

УДК 616-097.616-07:616.995.122(045)

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА В ДИАГНОСТИКЕ ОПИСТОРХОЗА

Булашев А.К., Серикова Ш.С., С.З. Ескендинова¹

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, ул. Алтынсарина, 2, Астана, 010011, Казахстан

¹Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Уалиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан

aytbay57@mail.ru

АБСТРАКТ

Заболееваемость людей в Казахстане описторхозом является одной из самых высоких среди стран СНГ. В системе мер борьбы с этой инвазией главная роль отводится своевременной диагностике. Эффективность существующих методов диагностики описторхоза довольно низка. Определенную перспективу имеют диагностические тест-системы, разработанные на основе одного из высокочувствительных иммунологических тестов - ИФА. Наиболее подходящим антигеном при серодиагностике описторхоза являются экскреторно-секреторные антигены. К сожалению, тесты, основанные на использовании данного антигена, малопрактичны, так как имеются большие трудности в получении стандартизированного метаболита паразита. В этой связи представляет большой интерес использование «внутреннего образа» антигена, т.е. антиидиотипических антител (АИАТ) против *Fab*-фрагментов антител, специфичных к эпитопам антигена.

Целью настоящей работы явилось получение антител к идиотипам моноклональных антител, имеющих специфичность к эпитопу антигена *Opisthorchis felineus*, и определение возможности использования антиидиотипов в качестве антигена при серологических исследованиях на описторхоз. Для получения антиидиотипов были использованы моноклональные антитела гибридомы 4B3D9 против антигена описторхиса. Методом гибридомной техники созданы штаммы двух гибридом с авторскими названиями 3H10A4 и 4H10D8, стабильно продуцирующие АИАТ, представляющие собой «внутренний образ» антигена возбудителя описторхоза. Антиидиотипы, продуцируемые указанными гибридомами, относились соответственно к иммуноглобулину класса *IgG1* и *IgM*, характеризовались достаточной аффинностью по отношению к использованному иммуногену. Как следовало ожидать, антиидиотипы обеих гибридом при испытании в сэндвич ИФА распознавались антителами собаки, инвазированной описторхисом, как специфический антиген гельминта. Результаты исследований свидетельствуют о возможности использования АИАТ в качестве антигена при разработке иммунологических тестов для диагностики описторхоза.

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

ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES IN DIAGNOSIS OF OPISTHORCHIASIS

Bulashev A.K., Serikova Sh.S., Eskendirova S.Z.¹

S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, 2 Altynsarina str. Astana, 010011, Kazakhstan

¹ National Center for Biotechnology, 13/1 Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

aytbay57@mail.ru

ABSTRACT

The incidence of people with Opisthorchiasis in Kazakhstan is one of the highest among the CIS countries. In the disease control system the main role is given to the early diagnosis. Effectiveness of the existing diagnostic methods for Opisthorchiasis is rather low. Nowadays diagnostic test-systems developed on the basis of ELISA have promising outlook. Most suitable antigen for serological diagnosing Opisthorchiasis is excretory-secretory antigen (ES-AG). Unfortunately, immunoassays based on the use of this antigen are not enough practical because there are great difficulties in obtaining standardized metabolite of parasite. In this regard, the great interest is the using antigen's "internal image", i.e. anti-idiotypic antibodies (AIAT) against *Fab*-fragments that are specific to definite epitopes.

The aim of research was to obtain antibodies to idiotypes of monoclonal antibodies (Mab) specific for *Opisthorchis felineus* ES-AG epitope and to determine the possibility of using anti-idiotypes as an antigen in ELISA for serological diagnosis of Opisthorchiasis.

Mab 4B3D9 against helminth's antigen have been used as immunogen for obtaining AIAT. Two hybrid strains designated as 3H10A4 and 4H10D8 producing anti-idiotypes with "internal image" of *Opisthorchis felineus*' antigen were created by hybridoma technique. Anti-idiotypes produced by hybridomas belonged to IgG1 and IgM, characterized by sufficient affinity with respect to the used immunogen. As expected, in sandwich immunoassay AIAT of both hybridomas, mimicking ES-AG epitope, were recognized by antibodies of dog, infested with parasite. The results of research suggest the possibility of using anti-idiotypes of hybridomas as specific antigen in the development of immunoassays for the diagnosis of Opisthorchiasis.

Keywords: opisthorchiasis, diagnostics, excretory-secretory antigen, ELISA, hybridoma, monoclonal antibodies, anti-idiotypic antibodies.

ВВЕДЕНИЕ

Описторхоз - природно-очаговое заболевание млекопитающих, преимущественно собак, кошек, пушных зверей, а также человека, вызываемое трематодой *Opisthorchis felineus*, паразитирующей в желчных ходах печени, желчном пузыре и реже в протоках поджелудочной железы. Промежуточный хозяин – пресноводный моллюск *Bithynia leachi*, дополнительные – многие виды карповых рыб: плотва, линь, язь, карп, лещ, вобла, сазан, чебак и др. Заражение человека, кошек, собак, лисиц, песцов и некоторых других плотоядных животных (окончательных хозяев данного паразита) происходит при употреблении в пищу рыбы, инвазированной личинками описторхисов [1]. В мире насчитывается около 45 млн. человек, инфицированных *Opisthorchis felineus* и другими печеночными трематодами (*Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis*), которые вызывают сходные по клинике и патогенезу заболевания [2]. Выявлена также связь описторхоза с возникновением опухолей гепатобилиарной системы [3, 4, 5]. Установлено, что распространенность холангиокарциномы в 10-15 раз выше в тех районах Западной Сибири, где наибольший процент населения страдает от этого гельминтоза [6]. Международным агентством по исследованию рака возбудитель описторхоза отнесен к канцерогенам человека первой группы. Самый крупный и напряженный очаг описторхоза в мире — Обь-Иртышский, охватывающий 10 краев и областей России и Казахстана [7, 8]. Заболеваемость людей в Казахстане этой инвазией является одной из самых высоких среди стран СНГ. Эффективность лечения в первую очередь зависит от срока болезни. Следовательно, для результативной борьбы с этой антропоозоонозной инвазией, имеющей социальную и экономическую значимость, нужны высокочувствительные методы, позволяющие диагностировать описторхоз на всех стадиях болезни и отвечающие современным международным требованиям.

Основным методом диагностики описторхоза остается паразитологические исследования, а именно: исследование дуоденального сока и копроскопия с целью обнаружения яиц гельминта в фекалиях. Тем не менее, эти методы могут оказаться недостаточными для достоверного исключения описторхоза. Отсутствие яиц *Opisthorchis felineus* в образцах, взятых у больных пациентов, может быть обусловлено ранней стадией заболевания, когда еще отсутствуют половозрелая форма описторхиса, цикличностью яйцекладки паразита, неравномерным распределением его яиц по содержимому толстой кишки, слабой степенью инвазии и, следовательно, низкой вероятностью обнаружения яиц гельминта.

Диагноз на описторхоз может быть поставлен и на основании серологических реакций, таких как РИД и РНГА. Эти тесты обладают информативностью на ранней стадии заболевания, т.е. до начала выделения яиц паразитом и менее эффективны при хронических стадиях болезни. Кроме того, они трудоемки и малоприспособлены для проведения массового скрининг-анализа. С этой точки зрения, большой практический интерес представляют диагностические тест-системы, разработанные на основе одного из высокочувствительных

иммунологических методов – иммуноферментного анализа (ИФА). В предыдущих исследованиях нами был разработан ИФА-тест и испытана его диагностическая ценность в сравнении с ее коммерческим зарубежным аналогом (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). В обеих тест-системах полистироловая панель для ИФА сенсibilизируется экскреторно-секреторными антигенами (ЭС-АГ) *Opisthorchis felineus*. В нашем диагностикуме ЭС-АГ паразита, полученные нами по ранее разработанному методу [9], были иммобилизованы к твердой фазе носителя с помощью моноклональных антител (МКА), синтезируемых штаммом гибридомы *4B3D9* и имеющих специфичность к эпитопу белка с молекулярной массой 28 КД [10]. Сравнимые диагностикумы показали однозначные результаты при исследовании проб сывороток крови, взятых от людей с подтвержденным диагнозом на описторхоз [11]. К сожалению, эти тест-системы малопрактичны, так как имеются большие трудности в получении антигенов гельминта, необходимого для комплектации диагностических наборов. Например, наработка антигена *Opisthorchis felineus* предусматривает выполнение следующих видов работ, таких как отлов рыб; определение индивидуумов, зараженных личинками - метацеркариями; инвазирование собак, хомяков или других лабораторных животных; забой животных с целью изолирования половозрелого паразита; культивирование гельминта в лабораторных условиях для аккумуляции продуктов метаболита и очистка ЭС-АГ. Многостадийность приготовления препарата, отсутствие единых стандартизированных антигенов снижает практическую привлекательность вышеназванных ИФА-тестов в диагностике описторхоза. В этой связи, представляет большой интерес использование «внутреннего образа» антигенов, т.е. антиидиотипических антител (АИАТ) против *Fab*-фрагментов МКА, специфичных к эпитопам ЭС-АГ.

Целью настоящей работы явилось получение антител к идиотипам МКА штамма гибридомы *4B3D9* и определение возможности использования АИАТ в качестве антигена в ИФА при серологических исследованиях на описторхоз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие биологические и химические препараты: штамм гибридных культивируемых клеток с авторским названием *4B3D9*; *Fab*-фрагмент МКА штамма *4B3D9*, имеющие специфичность к эпитопу ЭС-АГ *Opisthorchis felineus*; коллоидное золото (~ 0.01% $HAuCl_4$, ~ 1A520 ед./мл, монодисперсные частицы, размер 20 нм, *Sigma*); гидрохлорид 1-этил 3-(3-диметиламинопропил) карбодииимид - EDC (*Sigma-Aidrich*); сыворотка крови (поликлональные антитела) собаки, инвазированной возбудителем описторхоза; *IgG-Free, Protease-Free* бычий сывороточный альбумин - БСА (*Jackson Immuno Research*); 2-меркаптоэтанол (*Ferak*); неполный адьювант Фрейнда (*Sigma*); среда RPMI 1640 (*Sigma*); гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансфераза; миеломная линия клеток X63Ag8; *Hepes* (*Sigma*); раствор ПЭГ 4000 с 10% содержанием диметилсульфоксида (*Fluka*); пируват натрия (*Sigma*); L-глутамин (*Sigma*); Кумасси G-250; этиловый спирт 96%; сыворотка плода коровы (Hy Clon); пристан - 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (*Fluca*); реактивы для проведения ИФА; 1%-ный агар (*Difco*).

Из лабораторных животных были использованы мыши линии *BALB/c* и беспородные. При проведении исследований использована гибридная техника получения МКА, а также серологические, иммунохимические и статистические методы.

Для получения иммуногена *Fab*-фрагмент МКА *4B3D9*, имеющие специфичность к эпитопу ЭС-АГ *Opisthorchis felineus*, конъюгировали с коллоидным золотом [12]. Мыши линии *BALB/c* были иммунизированы по следующей схеме: в первый день иммунизации животным инъецирован внутрибрюшинно антиген - *Fab*-фрагмент МКА *4B3D9*, конъюгированные коллоидным золотом, в дозе по 100 мкг в 0,1 мл неполного адьюванта Фрейнда. Затем на 7, 11, 12, 13 дни мышам вводили по 100 мкг антигена в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), рН 7,2-7,4. Аналогичная схема была использована и при

иммунизации лабораторных животных цельной молекулой МКА. Через 3 дня после последней иммунизации отбирали кровь у мышей из хвостовой вены в микроцентрифужные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин., а затем сыворотку крови переносили в чистую пробирку.

Титр сывороточных антител к идиотипу МКА определяли в ИФА по общепринятой методике. Титрацию образцов сыворотки крови, отобранных у иммунных мышей, проводили в ЗФР с твином-20, начиная с разведения 1:100. Иммунный комплекс «*Fab*-фрагмент МКА + АИАТ» выявляли с помощью антимышинных антител, меченных пероксидазой хрена с использованием его субстрата – тетраметилбензидина. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света при длине волны 450 нм.

Слияние клеток проводили по общепринятой методике [13]. При этом количество миеломных клеток составляло 1×10^6 , а число иммунных спленоцитов находилось в пределах 5×10^6 , т.е. соотношение клеток было равно 1:5. В качестве сливающего агента использовали 50% раствор ПЭГ с молекулярной массой 4000.

Тестирование клонов на продукцию АИАТ к *Fab*-фрагменту антител штамма 4B3D9 осуществляли с помощью непрямого ИФА, клонирование положительных гибридом – методом лимитирующих разведений. Нарботка препаративного количества МКА производилась в брюшной полости сингенных мышей, предварительно обработанных пристаном путем введения 0,5 млн. клеток клонов-продуцентов антител. По мере образования опухоли из брюшной полости осуществляли отбор асцитной жидкости. АИАТ очищались методом гель-фильтрации, константа связывания антител определялась в ИФА [14], класс и подкласс иммуноглобулинов - методом иммунодиффузии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор нами наночастиц коллоидного золота для приготовления конъюгата с *Fab*-фрагментом МКА 4B3D9 объясняется тем, что в отличие от других известных носителей оно не вызывает антителообразование или аллергические реакции и обладает более выраженными иммуномодулирующими свойствами. По мнению исследователей, золото сохраняет состав прикрепленных к нему молекул, а значит способно в неизменном виде «представить» их клеткам, ответственным за иммунитет [15, 16].

Результаты серологических исследований проб сывороток крови мышей, иммунизированных антителами, имеющими специфичность к эпитопу ЭС-АГ *Opisthorchis felineus*, показали весьма высокую эффективность использованной схемы (таблица 1).

Таблица 1 – Титры поликлональных АИАТ в сыворотке крови иммунизированных мышей по результатам ИФА

Table 1 - The titers of polyclonal AIAT in serum of immunized mice by ELISA

Группа животных Group of animals	Номер животных Ordinal number of animals	Вид иммуногена Type of immunogen	Титр антител в сыворотке крови Antibody titer in serum	Количество выделенных спленоцитов Number of isolated splenocytes
Первая The first group	1	Цельная молекула МКА, специфичные к эпитопу ЭС-Аг <i>Opisthorchis felineus</i>	1:800	9×10^6
	2		1:1 600	4×10^6
	3	Whole molecule of MAb specific for an epitope of <i>Opisthorchis felineus</i> ES-Ag	1:800	5×10^6
Вторая	1	Fab-фрагменты МКА,	1:12 800	8×10^6

The second group	2	специфичные к эпитопу ЭС-АГ <i>Opisthorhis felineus</i> , меченные коллоидным золотом	1:12 800	10x10 ⁶
	3	Fab-fragments of the MAb specific for an epitope of <i>Opisthorhis felineus</i> ES-Ag, conjugated with colloidal gold	1:6 400	7x10 ⁶

Примечание - Образцы сывороток крови от каждой головы исследовались в пяти повторах. Приведены преобладающие титры

Note - Samples of blood serum from each mouse were investigated in five replicates. The table shows the prevailing titres

Как видно из таблицы 1, путем пятикратного инъектирования иммуногена, состоящего из цельной молекулы антител или их антигенсвязывающих фрагментов, достигнуто накопление в организме мышей весьма высокой концентрации антител, имеющих сродство к идиотипу МКА против ЭС-АГ возбудителя описторхоза. Причем, наиболее иммуногенными оказались *Fab*-фрагменты антител, меченные коллоидным золотом. Например, титры АИАТ в сыворотке крови мышей, иммунизированных цельной молекулой МКА, находились в пределах 1:800 – 1:1 600, тогда как у их аналогов, инъектированных антигенсвязывающими фрагментами иммуноглобулинов, специфические антитела обнаруживались до разведения сыворотки 1:6 400 - 1:12 800.

Первая гибридизация проводилась с использованием иммунных лимфоцитов мыши №1 из второй группы, взятых непосредственно перед слиянием клеток, а для второго слияния были использованы замороженные спленоциты мыши №2 первой группы (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты гибридизации спленоцитов с миеломной клеткой миеломной линии X₆₃ – Ag 8.653

Table 2 - Results of lymphocytes hybridization with myeloma line X63 - Ag 8.653

Гибридизация Hybridization	Количество засеянных лунок Number of inoculated wells	Количество образованных клонов Number of formed clones	Процент слияния клеток Cell fusion percentage	Выход активных клонов Active clone output		Титр МКА в супернатанте Mab titer in the supernatant
				n	%	
Первая The first	384	163	42,7	17	10,7	1:2-1:16
Вторая The second	384	129	33,8	11	8,46	1:2-1:16

Из таблицы 2 следует, что наилучший результат слияния клеток отмечен при первом слиянии, в котором были использованы спленоциты мышей, иммунизированных конъюгатом *Fab*-фрагмента МКА с коллоидным золотом. Так, максимальный рост гибридом наблюдался в 163 лунках из 384 засеянных, т.е. процент слияния клеток был сравнительно высок (42,7%). В случае второй гибридизации, в которой были использованы спленоциты мышей, иммунизированных цельной молекулой МКА, данный показатель был равен 33,8%, т.е. обнаружен рост 129 клонов в 384 засеянных лунках.

Результаты исследований образцов культуральной жидкости гибридом в ИФА на наличие АИАТ к идиотипу *Fab*-фрагмента МКА показали антительную активность у 17

клонов из 163 образовавшихся гибридом, что составляет 10,7%. Среди клонов второй гибридизации антиидиотипы в образцах супернатанта были определены у 11 клонов из 129 (8,46%). Антитела в культуральной жидкости всех 28 гибридом при первичном тестировании обнаруживались в титрах от 1:2 до 1:16. Таким образом, выход позитивных клонов из общего числа полученных гибридом находился в пределах 8,46-10,7%, что свидетельствует о достаточном иммунном фоне пула В-лимфоцитов.

В целях отбора клонов, стабильно продуцирующих АИАТ, активность гибридных клеток была проверена пять раз в ИФА с интервалом в 3–4 дня. На 6-7 день после первичного тестирования клоны были переведены в 24-луночные планшеты для микрокультивирования.

Продукция антител вышеупомянутыми 28 клонами, положительными по отношению к идиотипу *Fab*-фрагмента МКА, наблюдалась в течение первых двух тестирований. При третьем скрининге 7, или 25%, клонов потеряли способность к синтезу антител, а при четвертом и пятом тестированиях только 2 клон (*3H10* и *4H10*) сохранили продукцию АИАТ к идиотипам МКА, имеющим специфичность к эпитопам ЭС-АГ возбудителя описторхоза, с максимальными титрами антител в супернатанте 1:8 – 1:16.

Для отбора генетически гомогенных линий гибридом было проведено клонирование и реклонирование гибридом *3H10* и *4H10* методом лимитирующих разведений. Все субклоны гибридом проявляли антительную активность по отношению к идиотипам МКА *4B3D9*. Для дальнейшей работы были отобраны субклоны с авторскими названиями *3H10A4* и *4H10D8*. Титры АИАТ в супернатанте обеих гибридом, культивируемых в матрасах при покрытии ими более 50% поверхности посуды, достигали 1:8-1:16.

Для наработки антиидиотипов в препаративном количестве проводили накопление клеток гибридом *3H10A4* и *4H10D8* в условиях *in vitro*. В таблице 3 приведены некоторые свойства АИАТ, синтезируемых клонами двух гибридом.

Таблица 3 – Характеристика клонов гибридом *3H10A4* и *4H10D8*

Table 3 - Characteristics of hybridomas *3H10A4* and *4H10D8*

Клон Clone	Константа связывание АИАТ A ₁ ab affinity	Изотип АИАТ A ₁ ab isotype	Синтез АИАТ <i>in vitro</i> , мг/мл A ₁ ab synthesis <i>in vitro</i> , mg/ml	Синтез АИАТ <i>in vivo</i> , мг/мл A ₁ ab synthesis <i>in vivo</i> , mg/ml	Титр АИАТ <i>in vitro</i> A ₁ ab titer <i>in vitro</i>	Титр АИАТ <i>in vivo</i> A ₁ ab titer <i>in vivo</i>
<i>3H10A4</i>	2,0x10 ⁻⁹ М	IgG1	0,06	4,0	1:16	1:1 600
<i>4H10D8</i>	2,6x10 ⁻⁹ М	IgM	0,03	4,0	1:8	1:800
Примечание – Образцы культуральной и асцитной жидкости исследовались в ИФА в пяти повторах. Приведены преобладающие титры Note - Samples of the culture fluid and ascites were investigated by ELISA in five replicates. The table shows the prevailing titres						

Результаты исследований показали, что антиидиотипы, синтезируемые клетками клонов *3H10A4*, принадлежат классу IgG1, и *4H10D8* принадлежат классу IgM и имеют константу связывания (аффинность) по отношению к паратомам МКА гибридомы *4B3D9*, равную 2,0x10⁻⁹М и 2,6x10⁻⁹М соответственно. Как видно из таблицы 3, клоны гибридом в *in vitro* и *in vivo* характеризовались удовлетворительной продуктивностью. Культивирование гибридом в брюшной полости мышей позволило получить асцитную жидкость с титрами антител 1:800-1:1600. Приведенные иммунохимические свойства антиидиотипов клонов *3H10A4* и *4H10D8*

показывают, что антитела обеих гибридом представляют собой иммуноглобулины класса *IgG1* и *IgM* соответственно, имеющие удовлетворительную константу связывания с *Opisthorhis felineus*-специфичными идиотипами, и, следовательно, представляют собой «внутренний образ» ЭС-АГ описторхиса.

Антигенная активность АИАТ была испытана в «сэндвич» ИФА. Для этого ячейки 96-луночного планшета для иммунологических реакций сенсibilизировали поликлональными антителами собаки, инвазированной возбудителем описторхоза, в концентрации 10 мкг/мл при 4С в течение ночи. Активные центры полистироловой лунки нейтрализовали БСА. Затем в лунки вносили образцы асцитной жидкости, содержащей антиидиотипы гибридом *3H10A4* и *4H10D8* против антигенсвязывающего участка МКА *4B3D9*. Наличие иммунного комплекса выявляли с помощью антимишинного конъюгата. В качестве контроля были использованы лунки, сенсibilизированные ЭС-АГ гельминта (таблица 4).

Таблица 4 – Антигенность АИАТ, специфичных к паратопу Fab-фрагмента МКА 4B3D9

Table 4 - The antigenicity of A lab specific to Fab-fragment's paratope of Mab 4B3D9

Номера лунок, сенсibilизированных собачьими поликлональными антителами против метацеркариев <i>Opisthorhis felineus</i> Ordinal numbers of wells sensitized with canine polyclonal antibodies against <i>Opisthorhis felineus</i>								Номера лунок, сенсibilизированных ЭС-АГ <i>Opisthorhis felineus</i> Ordinal numbers of wells sensitized with <i>Opisthorhis felineus</i> ES-Ag			
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4
Показатели оптической плотности жидкости в лунках с АИАТ <i>3H10A4</i> <i>Optical density of the liquid in the wells with A lab 3H10A4</i>											
0,576 ± 0,060	0,593 ± 0,052	0,287 ± 0,030	0,409 ± 0,036	0,406 ± 0,047	0,467 ± 0,040	0,339 ± 0,045	0,294 ± 0,034	0,038 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,036 ± 0,003	0,039 ± 0,002
Средняя величина <i>Intermediate index: 0,421±0,040</i>								0,037±0,002			
Показатели оптической плотности жидкости в лунках с АИАТ <i>4H10D8</i> <i>Optical density of the liquid in the wells with A lab 4H10D8</i>											
0,486 ± 0,050	0,56 ± 0,045	0,307 ± 0,047	0,425 ± 0,03	0,418 ± 0,03	0,409 ± 0,04	0,374 ± 0,03	0,285 ± 0,004	0,037 ± 0,002	0,045 ± 0,0032	0,037 ± 0,004	0,039 ± 0,003
Средняя величина <i>Intermediate index: 0,405±0,037</i>								0,036±0,003			

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что поликлональные антитела собаки, иммунизированной ЭС-АГ гельминта, вступают во взаимодействие с антиидиотипами обеих гибридом. Результаты ИФА показали, что антиидиотипы, имея специфичность к паратопу Fab-фрагмента МКА *4B3D9*, распознаются поликлональными антителами как антиген возбудителя описторхоза.

В следующей постановке «сэндвич» ИФА асцитная жидкость, содержащая антиидиотипы, была раститрована в восьми лунках, сенсibilизированных поликлональными антителами против описторхисов, начиная с разведения 1:100 и выше. Контрольные лунки были покрыты иммуноглобулинами интактной собаки. Реакцию считали положительной, если значение оптической плотности лунки, сенсibilизированной поликлональными антителами, превышало максимальный показатель контрольных лунок в два и более раза (таблица 5).

Таблица 5 - Растировка АИАТ в лунках, сенсibilизированных поликлональными антителами против *Opisthorhis felineus*

Table 5 - Titration of A lab in wells coated with anti- *Opisthorhis felineus* polyclonal antibodies

Номера лунок, сенсibilизированных собачьими поликлональными антителами против метацеркариев гельминта Ordinal numbers of wells sensitized with canine polyclonal antibodies against <i>Opisthorhis felineus</i>								Номера лунок, сенсibilизированных иммуноглобулинами интактной собаки (контрольные лунки) Ordinal numbers of wells coated with immunoglobulins of the intact dog (control wells)			
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4
Titer of ascites fluid, 1: n											
100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	100	200	400	800
Показатели оптической плотности жидкости в лунках с АИАТ 3Н10А4 Optical density of the liquid in the wells with A lab 3Н10А4											
0,481 ± 0,050	0,187 ± 0,020	0,127 ± 0,010	0,103 ± 0,007	0,66 ± 0,005	0,058 ± 0,004	0,053 ± 0,005	0,068 ± 0,006	0,050 ± 0,005	0,051 ± 0,006	0,047 ± 0,004	0,047 ± 0,005
Показатели оптической плотности жидкости в лунках с АИАТ 4Н10D8 Optical density of the liquid in the wells with A lab 4Н10D8											
0,490 ± 0,054	0,300 ± 0,032	0,250 ± 0,019	0,210 ± 0,010	0,101 ± 0,009	0,060 ± 0,005	0,055 ± 0,004	0,060 ± 0,007	0,080 ± 0,009	0,075 ± 0,008	0,055 ± 0,004	0,060 ± 0,005
Примечание - Асцитная жидкость исследовалась в пяти повторах. Приведены средние показатели оптической плотности Note - ascites fluid was investigated in five replicates. The table shows the average optical density											

Анализ результатов ИФА показал, что антиидиотипические антитела, как «внутренний образ» ЭС-АГ *Opisthorhis felineus*, детектировались специфической поликлональной сывороткой до титра асцитной жидкости 1:800.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе в целях поиска альтернативы для ЭС-АГ *Opisthorhis felineus* были испытаны антиидиотипы к Fab-фрагментам МКА, имеющим специфичность к эпитопу данного антигена. Как известно, антитела воспринимаются иммунной системой организма как клональный продукт, несущий набор эпитопов (идиотипов). Эти эпитопы носят общее название – идиотипы, и они могут стимулировать аутологичный антиидиотипический ответ. При введении антител в организм развивается иммунный ответ в виде антиидиотипов, представляющих собой «внутренний образ» эпитопов начального антигена. Следовательно, антиидиотипы могут использоваться в качестве специфических антигенов. В этой связи, получение гибридом – продуцентов моноклональных АИАТ, моделирующих эпитопы антигенов *Opisthorhis felineus*, позволит отказаться от заражения лабораторных животных и весьма дорогостоящих работ по культивированию гельминта в лабораторных условиях для наработки антигена. Другими словами, создание гибридомы, продуцирующей антиидиотипы, обеспечит производителя диагностикума высокоспецифичными, стандартизированными и дешевыми антигенами гельминта описторхиса, не имея при этом дело с самим возбудителем инвазии и соблюдая принципы гуманности в производстве

биопрепаратов. Для наработки диагностического препарата достаточно будет разморозить штамм-продуцент и культивировать его в питательной среде или *in vivo* в брюшной полости сингенных мышей.

Для получения моноклональных антиидиотипов были использованы МКА 4B3D9, специфичные к эпитопу белка экскреторно-секреторного антигена описторхиса с молекулярной массой 28 кД. Методом гибридомной техники созданы две гибридомы с авторскими названиями 3H10A4 и 4H10D8, стабильно продуцирующие антиидиотипы, представляющие собой «внутренний образ» ЭС-АГ *Opisthorchis felineus*. АИАТ, продуцируемые указанными гибридомами, относились соответственно к иммуноглобулинам класса IgG1 и IgM, характеризовались достаточной аффинностью по отношению к использованному иммуногену.

Как следовало ожидать, антиидиотипы обеих гибридом, имитируя детерминанты ЭС-АГ, в «сэндвич» ИФА распознавались антителами собаки, инвазированной описторхисом, как специфический антиген гельминта. Таким образом, моноклональные антиидиотипы могут быть использованы в качестве антигена при разработке иммунологических тестов для диагностики описторхоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Petney T.N. and Andrews R.H. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* // *International Journal for Parasitology*. – 2013. - Vol. 43, №12-13. - P. 1031-1046. (PMID: 23978669).
3. 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.
4. 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. (PMID:22373585).
5. 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.
6. Pyinskikh E.N., Novitskiy V.V., Urazova L.N et al. Assessment of the relationship of chronic Opisthorchiasis to Epstein_Barr virus infection as well as some cytogenetical and immunological parameters in two comparable // *Eur. J. Epidemiol.* - 2000. - Vol. 16. - P. 993-1002.
7. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitology International*. - 2012. - Vol. 61, №1. - P. 25-31. (PMID: 21840415).
8. Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E., Fedorova O.S., Gerbek I.E., Cherevko N.A., Lebedeva N.Yu. A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast // *Parasitology Research*. - 2007. – Vol. 101, №4. - P. 1165-1168. (PMID:17549516).
9. 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.

10. Булашев А.Қ., Сұраншиев Ж.Ә., Серикова Ш. *Opisthorchis felineus* экскреторлы-секреторлық антигеніне телімді моноклоналды антиденелердің иммунды химиялық сипаттамасы // С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы. – Астана, 2013. - №4(79). – Б. 3-8.

11. 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.

12. 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.

13. Kohler G. and Milstin C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predetermined specificity // Nature. - 1975. - Vol. 256. - P. 495-497.

14. 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.

15. Dykman L.A., Sumaroka M.V., Staroverov S.A. et al. Immunogenic Properties of Colloidal Gold // Biology Bulletin of the Russian Academy of Science. - 2004. - Vol. 31. - P. 75-79.

16. Dykman L.A. and Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // Chem.Soc.Rev. - 2012. - Vol. 41. - P. 2256-2282.

REFERENCES

1. Abuladze K.I., Demidov N.V., Nepoklonov A.A., Nikol'skiy S.N., Pavlova N.V., Stepanov A.V. *Parazitologiya i invazionnyye bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhyvotnykh* [Parasitology and parasitic diseases of farm animals]. М., Agropromizdat, 1990, 464 p.

2. Petney T.N. and Andrews R.H. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini*. *International Journal for Parasitology*, 2013, vol. 43, no. 12-13, pp. 1031-1046. PMID: 23978669.

3. 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, no. 5, pp. 1273-1281.

4. 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, no. 4, pp. 1169-1178. PMID: 22373585.

5. Khoontawad J., Hongsrirachan 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, pp. 1275-1283.

6. Ilyinskikh E.N., Novitskiy V.V., Urazova L.N et al. Assessment of the relationship of chronic Opisthorchiasis to Epstein_Barr virus infection as well as some cytogenetical and immunological parameters in two comparable. *Eur. J. Epidemiol*, 2000, vol. 16, pp. 993-1002.

7. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. *Parasitology International*, 2012, vol. 61, no. 1, pp. 25-31. PMID: 21840415.

8. Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E., Fedorova O.S., Gerbek I.E., Cherevko N.A., Lebedeva N.Yu. A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their

relationship in people of Tomsk Oblast. *Parasitology Research September, 2007, vol. 101, no. 4, pp. 1165-1168. PMID:17549516.*

9. Innovatsionnyy patent 23891 Respublika Kazakhstan, G01N 33/53 A61B 10/00. *Sposob prigotovleniya ekskretorno-sekretornogo antigena dlya serologicheskoy diagnostiki opistorkhoza / A.K. Bulashev, S.N.Borovikov, M.A.Kuybagarov i soavt.; zayavitel' i patentoobladatel' AO «Kazakhskiy agrotekhnicheskii universitet im.S.Seyfullina» [Innovative patent 23891 Republic of Kazakhstan, G01N 33/53 A61B 10/00. The method of preparing excretory-secretory antigen for serological diagnosis of Opisthorchiasis]. no. 68176; zayavl. 11.02.2010; opubl. 15.04.2011, Byull. no. 4, 4 p.*

10. Bulashev A.K., Suranshiyev Z.A., Serikova S.H. *Opisthorchis felinus ekskretorly-sekretorlyk antigenine telimdi monoklonaldy antidenelerdin immundy khimiyalyk sipattamasy. S.Seyfullin atyndagy Kazakh agrotekhnikalik universitetinin Gylym zharshysy [Immunochemical characterization of monoclonal antibodies specific for excretory-secretory antigen of Opisthorchis felinus. J.Science Review of S.Seyfullin Kazakh Agro Technical University]. Astana, 2013, no. 4(79), pp. 3-8.*

11. *Razrabotka sposobov immunofermentnoy diagnostiki opistorkhoza cheloveka i zivotnykh: otchet o NIR (zaklyuchitel'nyy) / AO «Kazakhskiy agrotekhnicheskii universitet im.S.Seyfullina»: ruk. Bulashev A.K.; ispoln.: Borovikov S.N. [Development of methods for diagnosis of human and animal Opisthorchiasis on the basis of ELISA: Research report (final). "S.Seifullin Kazakh Agro Technical University"]. Astana, 2011, 60 p., no. 0109RK00476, Inv. no. 0211RK00426.*

12. Dykman L.A. *Zolotyie nanochastitsy: sintez, svoystva, biomeditsinskoye primeneniye. L.A.Dykman, V.A.Bogatyrev, S.Yu.Shchogolov, N.G.Khlebtsov; Institut biokhimii i fiziologii rasteniy i mikroorganizmov RAN [Gold nanoparticles: synthesis, properties and biomedical applications; Institute of Biochemistry & Physiology of Plants and Microorganisms RAS]. M., Nauka, 2008, pp. 234-256.*

13. Kohler G and Milstin C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predetermined specificity. *Nature, 1975, vol. 256, pp. 495-497. PMID:1172191.*

14. Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – competitive immunoassay. *J. Immunol. Meth., 1987, vol. 100, no. 3, pp. 173-179.*

15. Dykman L.A., Sumaroka M.V., Staroverov S. A. et al. Immunogenic Properties of Colloidal Gold. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Science, 2004, vol. 31, pp. 75-79.*

16. Dykman L.A. and Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem.Soc.Rev., 2012, vol. 41, pp. 2256-2282.*

ТҮЙІН

Қазақстанда адамдардың описторхозбен ауыру деңгейі бұрынғы Кеңес Одағы елдерінің арасында бірден-бір жоғары көрсеткішке ие болып отыр. Аталмыш инвазиямен күресте ең басты мәселе - уақтылы диагностика. Алайда, описторхоз ауруының балауында қолданылып жүрген тәсілдердің тиімділігі мен дәлділігі біршама төмен. Осыған орай, сезімталдығы жоғары иммунологиялық әдістердің бірі болып табылатын ИФТ-нің негізінде диагностикалық тест-жүйелерді әзірлеу өзекті мәселеге айналып отыр. Описторхоздың серологиялық диагностикасында қолданысқа ең жарамды антиген ретінде құрттың ekskretorlyk-sekretorlyk antigenin (ЭС-АГ) айтуға болады. Өкінішке орай, бұл антигенді қолдануға негізделген ИФТ тәсілдері практикада кең қолданыс таба алмай отыр, өйткені паразиттің стандартталған метаболитін алу өте күрделі жұмыстардың атқарылуын талап етеді. Міне, сондықтан да, антигеннің «ішкі бейнесін», яғни ЭС-АГ-нің эпитопына телімді антиденелердің Fab-фрагменттеріне қарсы бағытталған антиидиотиптік антиденелерді (АИАД) серологиялық диагностикада қолданудың маңызы зор болмақ.

Ғылыми зерттеулердің мақсаты - *Opisthorchis felinus*-тің ЭС-АГ эпитопына телімді моноклоналды антиденелердің (МКА) идиотиптеріне антиденелерді алу және оларды описторхоз ауруын балау мақсатында ИФТ-ында антиген ретінде қолдану мүмкіндігін анықтау. Гибридомалық техника көмегімен *Opisthorchis felinus* антигенінің «ішкі бейнесін», яғни АИАД-лерді тұрақты түрде өндіретін *3H10A4* және *4H10D8* деп белгіленген гибридомалардың екі штамы алынған. Аталмыш гибридомалар синтездеп шығаратын антиидиотиптер сәйкесінше IgG1 және IgM класына жататын иммуноглобулиндер ретінде қолданылған иммуногенмен - *4B3D9* гибридомасы өндіретін МКА-лерінің идиотипімен берік байланысқа түсе алатын антиденелер ретінде сипатталды. Екі гибридоманың антиидиотиптері қоздырғыштың антигеніне еліктей отыра, сәндвич ИФТ-ында описторхис құртымен жұқтырылған иттің антиденелерімен телімді антиген сияқты байланысқа түскен. Зерттеулер нәтижелері

алынған гибридома штамдарының антиидиотиптерін описторхоз ауруын балауға жарамды иммунологиялық тәсілдерді әзірлеуде антиген орынында қолдануға болатындығын дәлелдеп отыр.

Негізгі сөздер: описторхоз, диагностика, экскреторлы-секреторлы антиген, иммундық ферменттік талдау, гибридома, моноклоналды антиденелер, антиидиотиптік антиденелер.