19 - 20 мая 2004 г. : тезисы докладов. - М.: Гепатитинфо, 2004. - С. 131 - 132.
12. Johnstone A. Immunochemistry in practice / A.Johnstone,

- R.Thorpe. Oxford: Blackwell, 1982. - 380 p.
13. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis / I.V.Nikolayenko, O.Yu.Galkin, N.S.Grabchenko [e.a.] // Ukrainica Bioorganica Acta. - 2005. - Vol. 2, № 2. - P. 3 - 11.
 14. Kohler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G.Kohler, C.Milstein // Nature. - 1975. - Vol. 256. - P. 495 - 497.
 15. Lane D. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies / D.Lane, H.Koprowski // Nature. - 1982. - Vol. 296. - P. 200 - 202.
 16. Изучение аффинности естественных антител сыворотки крови человека к компоненту клеточной стенки бактерий - глюкозамилмураמידпептиду, обладающей адъювантной активностью / А.В.Кулаков, С.В.Климова, Д.А.Ярилин [и др.] // Иммунология. - 1997. - № 1. - С. 21 - 24.
 17. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P.Tijssen // Lab. Techiques in Biochem. and Molecular Biology. - 1985. - Vol. 15. - P. 674.
 18. Моноклональные антитела к подклассам IgG человека: получение и исследование специфичности / В.Б.Климович, М.П.Самойловим, И.Ю.Крутецкая [и др.] // Иммунология. - 1998. - № 3. - С. 27 - 31.
 19. Evaluation of thirty-one mouse monoclonal antibodies to human IgG epitopes / C.Reimer, D.Phillips, C.Aloisio [e.a.] // Hybridoma. - 1984. - Vol. 3, № 3. - P. 263 - 275.
 20. Пособие по лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции / СПИДа / В.Н.Гирин, И.В.Дзюблик, В.Г.Порохницький, А.Л.Гураль [и др.]. - Киев: Медпроминфо, 1999. - 140 с.

Резюме

Галкін О.Ю., Ніколаєнко І.В., Дуган О.М. Одержання та вивчення властивостей нових моноклональних антитіл до IgM людини.

Одержано оригінальний набір з 12 клонів гібридом, продуцентів моноклональних антитіл (МКАТ) до IgM людини. Проведено поглиблене вивчення біологічних властивостей антитіл: встановлено їх специфічність, константу афінності та титр у культуральній рідині, а також здійснено порівняльну епітопну характеристику найактивніших

МКАТ. Порівняно вивчена можливість використання отриманих МКАТ у складі імуноферментних тест-систем для виявлення IgM-антитіл до *Toxoplasma gondii* і до цитомегаловірусу людини.

Ключові слова: моноклональні антитіла, гібридоми, імуноглобуліни, діагностика, афінність, епітопне картування.

Резюме

Галкин А.Ю., Николаенко И.В., Дуган А.М. *Получение и изучение свойств новых моноклональных антител к IgM человека.*

Получен оригинальный набор из 12 клонов гибридом, продуцентов моноклональных антител (МКАТ) к IgM человека. Проведено углубленное изучение биологических свойств антител: установлена их специфичность, константа аффинности и титр, в культуральной жидкости, а также осуществлена сравнительная эпитопная характеристика МКАТ. Сравнительно изучена возможность использования полученных МКАТ в составе иммуноферментных тест-систем для выявления IgM-антител к *Toxoplasma gondii* и к цитомегаловирусу человека.

Ключевые слова: моноклональные антитела, гибридомы, диагностика, иммуноглобулины, диагностика, аффинность, эпитопное картирование.

Summary

Galkin O.Ju., Nikolaenko I.V., Dugan O.M. *Obtaining and study of properties of new monoclonal antibodies against human IgM.*

The original set from 12 clones of hybridomas, producers of monoclonal antibodies (MCAB) against human IgM has been obtained. The study of biological properties of antibodies is conducted: their specificity, constant of affinity and titer in a cultural medium, and also comparative epitop description of more active MCABs has been carried out. The possibility of using of obtained MCAB as the part of ELISA tests systems for detection of IgM-antibodies against *Toxoplasma gondii* and human cytomegalovirus has been rather studied.

Key words: monoclonal antibodies, hybridomas, diagnostics, immunoglobulines, diagnostics, affinity, epitop mapping.

Рецензент: д.мед.н., проф. І.В. Лоскутова

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ МАКРОФАГАЛЬНОЇ ФАГОЦИТУЮЧОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ НЕКАЛЬКУЛЬОЗНИЙ ХОЛЕЦИСТИТ НА ТЛІ ОЖИРІННЯ ТА ВТОРИННИХ ІМУНОДЕФІЦИТНИХ СТАНІВ В ПЕРІОДІ МЕДИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ З ВКЛЮЧЕННЯМ ЦИНАРІКСУ

Л.В.Львова

Луганський державний медичний університет

Вступ

За останні десятиріччя в Україні та інших країнах СНД суттєво зросла захворюваність на хронічну патологію жовчовивідних шляхів (ЖВШ), насамперед на хронічний некалькульозний холецистит (ХНХ), особливо серед осіб молодого, найбільш працездатного віку [9]. Захворюваність на хронічну патологію ЖВШ в індустріальних регіонах України, зокрема в Донбасі, характеризується стабільно високими показниками, що пов'язують з несприятливим впливом на гепатобіліарну (ГБС) та імунну системи мешканців цих регіонів екологічно шкідливих факторів довкілля, особливо ксенобіотиків, що містяться у відходах великих промислових підприємств [1]. Встановлено, що в таких умовах ХНХ нерідко має тривалий перебіг, з частими загостреннями та недостатньою ефективністю загальноприйнятого лікування та медичної реабілітації [2,15,16], що в теперішній час пов'язують з наявністю у таких хворих вторинних імунодефіцитних станів (ВІДС) [1,12]. Частото перебіг хронічної патології гепатобіліарної системи (ГБС), зокрема запальні процеси ЖМ у вигляді хронічного некалькульозного холециститу (ХНХ), внаслідок розвитку метаболічного синдрому супроводжуються ожирінням [10], яке багато дослідників вважають пандемією ХХІ сторіччя [14].