

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МКА К ПРЕПАРАТУ СЕРДЕЧНОГО ТРОПОНИНА Т

Дордочкина С.А. - магистр технических наук, преподаватель Костанайского государственного университета им.А.Байтұрсынова, г.Костанай

Картабаева Г.О.- магистр технических наук, Костанайский государственный университет им.А.Байтұрсынова, г.Костанай

В данной статье освещены вопросы диагностики сердечно-сосудистых заболеваний с помощью кардиомаккеров. Кардиомаккеры- это белки сердечной мышцы, наиболее крупные из них тропонины с молекулярной массой 37кДж (тропонин I) и 24 кДж (тропонин Т). Для конструирования ИХА теста при диагностике инфарктного состояния, работали над созданием гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к препарату сердечного тропонина Т. Начальным этапом проведения исследования явилось иммунизация лабораторных мышей. Иммунизацию мышей проводили по длительной схеме, включающей в себя четырехкратное парентеральное введение препарата в дозе 50 мкл с адъювантом Фрейнда в течение 8-ми недель с двухнедельными перерывами. сыворотки крови проверяли в непрямом варианте ИФА. В результате титр антител составил 1:6400, 1:12800.

Для создания гибридом использовали клетки миеломной линии Х63 – Ад 8.653. По истечении 10 дней после гибридизации было обнаружено 68 гибридных клонов, выход гибридом составил 18%. Культуральную жидкость тестировали методом непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа. По результатам было выявлено 9 клонов, активно вырабатывающих специфические антитела к препарату сердечного тропонина Т.

Ключевые слова: иммунизация, иммунная сыворотка, антиген, антитело, иммуноген, моноклон, гибридома.

THE RESULTING FUSION OF CULTURED CELLS THAT PRODUCE ICA DRUG CARDIAC TROPONIN T

Dordochkina S.A., Master of Engineering Science, teacher of RSE «KSU names of A.Baytursynov»

Kartabaeva G.O., Master of Engineering Science

This article highlights the problems in the diagnosis of cardiovascular disease using kadrdomarkerov. Cardiac markers - are proteins of the heart muscle, the largest of them with a molecular weight of troponins 37kDzh (troponin I) and 24 kJ (troponin T). For the construction of ELISA test in the diagnosis of infarction state, we worked on the creation of hybrid cells producing monoclonal antibodies to the drug cardiac troponin T. Immunization of mice was performed by continuous circuit comprising fourfold parenteral administration of the drug in a dose of 50 .mu.l with Freund's adjuvant for 8 weeks at two-week intervals. The initial stage of the study was the immunization of laboratory mice, the serum was tested in indirect ELISA. As a result, antibody titer was 1: 6400, 1: 12800.

To create a hybrid myeloma cell line using X63 - Ad 8.653. By 10 days after hybridization was found 68 hybrid clones, hybridomas yield was 18%. The culture fluid was tested by indirect variant ELISA. As a result it was revealed nine clones actively produced antibodies specific to the drug cardiac troponin T.

Keywords: immunization, immune serum, antigen, antibody, an immunogen.

ЖҮРЕК Т-ТРОПАНИНІ ПРЕПАРАТЫНАН КУЛЬТИВИРЛЕНГЕН ГИБРИДТОРЛАРЫН АЛУ

Дордочкина С.А.- РМК «А.Байтұрсынов атындағы ҚМУ» оқытушы, техника ғылымдарының магистрі, Қостанай қ.

Картабаева Г.О - техника ғылымдарының магистрі

Бұл мақалада кардиомаккерлердің көмегімен жүрекқантамырлары ауруларын болау туралы мәселелер қарастырылған. Қардиомаккерлер-бұл жүрек бұлшық еттерінің ақуызы, булардың ішіндегі ірілері 37 кДж (тропонин I) және 24 кДж (тропанин Т) молекулалық массасымен тропаниндер болып табылады. ИХА тесті құрастыру үшін жүрек жұмысын болауда, гибриді жасушаларды құрастыруда, жүрек тропанині Т препаратына моноклоналды антидене өндіру бойынша жұмыстар жасалынды. Зерттеу жүргізудің алғашқы сатысында зертханалық тышқандарды иммунизациялау, қан сарысуын ИФА теріс нұсқасында тексерді. Нәтижесінде антиденелердің титрі 1:6400, 1:12800 құрады.

Гибридомдарды қурастыру үшін Х63- Ад 8.653 миеломды торша сызықтары қолданылды. Гибридизациядан соң 10 күннің ішінде 68 гибриді клон, гибридомалардың мөлшері 18% құрады. Иммуноферментті сараптама арқылы культуральды сұйықтықты қатты фазалы теріс әдіспен тексерді. Нәтижесінде 9 клон анықталып, оның жүрек Т тропонині препаратына арнайы антиденелер табылды.

Негізгі сөздер: иммунизация, иммунды қан сарысуы, антиген, антидене, иммуноген.

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее частой причиной смерти, поэтому социальную и медицинскую значимость данной патологии сложно переоценить. Для своевременного ее выявления и прогнозирования течения используются многочисленные методы диагностики. В частности, это группа лабораторных тестов, направленных на определение состояния миокарда и оценку факторов риска развития сердечно-сосудистой патологии. Данные исследования достаточно разнородны по своему содержанию, однако общность назначения позволяет объединить их под общим условным названием – кардиомаркеры.

Кардиомаркеры – это белки сердечной мышцы, являющийся одним из компонентов сократительного аппарата поперечно-полосатых мышц, позволяющий мышечным волокнам, актина и миозина скользить относительно друг друга. Они подразделяются на несколько видов: миоглобин, гомоцистеин, с-реактивный белок (СРБ), креатинкиназа-МВ (СК-МВ), тропонин Т (сТnТ) и тропонин I (сТnI). Они играют очень важную роль в диагностике острого инфаркта миокарда. На первом месте по популярности находятся тропонины (I и Т), кардиомаркеры которые в настоящее время играют ключевую роль в диагностике ОИМ и входят в список критериев универсального определения инфаркта миокарда в США и странах Западной Европы [6].

Тропонины – это довольно крупные белки, с молекулярной массой 37 кДа (тропонин I) и 24 кДа (тропонин Т). Содержание этих двух белков в миокарде достаточно высокое и составляет для тропонина Т около 5 мг/г, а для тропонина I приблизительно 10 мг/г. Так называемая норма тропонина может значительно варьировать в зависимости от применяемых тестов и находится в диапазоне 0,4- 2,3 мкг/мл. При не осложненном течении инфаркта миокарда концентрация тропонина Т снижается уже к 5-6-му дню, а к 7-му дню повышенные значения тропонина Т выявляют у 60% больных. Специфичность определения тропонина Т в крови при инфаркте миокарда составляет 90-100%. В первые 2 ч от начала болевого приступа чувствительность определения тропонина Т составляет 33%, через 4 ч - 50%, после 10 ч - 100%, на 7-й день - 84%. Следовательно, определение биохимических маркеров некроза миокарда – необходимый компонент комплексной диагностики инфаркта миокарда.

Целью работы послужило создание гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к препарату сердечного тропонина Т для конструирования ИХА-теста при диагностике инфарктного состояния. На решение данной цели были поставлены следующие задачи исследования: проведение иммунизации мышей линии Balb/c тропонинами Т, подготовка миеломных клеток, выделение иммунных спленоцитов иммунизированных мышей, проведение гибридизации иммунных спленоцитов и клеток миеломной линии. При проведении исследований применялись серологические, иммунохимические, биотехнологические и другие методы. Начальным этапом проведения исследования явилась иммунизация лабораторных мышей линии Balb/c сердечными препаратами Troponin T from Human Hert («Sigma», США). Иммунизацию мышей проводили по длительной схеме, включающей в себя четырехкратное парентеральное введение препарата в дозе 50 мкл с адьювантом Фрейнда в течение 8-ми недель с двухнедельными перерывами.

Таблица 1 – Схема иммунизации мышей

Сутки	Доза антигена (мкл на голову)	Способ введения
1	50 мкл с адьювантом Фрейнда	парентеральное введение
14	50 мкл с адьювантом Фрейнда	парентеральное введение
28	50 мкл с адьювантом Фрейнда	парентеральное введение
42	50 мкл с адьювантом Фрейнда	парентеральное введение
56	50 мкл с адьювантом Фрейнда	парентеральное введение

Сыворотку крови иммунизированных мышей проверяли в непрямом варианте ИФА. В результате титр антител у иммунизированных мышей составил 1:6400, 1:12800.

Таблица 2 – Результаты тестирования сыворотки крови мышей иммунизированных сердечными препаратами Troponin T from HumanHert

Сутки	Взятие крови	Титр антител
1	Хвостовая вена	1:800
14	Хвостовая вена	1:1600
28	Хвостовая вена	1:3200
42	Хвостовая вена	1:6400
56	Хвостовая вена	1:12800

Для создания гибридом использовали клетки миеломной линии X63 – Ag 8.653., которые были реконсервированы, проверены на резистентность к 8- азагуанину и клонированы методом лимитирующих разведений. За 2 дня до слияния клеток, в стерильных условиях выделяли перитонеальные макрофаги от беспородных мышей с целью создания питающего слоя и высевали их в ячейки 96-луночных планшет для культивирования («Nunc», Дания).

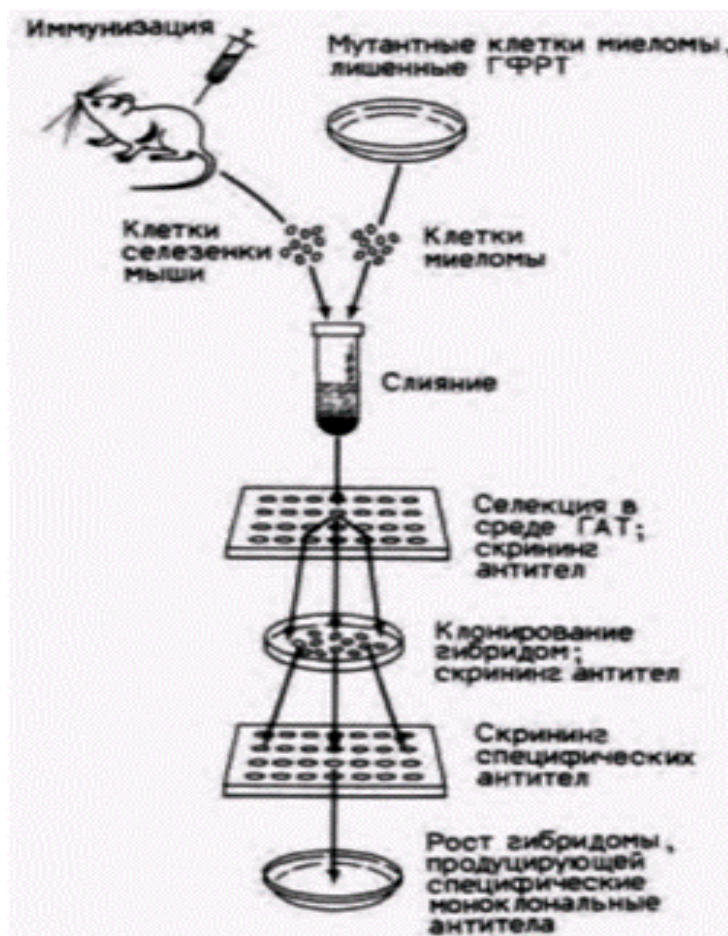


Рисунок 1 – Схема получения гибридных клеток

Для выделения лимфоцитов извлекали селезенку от иммунизированной мыши с наиболее высоким титром антител. Мышь забивали методом цервикальной дислокации и вымывали иммунные спленоциты из селезенки методом перфузии. Гибридизация спленоцитов мышей линии Balb/c, иммунизированных препаратом сердечного тропонина Т с миеломными клетками проведена по методу V. Oi, L. Herzenberg, в присутствии ПЭГ-4000, содержащий 10 % ДМСО. При гибридизации соотношение клеток миеломной линии к иммунным спленоцитам составило 1:10 соответственно.

Суспензию клеток в полной питательной среде RPMI-1640 с 10% содержанием фетальной сыворотки плода разлили на четыре 96-луночных культуральных планшета и культивировали при 37 °С, с содержанием в атмосфере 5 % CO₂.



Рисунок 2 - Питательной среде RPMI-1640 Рисунок 3 – Фетальная сыворотка плода

По истечению 24-х часов проводилось внесение селективной среды «НАТ» (Sigma, США). На седьмые сутки производили смену среды и вносили селективную среду «НТ» (Sigma, США). По истечении 10 дней после гибридизации было обнаружено 68 гибридных клонов, выход гибридом составил 18 %. Культуральную жидкость клонов тестировали на наличие специфических антител к препарату сердечного тропонина Т. Тестирование проводили методом непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с использованием меченных анти антител. Считывание результатов производилось при длине волны 450 нм. По результатам тестирования было выявлено 9 активных клона, продуцирующие специфические моноклональные антитела к препарату сердечного тропонина Т, которые будут использоваться в дальнейшем для изготовления ИХА-тест- системы при диагностике инфаркта миокарда. Таким образом, по итогам проделанной нами работы получены следующие результаты: проведена иммунизация мышей линии Balb/c, по окончании которой в ИФА титр специфических антител составил 1:6400, 1:12800; проведена реконсервация и клонирование клеток миеломной линии X63 – Ag 8.653.; проведена гибридизация иммунных спленоцитов мыши с наивысшим титром специфических антител и клеток миеломной линии, обнаружено 68 гибридных клона 9 из которых обладали активностью выработки специфических антител к препарату сердечного тропонина Т.

Литература:

1. Назаренко Г.И., Кишкун А.А., Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. / Г.И. Назаренко [Кишкун А.А.]. – М.: Медицина, 2006. – 544с.
2. В.М. Провоторов, К.И. Дмитриева. Диагностика инфаркта миокарда на фоне полной блокады левой ножки пучка Гиса. ВГМА им. Н.Н. Бурденко – 2002 г.
3. А. И. Карпищенко, А. А. Бутко, М. Д. Принцев. Инфаркт миокарда. М. – 1998 г.
4. В.Б.Воробьев. Инфаркт миокарда. М. – 2003 г.
5. Березов Т.Т. Применение ферментов в медицине. Биология. 1996 г. стр. 23 – 27.
6. Гусев Н.Б., Добровольский А.Б., Северин С.Е. Тропонин скелетных мышц и фосфорилирование: участок тропонина Т, фосфорилируемый специфической протеинкиназой. Биохимия, 1978, т.43, № 2, с.365-372.

7. Добровольский А.Б., Гусев Н.Б., Роль Ca²⁺-специфических участков связывания в индуцировании конформационных изменений структуры тропонина. Биохимия, 1978, т.43, № 9, с.1695-1703.

8. Леднев В.В. Исследование структуры актинодержущих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: Молекулярная и клеточная биофизика. М.: Наука, 1977, с.164-172.

Referens:

1., Nazarenko G.I., A.A. Kiskun Clinical evaluation of the results of laboratory tests. / G.I. Nazarenko [Kiskun AA]. - М.: Medicine, 2006. - 544s.

2., V.M. Provotorov, V.I. Dmitrieva. Diagnosis of myocardial infarction on a background full of left bundle branch block. VGMA them. N.N. Burdenko – 2002

3. A.I. Karpishchenko, A. Boyko, M.D. Prince. Myocardial infarction. М. – 1998

4. V.B. Vorobev. Myocardial infarction. М. – 2003

5. Berezov T.T. The use of enzymes in medicine. Biology. 1996 pp. 23 - 27.

6. Adelstein R.S., Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. Annu. Rev. Biochem., 1980, v.49, p.921-956.

7. Barron J.T., Baranyi M., Bányi K. Phosphorylation of the 20,000 dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction. J. Biol. Chem., 1979, v.254, K 12, p.4954-4956.

8. Birkett D.J., Price N.C., Radda G.K., Salman A.G. The reactivity of SH groups with a fluorogenic reagent. PEBS Lett., 1970, v.6, И 4, p.346-348.

Сведения об авторах

Дордочкина С.А. - магистр технических наук, преподаватель Костанайского государственного университета им. А.Байтурсынова», г.Костанай, ул.Урицкого 13, тел: 87785450289, e-mail: sveta.kz89@mail.ru

Картабаева Г.О. - магистр технических наук, г. Астана, ул. А.Молдагуловой 26, тел. 87715367389, e-mail: gauhar_89@mail.ru

Dordochkina S.A - Master of Engineering Science, teacher of RSE «KSU names of A.Baytursynov» Kostanay city, Uritsk street 13 tel 87785450289 sveta.kz89@mail.ru

Kartabaeva G.O., Master of Engineering, Science, Astana city, Akzhol street 26, tel. 87012856845 e-mail: gauhar_89@mail.ru

Дордочкина Светлана Анатольевна – т.ғ.м., ветеринарлық санитария кафедрасының меңгерушісі, А.Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, Қостанай қаласы Урицкий көшесі, 13; тел: 87785450289 e-mail: sveta.kz89@mail.ru

Картабаева Г.О. – т.ғ.м., Астана қаласы А.Молдагулов көшесі 26, тел: 87012856845; e-mail: gauhar_89@mail.ru