

Е.Н.Афанасьев, И.С.Тюменцева, О.И.Коготкова, Л.В.Ляпустина, И.В.Жарникова,
И.В.Савельева, Д.А.Будыка

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Разработаны эффективные схемы иммунизации для получения чумных, бруцеллезных, сибиреязвенных, туляреминых, холерных, лептоспирозных, легионеллезных, кампилобактериозных гипериммунных сывороток, основанные на оптимальной комбинации специфических белковых антигенных комплексов с иммуномодуляторами, обеспечивающие высокий специфический иммунный ответ практически у 100 % животных, значительное сокращение сроков иммунизации, материальных и трудовых затрат. Полученные иммунные сыворотки являются высококачественным биологическим сырьем для производства различных диагностических иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: антиген, антитело, иммунные сыворотки, схемы иммунизации, иммунокорректор.

Для изготовления тест-систем иммуноферментных, магноимносорбентных, иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих, диагностикумов эритроцитарных требуются преципитирующие антитела (Аг), которые получают при гипериммунизации животных растворимыми антигенами (Аг). Это можно объяснить тем, что при использовании корпускулярных антигенов титры Аг при первичном и вторичном иммунном ответе мало различаются. При введении животным растворимых Аг увеличивается синтез Аг при вторичном иммунном ответе [10, 11].

В процессе иммунизации необходимо учитывать целый ряд факторов: физико-химическое состояние Аг, дозы, способы, интервалы и кратность введения Аг, общую продолжительность цикла иммунизации, применение адъювантов и иммунокорректоров, которые в совокупности должны обеспечивать получение иммунных сывороток с достаточно высоким титром специфических Аг за сравнительно короткий промежуток времени при минимальном расходе антигенного и другого материала и не приводить к состоянию иммунологической толерантности животного.

Цель исследования – разработка эффективной схемы иммунизации животных для получения высокоактивных, специфичных гипериммунных сывороток, являющихся качественным биологическим сырьем для производства медицинских иммунобиологических препаратов.

Материалы и методы

Водорастворимые Аг получали из стерильных микробных биомасс возбудителей чумы, бруцеллеза, сибирской язвы, туляремии, холеры, лептоспироза, легионеллеза, кампилобактериоза методом водно-солевой экстракции с последующей ультразвуковой дезинтеграцией.

В опытах были использованы 500 кроликов обоего пола породы шиншилла массой 3–3,5 кг. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу № 1179 [5].

Количественное определение белка проводили методом сравнения поглощения белков при 280 и 260 нм на спектрофотометре СФ-46 [13]. Титр специфических Аг в сыворотках крови определяли в непрямой реакции иммунофлуоресценции (РНИФ) [14]. Специфическую активность Аг и полученных иммунных сывороток определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) в 1 % агаровом геле (Difco, USA) [12]. Лиофилизацию сывороток проводили в камере LZ-9с (Чехия). Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли методы вариационной статистики, изложенные в работе [8]. При оценке доверительного коэффициента исходили в каждом случае из степени числа свобод выбранной нами точности 95 %.

Результаты и обсуждение

Для получения гипериммунных сывороток применяли белковые антигенные комплексы из микробных биомасс, адъюванты и иммунокорректоры, обладающие разнообразным биологическим действием.

Попытки иммунизации кроликов по схеме, состоящей из последовательных многоточечных внутрикожных введений Аг с полным адъювантом Фрейнда, приводили к иммунному ответу лишь у 25–30 % иммунизируемых животных, при этом длительность иммунизации составляла 2,5–3 мес., а у кроликов развивалась адъювантная болезнь, которая выражалась в возникновении множественных опухолевидных образований на месте введения с последующими изъятиями.

В дальнейшем в качестве иммуномодулирующе-

го вещества мы применили феракрил (смесь железных (II, III) солей полиакриловой кислоты), который способен вызывать выраженное увеличение антителообразующих Т- и В-клеток [3]. Разработана схема иммунизации: грундиммунизация включала пять последовательных парентеральных введений смеси Аг с 3% водно-спиртовым раствором феракрила с интервалами в 3–7 дней. Через 30 сут после последней инъекции Аг у животных брали из краевой вены уха кровь и отделяли не менее 4 мл иммунной сыворотки, в которую добавляли Аг с целью получения комплекса Аг – Ат. Основной цикл иммунизации состоял из четырех внутривенных инъекций комплекса Аг – Ат через каждые 3–4 дня тому же животному, от которого была получена иммунная сыворотка. При такой схеме иммунизации получили кроличьи гипериммунные сыворотки с высокой специфической активностью в иммунологических реакциях. При этом иммуностимулирующий эффект при отсутствии токсического воздействия на животное, без возникновения адъювантной болезни, достигался у 95 % кроликов. Что же касается продолжительности цикла иммунизации, то она не всегда приемлема, поскольку конечные результаты достигались не ранее 49–54 дней [6].

С учетом накопленного опыта и теоретических предпосылок предложена и экспериментально обоснована новая схема иммунизации животных: антигенный материал пятикратно вводили внутривенно, одновременно внутримышечно в качестве иммуномодулятора инъекцировали тималин, в третью инъекцию дополнительно вводили внутримышечно циклофосфан. Использование в качестве иммуномодулятора тималина способствовало значительному повышению титров специфических сывороточных Ат за счет увеличения числа антителообразующих клеток в результате стимуляции функции макрофагов и хелперных Т-клеток. Циклофосфан, являясь классическим иммуносупрессором, также активизировал макрофаги, стимулируя фагоцитарную, цитотоксическую и супрессивную (в отношении главным образом Т-лимфоцитов) функции [4]. Такая избирательность в действии иммуностимулятора, с одной стороны, и определенная селективность в действии иммуносупрессора, с другой, служили оптимальной комбинацией препаратов обеих групп и режимов их использования для активации одних механизмов иммунитета и выключения других. При данном способе продолжительность цикла иммунизации составляла 31–35 дней, расход антигенного материала – 7550 мкг на одного кролика. Титры специфических Ат в сыворотках животных при определении в РИД достигали показателей $1:15,4 \pm 1,25$ – $1:28,8 \pm 2,5$, а в НРИФ – не ниже $1:13926,4 \pm 1372,16$. Такие характеристики соответствовали требованиям оценки сырья для производства иммунобиологических препаратов [7].

Дальнейшее проведение исследований позволило предложить новую схему гипериммунизации кроликов с одним иммунокорректором – тимогеном,

при этом удалось значительно снизить антигенную нагрузку при иммунизации. Применение тимогена сопровождалось мобилизацией регуляторных и эффекторных механизмов адаптации организма к воздействию ксенобиотических факторов. Согласно концепции пептидного регуляторного каскада, после его экзогенного введения в организме происходило освобождение других пептидов, для которых исходный пептид служит индуктором. Биологическое действие тимогена реализовалось на уровне предшественников Т-клеток. Эффекты препарата на клеточном уровне включали в себя специфическое связывание с мембраной лимфоцитов, активацию систем вторичных посредников и регуляцию функционального состояния лимфоидных клеток через цАМР-зависимые протекиназы [9].

Схема иммунизации состояла из следующих манипуляций: кроликам вводили внутривенно каждые пять дней белковый антигенный комплекс в увеличивающихся дозах. В эти же сроки внутримышечно инъекцировали по 10 мкг тимогена. На 7–10-й день после последнего введения иммуногена животных кровопускали. Активность гипериммунных сывороток, полученных по этой схеме, в РИД составляла $1:28,8 \pm 2,5$ – $1:53,3 \pm 5,01$, в НРИФ – $1:13926,4 \pm 1372,16$ – $1:24576 \pm 2744,32$.

Благодаря применению иммунокорректора тимогена, обладающему полифункциональным действием, значительно сокращены дозировки вводимого антигенного материала (с 7550 мкг до 450 мкг), иммунокорректора – в 500 раз, длительность процесса иммунизации с 35 до 22 дней, при этом повышен выход целевого продукта за счет увеличения антителообразования у животных-продуцентов с одновременным уменьшением трудозатрат.

Обнадеживающие результаты получены при использовании иммунокорректора иммунофана – синтетического гексопептида ($C_{36}H_{61}O_{10}N_{12}$), способного резко увеличивать титры и длительность циркуляции специфических Ат. После пятикратного внутривенного введения Аг на фоне внутримышечных инъекций иммунофана удалось получить относительно сходные результаты практически у 100 % животных.

Для повышения специфичности полученных иммунных сывороток необходимо проведение сорбции антител, дающих перекрестные реакции с гетерологичными антигенами. Как показал наш собственный опыт, истощение сывороток микронными клетками, широко применяемое в сывороточном производстве, существенно понижает специфические титры антител, зачастую приводя к полной непригодности сырья. Использование твердофазных полиакриламидных сорбентов на основе водорастворимых антигенов из гетерологичных микроорганизмов приводит к повышению специфичности сывороток, при этом титры антител снижаются незначительно. Однако технология приготовления полиакриламидных сорбентов включает использование высокотоксичных импортных реактивов и трудоемка. Этих недостатков ли-

шен аффинный сорбент с магнитными свойствами на основе кремнезема – алюмосиликата, примененный нами. Наличие у иммуносорбента магнитных свойств дает возможность его сепарации с помощью постоянного магнита, исключая этап центрифугирования, что упрощает и ускоряет процесс сорбции, при этом сорбент можно регенерировать 3М раствором роданистого калия и многократно использовать [1, 2].

Таким образом, разработаны новые, эффективные подходы для получения чумных, бруцеллезных, сибиреязвенных, туляреминых, холерных, лептоспирозных, легионеллезных, кампилобактериозных гипериммунных сывороток, которые являются высококачественным биологическим сырьем для производства различных иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Жданова Е.В. Способ сорбции иммунной сыворотки крови. Патент на изобретение № 2200324 от 10.03.2003 г.
2. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н., Бинатова В.В. Способ получения иммуносорбента (варианты). Патент на изобретение № 2138813 от 27.09.1999 г.
3. Кирдей Е.Г., Пинигина Н.М., Тюменцев С.Н. и др. Способ стимуляции антителообразования у животных. Авторское свидетельство № 1390836 от 1986 г.
4. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. М.: Медицина; 1985. 255 с.
5. Приказ № 1179 от 10 октября 1983 г. Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения. М.; 1983.
6. Тюменцев С.Н., Андреевская Н.М., Тюменцева И.С., Калиновский А.И., Репина Л.П., Загоскина Т.Ю. Способ получения диагностической сыворотки. Патент на изобретение № 2010577 от 15.04.1994 г.
7. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Базилов И.А., Алиева Е.В. Способ получения диагностической сыворотки. Патент на изобретение № 2135210 от 27.08.1999 г.
8. Урбах В.Ю. Статистические методы в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1975. 296 с.
9. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Тималин – иммуномодулирующий препарат из тимуса. В кн.: Тимус и его влияние на организм. Томск: Изд-во Томского университета; 1982. С. 201–3.

10. Hurn B.A.L., Chantler S.M. Production of reagent antibodies. *Methods in Enzymology*. 1980; 70(5):104–42.

11. Nossal G.J.V., Szenberg A., Ada G.L. et al. Single cell studies 19S antibody production. *J. Exp. Med.* 1964; 119(3):485–502.

12. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1949; B26:1–9.

13. Warburg O., Christian W. Isolierung und Kristallisation des Garugsterments Enolase. *Biochem. Z.* 1941; 310:384–421.

14. Weller T.H., Coons A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1954; 86:789–94.

E.N.Afanasyev, I.S.Tyumentseva, O.I.Kogotkova, L.V.Lyapustina,
I.V.Zharnikova, I.V.Savelyeva, D.A.Budyka

Development of New Approaches of Obtaining the Hyperimmune Sera for Production of Medical Immunobiological Preparations

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Developed were the new immunization schedules of obtaining plague, brucellar, anthrax, tularemia, cholera, leptospirosis, legionellosis and campylobacteriosis hyperimmune sera based on optimal combinations of specific protein antigenic complexes with immunomodulators, providing high specific immune response in 100 % of animals, significant reduction of immunization terms, material and labor input. Immune sera obtained are high quality biological material to be used for production of different diagnostic immunobiological preparations.

Key words: antigen, antibody, immune sera, immunization schedules, immunomodulator.

Об авторах:

Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Коготкова О.И., Ляпустина Л.В., Жарникова И.В., Савельева И.В., Будыка Д.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Authors:

Afanasyev E.N., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Lyapustina L.V., Zharnikova I.V., Savelyeva I.V., Budyka D.A. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 20.04.09.