

## Аутоиммунная Супрессия Иммунного Ответа На Конкретный Антиген

А.А. Мехтиев\*, А.И. Нагиев, К.Ф. Гусейнова

Институт физиологии им. А.И. Гараева НАН Азербайджана, Шарифзаде., 78, Баку AZ1100, Азербайджан; \*E-mail: arifmekht@yahoo.com

В статье приводятся результаты экспериментов по супрессии иммунного ответа на конкретный антиген с помощью аутологических антиидиотипических антител. Опыты выполнены на кроликах-самцах породы «Шиншилла». Животных иммунизировали бычьим сывороточным альбумином (БСА), из крови выделяли иммуноглобулины, методом иммуноаффинной хроматографии очищали поликлональные антитела к БСА, ферментативным путём (пепсин) их расщепляли и методом гель-хроматографии очищали F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты антител к БСА. Иммунизация кроликов F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами аутологических антител к БСА приводила к заметному ослаблению ранее выработанного иммунного ответа к БСА.

**Ключевые слова:** Супрессия иммунного ответа, антитела, бычий сывороточный альбумин, интерлейкин

### ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунная природа лежит в основе целого ряда тяжёлых заболеваний, на сегодняшний день, к сожалению, не имеющих никаких иных способов лечения, кроме гормональной терапии. К таким заболеваниям относятся системная красная волчанка, проказа, аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1-го типа, детские церебральные параличи, ревматоидный полиартрит и ряд других очень тяжёлых и долго текущих патологий, зачастую завершающихся инвалидизацией больного. В основе патогенеза всех этих заболеваний лежит выраженная аутоиммунная атака на антигены собственных тканей организма-хозяина, проявляющаяся в выработке аутологических антител. В структуре иммуноглобулина G антигенную уникальность молекулы определяют F(ab)<sub>2</sub> фрагменты (“ab” – на английском языке аббревиатура от “antigen binding”), обеспечивающие специфическое связывание молекулы иммуноглобулина с эпитопом вызвавшего иммунный ответ антигена (Пол, 1987). Исходя из сказанного, целью данного исследования являлась разработка возможности супрессии иммунного ответа на конкретный антиген путём индукции синтеза аутологических антиидиотипических антител к эпитопам F(ab)<sub>2</sub> фрагментов поликлональных антител, выработанных против эпитопов данного антигена.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на 5 кроликах-самцах породы «Шиншилла» весом 2,0-2,5 кг. Животных иммунизировали бычьим сывороточным

альбумином (БСА) на протяжении 3 мес по следующей схеме: первые три инъекции с интервалом в 14 сут, далее – 1 раз в месяц. При иммунизации подкожно вводили по 300 мкг БСА в физиологическом растворе всегда в смеси с равным объёмом полного адьюванта Фрейнда. Через 10 сут после 3-ей и последующих инъекций из краевой вены уха у кроликов забирали 50 мл крови, отделяли сыворотку и путём добавления 100%-ного раствора сульфата аммония осаждали иммуноглобулины G.

Поликлональные антитела к БСА получали методом иммуно-аффинной хроматографии путём пропускания раствора иммуноглобулинов к БСА в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,3) через аффинную колонку с сорбентом CNBr-сефарозы, к которому посредством ковалентных связей предварительно пришивали БСА. После нанесения иммуноглобулинов колонку отмывали 30-кратным объёмом 0,01 М фосфатного буфера и элюировали антитела 3 М раствором роданистого калия, после чего их диализовали против 0,15 М хлористого натрия в течение 6 ч, измеряли концентрацию по методу Бредфорд и хранили при температуре -70°C.

Получение F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов осуществляли путём ферментативного расщепления антител к БСА пепсином. Для этого антитела смешивали с пепсином в соотношении 43:1, помещали в 0,2 М раствор уксуснокислого калия (pH 3,7) и оставляли в течение ночи на водяной бане при температуре 37°C. Для контроля полноты расщепления антител пепсином их тщательно диализовали против 0,01 М фосфатного буфера и проводили электрофорез в 7,5%-ном полиакриламидном геле, в присутствии додецилсульфата натрия и с применением белков-

стандартов с известными значениями молекулярных масс.

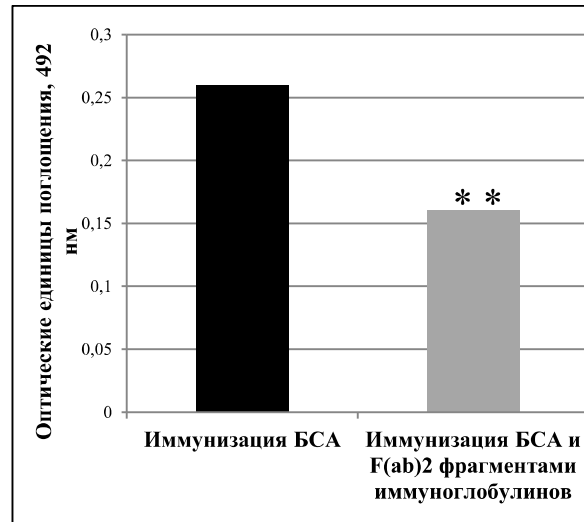
Очистку F(ab)<sub>2</sub> фрагментов антител осуществляли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-150 (1.8 X 60 см). При этом на колонку, уравновешенную 0.01 М фосфатным буфером (pH 7,2), наносили продукт ферментативного расщепления и собирали фракции. Померили концентрацию фракции F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов антител, сконцентрировали методом ультрафильтрации и использовали для иммунизации тех же кроликов, которых ранее иммунизировали БСА. Кроликов иммунизировали F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами всегда в смеси с равным объёмом полного адьюванта Фрейнда и забирали кровь из краевой вены уха по указанной выше схеме.

Анализ силы иммунного ответа после иммунизации БСА и уровня его супрессии в результате иммунизации F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами собственных антител против БСА осуществляли методом твёрдофазного непрямого иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах (Сигма, Германия). В качестве антигена использовали БСА в концентрации 20 мкг/мл в 0.1 М буфере трис-HCl (pH 8,6). Каждую пробу дублировали дважды и по завершении реакции вычисляли среднюю арифметическую. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд с использованием 0.01%-ного раствора Кумаси бриллиантового синего G-250, на длине волны 595 нм. В качестве первых антител использовали сыворотку кроликов, иммунизированных БСА, и сыворотку этих же кроликов после их иммунизации F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами аутологических антител к БСА. В качестве вторых антител использовали козы противокроличьи иммуноглобулины с конъюгированной пероксидазой хрена. Визуализацию результатов реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – 0,05%-ного раствора ортофенилендиамина в 0.05 М цитрат-фосфатном буфере (pH 4,5). Реакцию останавливали через 20 мин после добавления субстрата путем внесения в лунки по 50 мкл 3 М раствора NaOH; результаты реакции считывали на фотометре для иммуноферментного анализа “StatFax 303” (“Awareness”, USA) на длине волны 492 нм (длина волны сравнения – 630 нм). Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После иммунизации БСА у всех использованных в эксперименте кроликов методом твёр-

дофазного непрямого иммуноферментного анализа регистрировали выраженный иммунный ответ против данного антигена (Рис.). Вместе с тем, иммунизация этих же животных F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами аутологических поликлональных антител, выработанных против БСА, приводила к существенному ингибированию иммунного ответа (Рис.).



**Рисунок.** Влияние иммунизации кроликов F(ab)<sub>2</sub> фрагментами иммуноглобулинов к БСА на выраженность иммунного ответа против БСА. \*\* - p<0,01

Супрессия иммунного ответа против БСА является косвенным свидетельством выработки антиидиотипических иммуноглобулинов против F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов аутологических поликлональных антител. Такой подход позволяет осуществлять таргетную супрессию иммунного ответа против одного антигена за счёт специфического связывания антиидиотипическими антителами отдельных эпитопов уникальных F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов поликлональных антител, выработанных против этого антигена. Вместе с тем, таргетная супрессия иммунного ответа с помощью антиидиотипических антител позволяет избежать ослабления потенциала всей иммунной системы организма, поскольку антиидиотипические антитела в иммунологическом смысле направлены только против эпитопов F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов антител к конкретному антигену и не сенсибилизируются против Fc-фрагментов или каких-либо других эпитопов поликлональных антител, имеющих идентичную представленность в молекулах различных клонов иммуноглобулинов.

В литературе встречаются описания феномена супрессии иммунного ответа на конкретный антиген с помощью интерлейкина 10 и регуляторных Т-клеток 1-го типа (Liu et al., 2014),

антиидиотипических антител, выработанных в организме другой особи этого вида против эпитопов антител к данному антигену (гомологичные антитела; Saito et al., 1986; Rossi et al., 1989). Применение метода иммунизации аутологическими F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами поликлональных антител с целью таргетной супрессии иммунного ответа на конкретный антиген имеет преимущество перед применением с этой целью гомологичных антиидиотипических антител, поскольку последние, несмотря на принадлежность животных к одному виду, являются, в любом случае, чужеродными антигенами для организма-хозяина и служат объектами атаки и нейтрализации со стороны его иммунной системы. Вместе с тем, следует признать, что иммунизация F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами собственных поликлональных антител может не вызвать той силы иммунного ответа в виде продукции антиидиотипических антител, которая возникает при иммунизации животных даже гомологичными антигенами — в контексте полученных нами данных, F(ab)<sub>2</sub>-фрагментами поликлональных антител другого животного (Saito et al., 1986; Rossi et al., 1989). Возможно, что для усиления иммунного ответа на эпитопы аутологических F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов антител потребуется осуществление их химической модификации.

Представленный в данной работе подход является начальным этапом исследований,

нацеленных на супрессию аутоиммунного патологического процесса, лежащего в основе различных нозологий, с помощью таргетной супрессии аутоиммунной атаки аутологическими антиидиотипическими антителами, направленными против отдельных эпитопов F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов аутоантител организма больного.

## ЛИТЕРАТУРА

- Антитела. Методы** (1991) Кн. 2. Под ред. Д.Кэти. Москва: Мир.
- Пол У.** (1987) Иммунная система. Иммунология. Под ред. У.Пола. Москва: Мир, **Т. 1:** 14-46.
- Liu Y., Liu W., Russell M.W.** (2014) Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin10 and type 1 regulatory T cells. *Mucosa Immunol.*, **7(1):** 65-76.
- Rossi F., Dietrich J., Kazatchrine M.D.** (1989) Antiidiotypic suppression of auto-antibodies with normal polyspecific immunoglobulins. *Res. Immunol.*, **140(1):** 19-31.
- Saito T., Tokuhisa T., Rayewsky K.** (1986) Induction of chronic idiotypic suppression by ligands binding to the variable (not the constant) region of the idiotypic target. *European J. Immunol.*, **16(11):** 1419-1425.

## Konkret Antigenə Qarşı İmmun Cavabının Autoimmun Supressiyası

A.Ə. Mehdiyev, A.İ. Nağıyev, K.F. Hüseynova

*AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu*

Məqalədə autologik antiidiotipik anticisimlərin vasitəsi ilə konkret antigenə qarşı immun cavabının supressiyası ilə bağlı eksperimentlər əks olunur. Eksperimentlər “Şişişilla” növü ada dovşanlarının üzərində aparılıb. Heyvanlar ölküz zərdab albumini (ÖZA) ilə immunizə olunub, qandan immunoqlobulinlər ayrılıb, immun affin xromatoqrafiyası vasitəsi ilə ÖZA qarşı poliklonal anticisimlər təmizlənilib, enzim (pepsin) köməyi ilə onlar parçalanıb və gel-xromatoqrafiya üsulu ilə ÖZA qarşı anticisimlərin F(ab)<sub>2</sub>-fraqmentləri təmizlənilib. Ada dovşanların ÖZA qarşı autologik anticisimlərin F(ab)<sub>2</sub>-fraqmentləri ilə immunizə edilməsi, qabağcadan yaradılmış ÖZA qarşı immun cavabının gözəcarpan zəifləməsinə gətirib çıxarırdı.

**Açar sözlər:** İmmun cavabın supressiyası, anticisim, аннумела, ölküz zərdabı albumini, interleykin

## **Autoimmune Suppression of Immune Response to a Certain Antigen**

**A.A. Mekhtiyev, A.I. Nagiyev, K.F. Huseynova**

*Institute of Physiology names after A.I.Garayev, Azerbaijan National Academy of Sciences*

The article concerns studies on suppression of immune response to a certain antigen with application of autologic anti-idiotypic antibodies. The experiments were carried out on the male rabbits of “Shinshilla” species. The animals were immunized with bovine serum albumin (BSA), immunoglobulins were precipitated from the blood, anti-BSA polyclonal antibodies were purified using the technique of immune affinity chromatography, they were digested with the enzyme (pepsin) and F(ab)<sub>2</sub>-fragments of the anti-BSA antibodies were purified using the technique of gel-chromatography. Immunization of the rabbits with F(ab)<sub>2</sub>-fragments of the anti-BSA autologic antibodies led to significant downregulation of the earlier induced immune response to BSA.

**Keywords:** *Suppression of immune response, antibody, bovine serum albumin, interleukin*