

СИНТЕЗ КОН'ЮГАТА 25-ГІДРОКСИВІТАМІНУ D₃ З ГЕМОЦІАНІНОМ МОЛЮСКА ТА ОДЕРЖАННЯ ІМУННИХ СИРОВАТОК

А. О. Мазанова
І. О. Шиманський
Д. М. Петухов
Л. Б. Дробот
М. М. Великий
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

E-mail: ann.mazanova@gmail.com

Отримано 30.04.2015

Метою роботи було отримання поліклональних антитіл, які розпізнають 25-гідроксивітамін D₃, для їх подальшої характеристики і застосування в імунохімічних тест-системах визначення вмісту 25-гідроксивітаміну D₃ у сироватці крові. Було використано методи хімічного синтезу імунокон'югатів (модифікований карбодимідний метод із застосуванням N'-етил-карбодиміду), тонкошарової хроматографії та гелі-фільтрації, а також непрямого імуноензимного аналізу ELISA. Описано етапи синтезу імунокон'югата 25-гідроксивітаміну D₃ з гемоціаніном молюска KLN, який використовували для отримання імуних сироваток. У результаті імунізації мишей і кролів одержано антисироватки, в яких визначали титри антитіл проти 25-гідроксивітаміну D₃ методом імуноензимного аналізу. Було продемонстровано, що титр специфічних антитіл вищий у кролів порівняно з мишами. Отримані поліклональні антитіла можуть бути використані для створення імунохімічних тест-систем скринінгового визначення вмісту 25-гідроксивітаміну D₃ у сироватці крові людини як маркера забезпеченості організму вітаміном D₃.

Ключові слова: 25-гідроксивітамін D₃, гаптени, імуноензимний аналіз, поліклональні антитіла.

На сьогодні дедалі більшої практичної ваги набуває удосконалення методів одержання моно- та поліклональних антитіл до різних антигенів, оскільки антитіла широко застосовують у проведенні наукових досліджень включно з імуноензимним аналізом (ELISA), імуноблотингом, конструюванням імуноліпосом, а також для діагностування й терапії різних захворювань. Оптимізація підходів до отримання, очищення та напрацювання у значних кількостях імуноглобулінів, специфічних до різноманітних антигенів, має важливе значення як для фундаментальних, так і для прикладних досліджень, зокрема для розроблення імунодіагностичних тест-систем для потреб медицини [1].

Імунохімічний аналіз має багато переваг порівняно з іншими видами аналізу, зокрема з методом радіоконкурентного зв'язування, високоефективної рідинної хроматографії, поєднаної з мас-спектрометрією тощо [2]. Він є відносно дешевим, а результати, які отримують на основі проведення імунохімічної реакції, є специфічними, точними та репрезентативними. Проте головною перевагою методів, що ґрунтуються на імуноспецифічній взаємодії між антигеном та антитілом і широко застосовуються в імунодіагностичних цілях, є відсутність етапу пробопідготовки зразка, в якому визначають вміст тієї чи іншої сполуки. Це дає змогу економити час, реагенти та запобігти втраті цільового антигену на кожному етапі очищення. Саме тому цей вид аналізу набув широкого застосування у харчовій промисловості, лабораторній діагностиці, наукових дослідженнях тощо. Наразі актуальним залишається пошук способів оптимізації шляхів отримання антитіл до різноманітних антигенів та розроблення тест-систем, в основі яких лежить імунохімічна взаємодія «антиген–антитіло».

За даними останніх епідеміологічних досліджень, проведених спеціалістами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) та

IOF (International Osteoporosis Foundation), ситуацію щодо недостатньої забезпеченості населення вітаміном D₃ можна розглядати як пандемічну для більшості країн світу [3]. За оцінками Інституту медицини Національної академії США (2011 р.), дефіцит вітаміну D₃ спостерігається у більш ніж 40% популяції американців усіх верств населення та сягає 80% у людей похилого віку, що зумовлює їхню схильність до розвитку численних захворювань, передусім остеопорозу. Ця патологія, на думку експертів ВООЗ, займає четверте місце в рейтингу основних медико-соціальних проблем сучасності. Згідно з даними ВООЗ, у найбільш розвинених країнах Європи, США, Японії сукупна кількість людей, які хворіють на остеопороз, досягає 75 млн. людей. Тільки в США остеопороз визначається у 30% жінок [4].

Враховуючи дослідження останніх років, вітамін D₃ розглядають не тільки як сполуку, що впливає лише на мінеральний обмін і застосовується переважно для лікування порушень опорно-рухового апарату. Встановлено, що активні метаболіти вітаміну D₃ регулюють проліферацію та диференціювання клітин, функціональну активність практично всіх органів і систем організму, а також синтез протеїнів, ліпідів, гормонів та інших фізіологічно активних сполук [5–7]. Активні метаболіти вітаміну D₃ в організмі людини впливають практично на всі механізми неспецифічного захисту від інфекційних агентів та на систему імунної специфічної відповіді, визначаючи таким чином ефективність знешкодження інфекційних агентів і характер запальних і аутоімунних процесів [8–10].

Біомаркером забезпеченості організму вітаміном D₃ є вміст 25ОНD₃ у сироватці крові, який у нормі становить 100–150 нмоль/л, а за розвитку вітаміну D₃-дефіцитних станів може знижуватись до рівня менше ніж 50 нмоль/л. Вміст 25ОНD₃ нижче 75 нмоль/л характеризується як D-гіповітаміноз, нижче 50 нмоль/л — вітамінна недостатність і нижче 30 нмоль/л — глибокий дефіцит вітаміну D₃ [3]. Отже, визначення рівня цього гідроксильованого похідного згідно з висновками провідних спеціалістів є вкрай важливим як для характеристики стану забезпеченості організму вітаміном D₃, так і для оптимізації призначення препаратів вітаміну D₃.

Враховуючи наведені вище дані, розроблення тест-систем, які б давали змогу визначити рівень 25ОНD₃ у біологічному матеріалі, є перспективним напрямом біомедичних досліджень. Однак проблемою створення таких тест-систем є саме етап отримання антитіл до

активної форми холекальциферолу, оскільки останній не є імуногенною сполукою з розміром молекули, недостатнім для того, аби бути розпізнаним імунною системою. Крім того, 25ОНD₃ є сполукою, яка в нормі синтезується в організмі більшості тварин, зокрема й тих, які підлягають імунізації для продукування антитіл проти 25ОНD₃, що створює додаткові перешкоди для отримання специфічних імуноглобулінів.

З метою вирішення цієї проблеми вже розроблено методи та методичні підходи, що дають змогу створювати імунокон'югати типу «гаптен–протеїновий носій». Імунізація ними лабораторних тварин уможливує отримання поліклональних сироваток та гібридом, які продукують моноклональні антитіла, що в подальшому може бути використано для розроблення імунодіагностикумів [11].

Отже, метою цієї роботи було синтезувати кон'югат похідного 25ОНD₃, що містить активну карбоксильну групу, з протеїном-носієм гемоціаніном молюска (KLH) для одержання поліклональних антитіл, які розпізнають 25ОНD₃, й порівняння титру цих антитіл у кролів та мишей, імунованих синтезованим кон'югатом. Для реалізації поставленої мети було вирішено такі завдання: 1 — отримано похідні 25ОНD₃ з активною карбоксильною групою; 2 — синтезовано кон'югат похідного 25ОНD₃, що містить активну карбоксильну групу, з протеїнами-носіями — гемоціаніном молюска (KLH) та альбуміном курячого яйця (OVA); 3 — здійснено імунізацію кролів та мишей створеним кон'югатом 25ОНD₃ з гемоціаніном; 4 — охарактеризовано одержані поліклональні антисироватки методом непрямого імуноензимного аналізу, визначено титр імуноглобулінів до 25ОНD₃ та проведено порівняння ефективності вироблення специфічних імуноглобулінів у організмі мишей і кролів.

Матеріали і методи

Реагенти та обладнання

Для синтезу кон'югатів використовували 25-гідроксивітамін D₃ (Sigma, USA), абсолютний піридин (Sigma, USA), бурштиновий ангідрид (Sigma, USA), етилацетат (Sigma, USA), безводний сульфат натрію (Sigma, USA), безводний дихлорметан (Sigma, USA), N(3-диметиламінопропіл)-N'-етил-карбодимід (Sigma, USA), N-гідроксисукцинімід (Sigma, USA), гемоціанін (Sigma, USA) та альбумін курячого яйця (Sigma, USA).

Імунізацію кролів і мишей проводили з використанням повного й неповного ад'юванту Фрейнда (Sigma, USA).

Для здійснення ELISA-скрінінгу сироваток піддослідних тварин застосовували вторинні антикролячі та антимишачі антитіла, які розпізнають цілу молекулу IgG (Sigma, USA). Як субстрат для пероксидази хрому використовували ортофенілєндіамін (Sigma, USA). Високосорбційні 96-лункові планшети отримували від фірми Greiner Microolon. Спектрофотометричні вимірювання проводили на мікропланшетному ридері ER-500 (BioRad).

Синтез 25-гідроксिवітамін- D_3 -3-гемісукцинату

Для синтезу 25-гідроксивітамін- D_3 -3-гемісукцинату розчиняли наважку (10 мг, 25 мкмоль) 25-гідроксивітаміну D_3 в абсолютному піридині (1 мл) і перемішували за кімнатної температури в темряві упродовж 4 днів за присутності бурштинового ангідриду (125 мг, 1,25 мкмоль). До реакційної суміші додавали етилацетат (10 мл) і в кожному випадку промивали двічі водою та 0,1 М соляною кислотою. Органічну фазу висушували,

використовуючи безводний сульфат натрію (1 г), фільтрували й видаляли розчинник під вакуумом. Залишкову тверду масу висушували під глибоким вакуумом. У результаті реакції отримували безбарвну тверду речовину (рис. 1).

Синтез 25-гідроксивітамін- D_3 -3-гемісукцинат- N -гідроксисукцинімідного ефіру

На наступному етапі отриманий 25-гідроксивітамін D_3 -3-гемісукцинат розчиняли в безводному дихлорометані (7 мл) і змішували з N -гідроксисукцинімідом (2,76 мг, 24 мкмоль) та N (3-диметиламінопропіл)- N' -етил-карбодімідом (EDC) (3,72 мг, 24 мкмоль). Суміш перемішували упродовж ночі під аргоном. Потім органічну фазу двічі промивали водою, висушували за допомогою безводного сульфату натрію та фільтрували. Розчинник видаляли під вакуумом і отриманий продукт висушували упродовж ночі під глибоким вакуумом. Таким чином отримували 25-гідроксивітамін D_3 -3-гемісукцинат- N -гідроксисукцинімідний ефір, який використовували для кон'югування без подальшого очищення (рис. 2).

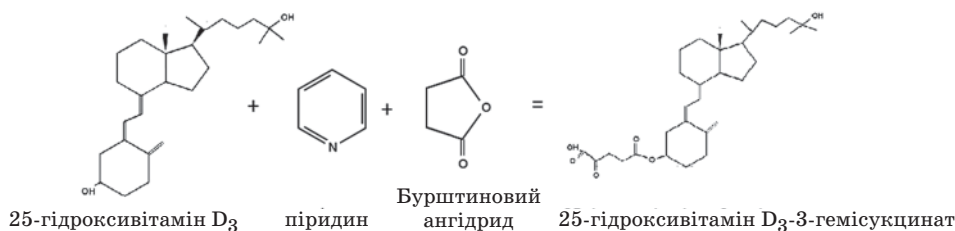


Рис. 1. Синтез 25-гідроксивітамін- D_3 -3-гемісукцинату

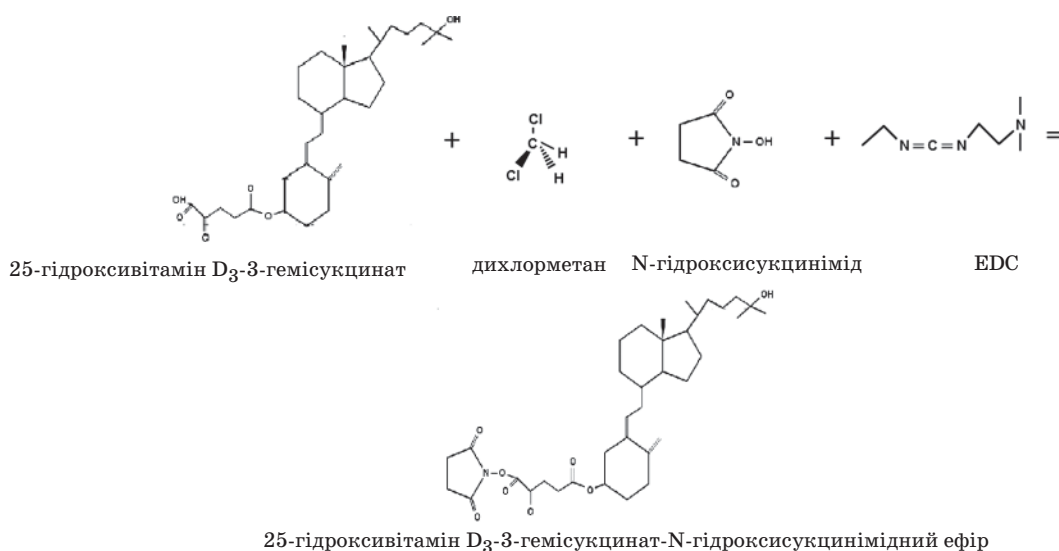


Рис. 2. Синтез 25-гідроксивітамін- D_3 -3-гемісукцинат- N -гідроксисукцинімідного ефіру

Синтез 25-гідроксिवітамін-D₃-3-гемісукцината-KLH

Для синтезу кон'югата 25-гідроксивітамін-D₃ з гемоціаніном або з альбуміном курячого яйця наважку протеїну (64 мг) розчиняли в 0,1 М К-фосфатному буфері, рН 8,0 (12,5 мл), та додавали N-гідроксисукцинімідний ефір (6 мг) в DMSO (1,3 мл). Суміш перемішували упродовж ночі за кімнатної температури (рис. 3).

Очищення кон'югатів

Одержані продукти очищували гель-фільтрацією на колонці Econo-Pac 10DG, об'ємом 0,01 л, врівноваженій в 0,1 М К-фосфатному буфері, рН 7,0. Колонку промивали К-фосфатним буфером (рН 7,0), використовуючи об'єм буфера, що дорівнює двом об'ємам колонки. Отриманий кон'югат об'ємом 6,5 мл вносили до колонки, збираючи фракції в конічні пробірки об'ємом 1 мл кожна. Фракції, що містили кон'югований протеїн, детектували за 256 нм [11].

Тонкошарова хроматографія продуктів омилення 25-гідроксивітамін-D₃-3-гемісукцинат-KLH/OVA

Принцип методу полягає в омилуванні препарату за допомогою спиртового розчину КОН, екстрагуванні 25ОНD₃ гексаном, аналізі екстракту тонкошаровою хроматографією в системі розчинників та ідентифікації в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм з наступним фарбуванням плям сумішню FeCl₃ у 50% H₂SO₄. Кількість 25ОНD₃ визначали за стандартом, вираховуючи площу піків.

Для омилування в колбу вносили 0,2 мл (0,714 мг) розчину кон'югата, додавали 2 мл фосфатного буфера (рН 7,4), вносили 300 мг антиоксиданту (аскорбінової кислоти). Антиоксидант додавали до проби перед внесенням КОН. Далі вносили 10 мл 10 М розчину гідроксиду калію в метанолі. Омилування проводили за кімнатної температури протягом 12 год без доступу світла.

Під час екстрагування для уникнення утворення емульсії до омилуваного розчину додавали дистильовану воду, щоб співвідношення спирту до води було 1:1. 25ОНD₃ екстрагували з охолодженої суміші гексаном. У ділильну воронку додавали 10 мл гексану та струшували упродовж 5 хв. Після розділення шарів гексановий шар відбирали. Екстрагування повторювали тричі. Гексанові фракції об'єднували, промивали дистильованою водою до нейтральної реакції промивної води, висушували над сульфатом натрію протягом 40 хв і фільтрували. Отримані екстракти упарювали на роторному випаровувачі за температури водяної бані 40 °С до сухого залишку, який потім розчиняли в 0,2 мл гексану.

Для проведення хроматографії на лінію старту пластини «Силуфол-254» розміром 15×15 см наносили 0,1 мл та 0,5 мл розчину проби (2 точки) і три точки стандартного розчину по 20, 10 та 5 мкг 25ОНD₃ в 0,1 мл. Пластинку висушували на повітрі протягом 3 хв. Потім її вміщували в камеру із сумішню розчинників бензол:ацетон (93:7) та проводили хроматографію. Коли фронт розчинника доходив до кінця пластинки, її виймали й висушували протягом 20 хв. Позначали плями, що відповідали 25ОНD₃, проглядаючи пластину в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм, з наступним проявленням за допомогою розчину FeCl₃ у 50% H₂SO₄. Кількість 25ОНD₃ визначали за стандартом, аналізуючи площу піків.

Імунізація мишей кон'югатом 25ОНD₃-гемісукцинат-KLH та отримання поліклональних сироваток

Для імунізації використовували білих мишей-самиць лінії Balb/c масою 18–20 г. Тварин утримували у стандартних клітках на стандартному раціоні віварію.

Серед фракцій отриманого кон'югата обирали ті, у яких співвідношення протеїну до 25ОНD₃ було найвищим. Під час першої іму-

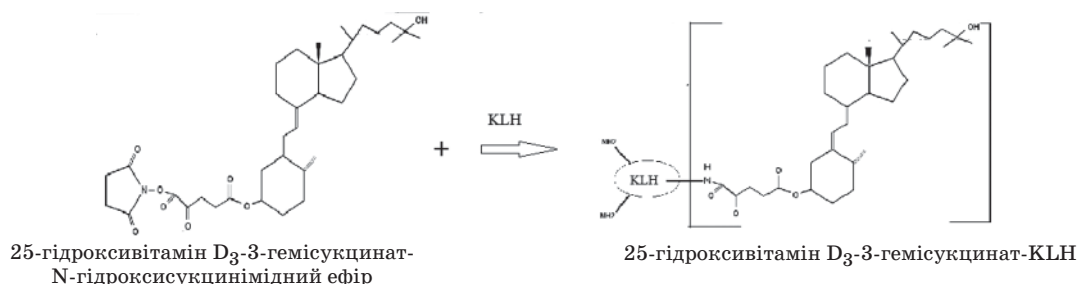


Рис. 3. Синтез 25-гідроксивітамін-D₃-3-гемісукцинат-KLH

нізації синтезований кон'югат 25OHD₃-KLH розводили у фосфатному буфері (рН 7,4) з розрахунку 100 мкг протеїну на 100 мкл PBS. До отриманого об'єму додавали повний ад'ювант Фрейнда (CFA) у співвідношенні 1:1. Мишей імунізували, вводячи у черевну порожнину 200 мкл отриманої стабільної емульсії. Наступні чотири імунізації проводили за описаною вище схемою, замінюючи CFA на неповний ад'ювант Фрейнда (IFA). Інтервал між імунізаціями становив 21 день. Через тиждень після останньої імунізації у мишей відбирали кров із хвоста й одержували сироватку. Для визначення титру імуноглобулінів до 25OHD₃ проводили імуноензимний аналіз. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали під легким ефірним наркозом згідно з правилами поводження з лабораторними тваринами.

Імунізація кролів кон'югатом 25OHD₃-гемісукцинат-KLH та одержання поліклональних сироваток

Для імунізації використовували двох дорослих кролів-самців масою 3,5–4 кг, яких утримували за стандартних умов віварію.

Першу імунізацію здійснювали за такою схемою. Розрахований об'єм розчину кон'югата, що містив 100–150 мкг антигену (за вмістом протеїну) доводили до 1000 мкл PBS (рН 7,4), додавали 1000 мкл CFA, після чого емульгували. Отриману емульсію вводили підшкірно вздовж хребта кроля, обираючи по 4 точки з кожного боку від хребта на відстані 1 см одна від одної. Другу імунізацію проводили через 8 тижнів, а третю — через 1 міс після другої. Далі відбирали кров із вуха кроля й отримували сироватку для подальшого визначення титру імуноглобулінів за допомогою імуноензимного аналізу. Усі маніпуляції проводили під легким ефірним наркозом згідно з правилами поводження з лабораторними тваринами.

Проведення непрямого імуноензимного аналізу ELISA для оцінювання титру антитіл до 25OHD₃ у сироватці крові кролів та мишей

У полістиролові 96-лункові плоскодонні планшети вносили кон'югат 25OHD₃-OVA, який попередньо розчиняли у фосфатному буфері (PBS, рН 7,4) з розрахунку 1 мкг/100 мкл та інкубували упродовж ночі за 4 °С. Після інкубування лунки планшета промивали тричі Твін-фосфатним буфером (PBST, PBS + 0,1% Tween20), додаючи до кожної лунки 200–300 мкл останнього. Далі лунки планшета відмивали за цією самою схемою після

кожного етапу інкубування. Вільні центри зв'язування блокували, додаючи в кожну лунку PBST з розрахунку 200 мкл на лунку й інкубували протягом 1 год за 37 °С. Робили серію розведень 1:100–1:1 000 000 для сироватки крові кролів та 1:100–1:1 600 для сироватки крові мишей. З метою контролю специфічності імуноної відповіді паралельно проводили аналіз сироваток неімунізованих тварин.

Вносили по 100 мкл кожного розведення сироватки у дві паралельні лунки та інкубували впродовж 1 год за 37 °С. Потім додавали відповідні вторинні антитіла (розведення 1:1 000, 0,1 мл на лунку) (Sigma, USA) та інкубували 1 год за 37 °С. Специфічне комплексоутворення «антиген-антитіло» визначали за допомогою кольорової реакції з використанням ортофенілєндіаміну (OPD): 2 мг OPD розчиняли у 4 мл К-фосфатного буфера (рН 6,0) з подальшим додаванням 8 мкл H₂O₂, вносячи по 100 мкл розчину субстрату в лунку. Реакцію зупиняли через 30 хв, додаючи 4н H₂SO₄ (50 мкл на лунку). Детектування сигналу проводили на ридері ER-500 (BioRad) за довжини хвилі 492 нм.

Результати та обговорення

На сьогодні антитіла широко застосовують для вирішення багатьох актуальних проблем біології та медицини. Ключовим етапом у процесі отримання антитіл до неімуногенних сполук малого розміру є синтез кон'югата гаптену з імуногенним носієм [12–15]. Синтезованим імуногенним кон'югатом здійснюють імунізацію тварин (зазвичай це кролі, миші, вівці, щури) для одержання сироватки або селезінки. З метою отримання поліклональних імуноглобулінів (PABs) імунізують зазвичай великих тварин, таких як кролі, вівці. Поліклональні антитіла мають низку як переваг, так і недоліків. До переваг можна віднести відносно дешевизну їх одержання, зумовлену можливістю достатньо швидкого отримання значної кількості поліклональних антитіл порівняно з моноклональними антитілами; здатність реагувати з різними епітопами однієї і тієї самої молекули. Серед недоліків PABs можна виділити такі: вміст поліклональних антитіл до конкретного антигену може змінюватися від партії до партії отриманої антисироватки; поліклональні антитіла не можна використовувати у дослідженнях, метою яких є виявлення відмінностей та/або визначення вмісту споріднених молекул.

Вибір протеїну-носія для кон'югування з 25ОНD₃

Ключовою проблемою під час отримання антитіл до малих молекул є те, що останні є гаптенами, тобто молекулами, які не мають імуногенності й набувають її лише в комплексі з протеїном-носієм. Уперше гаптени було описано в 1945 р. у роботі Карла Ландштайнера. Протеїном-носієм слугує молекула, яка сама по собі може викликати імунну відповідь. Традиційно як носії використовують молекули великих протеїнів. Після того як в організмі тварини утворюються антитіла до пари гаптен-носіїв, гаптени можуть також зв'язуватися з антитілом, але самі гаптени не здатні ініціювати імунну відповідь. Іноді гаптени можуть навіть блокувати імунну відповідь на кон'югат гаптену з носієм; цей процес має назву «гаптенне інгібування». Причини відсутності імунної реакції можуть бути різними і включати складні імунологічні механізми, одним з яких може виступати відсутність або недостатність коstimуляторних сигналів від антигену, що представлений клітинами антигенпрезентувального ряду. Для правильного обрання носіїв слід враховувати такі їхні характеристики [15]:

1. *Розмір.* Протеїни, що мають розміри більші за 60 кДа, є кращими носіями, ніж менші молекули, оскільки вони містять більшу кількість функціональних груп (-NH₂, -SH, -COOH і т. д.), придатних для процесу кон'югування з гаптенем. Зазвичай великий розмір дає змогу приєднувати до однієї молекули-носія значну кількість молекул гаптену.

2. *Генетична віддаленість обраної для імунізації тварини.* Як протеїн-носіїв використовують гемоціанін лімфи молюска (KLH), великий протеїн червононогих, яким імунізують мишей, кролів, кіз, овець та ін. Іншими молекулами, широко застосовуваними як носії, є група протеїнів бактеріального походження: правцевий токсин (TT), очищений токсин туберкульозу (PPD) і дифтерійний анатоксин. Менш ефективними для ссавців є альбумін курячого яйця (OVA) і бичачий сироватковий альбумін (BSA), ймовірно, через толерантність організмів ссавців до цих висококонсервативних протеїнів.

Ще одним протеїном, який використовують як носій, є курячий γ -глобулін (CGG). Протеїн є досить імуногенним для мишей, але його суттєвий недолік полягає в тому, що CGG містить важливий імунодомінантний епітоп, наявність якого сприяє виробленню антитіл, які перехресно реагують з імуноглобулінами людини.

Отже, властивості протеїну-носія можуть суттєво впливати на результати імунізації. Оскільки нашою метою було отримання великої кількості сироватки з якомога вищим титром імуноглобулінів до 25ОНD₃, то насамперед ми провели порівняння імуногенних властивостей можливих протеїнів-носіїв, враховуючи вищенаведені характеристики. Як носій було обрано KLH, адже великі протеїни (> 600 кДа) мають притаманну самій молекулі ад'ювантну активність, що сприяє інтенсифікації імунної відповіді. Крім вищезазначеного, гемоціанін молюсків містить значну кількість доступних для кон'югування груп і є генетично віддаленим від тварин, яких імунізують (кролі, миші). Також у структурі KLH містяться Т-клітинні епітопи, які можуть бути представлені молекулами МНС класу II різних видів тварин, що є вкрай важливим для розвитку повноцінної імунної відповіді.

Для подальшого проведення імуноензимного аналізу було синтезовано кон'югат 25-гідроксिवітаміну D₃ з OVA [16]. Хоча альбумін курячого яйця і має порівняно велику молекулярну масу (45 кДа, 385 а.к.з.), використання його як імуногенного протеїну-носія вважали недоцільним, оскільки OVA є менш еволюційно віддаленим від протеїнів кроля, ніж KLH [17]. Цей кон'югат було застосовано для тестування сироваток як покриття лунок планшета з метою запобігання крос-реактивності імуноглобулінів з протеїном-носієм (KLH).

Вибір способу кон'югування 25ОНD₃ з KLH/OVA

Наступним кроком було обрання шляху синтезу кон'югатів 25-гідроксивітаміну D₃-KLH/OVA. На сьогодні відомо декілька методів кон'югування молекул-гаптенів із протеїнами носіями: модифікований карбодимідний метод з використанням EDC [18], глутаральдегідний метод [19], модифікований карбодимідний метод активних ефірів [20, 21], модифікований формальдегідний метод [22], приєднання через полігліциновий лінкер (Gly4) [23] та ін.

Для нашого дослідження обрали модифікований карбодимідний метод з використанням N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етил-карбодиміду (EDC). Цю сполуку в хімічному синтезі використовують для активації карбоксильної групи [24] молекули, що бере участь у реакції, для подальшого утворення амідного зв'язку. Однією з переваг методу є можливість проводити реакцію у водних та спиртових розчинах. Це важливо у разі

використання нерозчинних у воді гаптенів, до яких належить обраний нами цільовий антиген — 25OHD_3 . EDC можна застосовувати як для водних розчинів, так і для роботи з органічними розчинниками, тимчасом як його аналог — дициклогексил-карбодимід — лише для органічних. В основі дії карбодимідів лежить активація карбоксильної групи для прямої реакції з первинними амінами і подальшим утворенням амідного зв'язку. Оскільки жодна з частин карбодиміду не стає в кінцевому підсумку частиною кон'югата, ці сполуки називають «нульовими» крослінкерами (zero-length carboxyl-to-amine crosslinkers).

Для введення карбоксильної групи у третьому положенні 25OHD_3 було використано N-гідроксисукцинімід.

Спектрофотометричний аналіз одержаних кон'югатів $25\text{OHD}_3\text{-KLH/OVA}$

Для характеристики отриманих кон'югатів застосовували спектрофотометричний метод, який базується на вивченні спектрів поглинання молекул в ультрафіолетовій (200–400 нм), видимій (400–760 нм) та інфрачервоній (> 760 нм) ділянках світлового спектра [15, 22, 24, 25].

Було обрано спосіб детекції за наявності саме карбоксильного похідного 25-гідроксिवітаміну D_3 у складі кон'югата, оскільки його ультрафіолетова абсорбція ґрунтується на хімічній особливості стероїдів групи вітамінів D — наявності спряженої трієнової системи подвійних зв'язків та поглинанні в УФ-спектрі за 256 нм.

На рис. 4. показано криву елюції продуктів кон'югування 25-гідроксिवітаміну D_3 з гемоціаніном, що містить два піки. Перший пік відповідає синтезованому кон'югату, а другий — 25-гідроксिवітаміну D_3 -3-гемісукцинат-N-гідроксисукцинімідному ефіру, який не прореагував з протеїном-носієм.

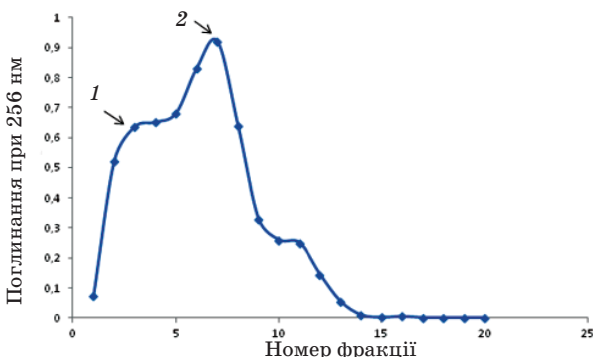


Рис. 4. Крива елюції кон'югата 25OHD_3 з гемоціаніном

Тут і далі наведено результати типового експерименту.

Отримані фракції, які відповідають кон'югату 25-гідроксिवітаміну D_3 з KLH, об'єднували і додавали гліцерол (кінцева концентрація 20%). Було одержано піщано-сірий опалесцюючий розчин, який використовували для імунізації кролів та мишей.

Рис. 5 демонструє криву елюції продуктів кон'югування 25OHD_3 з альбуміном курячого яйця (OVA). Чітко можна зафіксувати вихід з колонки також двох продуктів, що відображається у наявності двох піків на графіку. Це можна пояснити наявністю двох продуктів в аналізованій суміші.

Перший пік відповідає виходу цільового кон'югата $25\text{OHD}_3\text{-OVA}$, а другий — 25-гідроксिवітаміну D_3 -3-гемісукцинат-N-гідроксисукцинімідному ефіру, який не прореагував з протеїном-носієм.

Фракції, які містили цільовий кон'югат, об'єднували, додавали до них гліцерол з кінцевою концентрацією 20% та зберігали в холодильнику за -20°C до подальшого використання.

Тонкошарова хроматографія продуктів омилення 25OHD_3 -гемісукцинат KLH/OVA

З метою оцінювання достовірності та ефективності синтезу було здійснено перевірку кількості залишків гаптену, включених у кон'югат. Для цього проводили розділення продуктів омилення кон'югата методом тонкошарової хроматографії. Розрахунок кількості 25-гідроксिवітаміну D_3 за площею плям на хроматографії показав, що у складі 238 мкг кон'югата з гемоціаніном міститься 3 мкг 25-гідроксिवітаміну D_3 (рис. 6, А). Молярне співвідношення стероїду до гемоціаніну становить приблизно 10/1. Для кон'югата з альбуміном курячого яйця розрахунок площі плям показав, що в складі 202 мкг кон'югата міститься 0,75 мкг 25-гідроксивітаміну D_3 (рис. 6, В). Молярне співвідношення

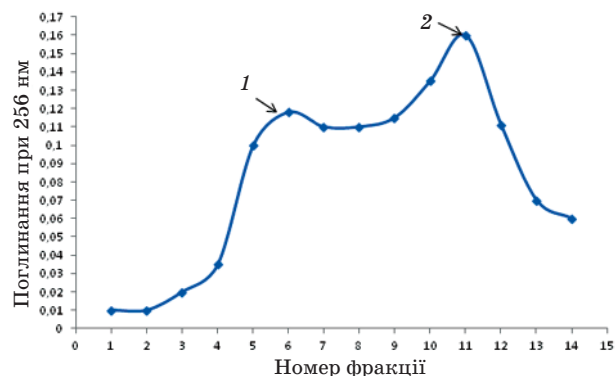


Рис. 5. Крива елюції кон'югата 25OHD_3 з альбуміном курячого яйця

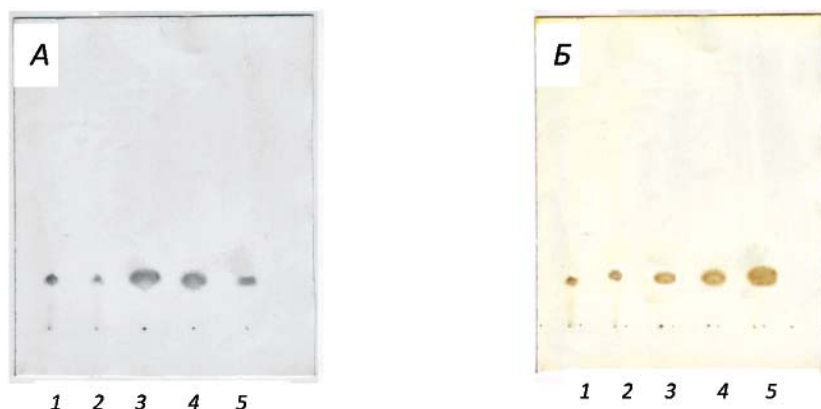


Рис. 6. Результати тонкошарової хроматографії продуктів омилення кон'югата $25\text{OH}\text{D}_3$ з (А) гемоціаніном (25-гідроксिवітамін D_3 -3-гемісукцинат-гемоціанін), (Б) овальбуміном (25-гідроксивітамін D_3 -3-гемісукцинат-овальбумін):

- А: 1 — $25\text{OH}\text{D}_3$, що міститься в 238 мкг кон'югата; 2 — $25\text{OH}\text{D}_3$, що міститься в 119 мкг кон'югата; 3 — 30 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$; 4 — 20 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$; 5 — 10 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$;
 Б: 1 — $25\text{OH}\text{D}_3$, що міститься в 181 мкг кон'югата; 2 — $25\text{OH}\text{D}_3$, що міститься в 202 мкг кон'югата; 3 — 2,5 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$; 4 — 5 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$; 5 — 10 мкг $25\text{OH}\text{D}_3$

стероїду до овальбуміну також становить приблизно 10/1. Таким чином, для подальшої роботи нами було обрано фракції обох кон'югатів, де співвідношення протеїн-носій/гаптен було найбільшим.

Визначення титру імуноглобулінів до $25\text{OH}\text{D}_3$ у сироватці крові кролів та мишей

Для характеристики рівня синтезу специфічних імуноглобулінів до $25\text{OH}\text{D}_3$ визначали титр антитіл. Як відомо, титр — це найбільше розведення сироватки крові, яке дає змогу детектувати сигнал за допомогою будь-якого серологічного методу. Для того щоб визначити титр антитіл до $25\text{OH}\text{D}_3$, ми застосовували метод непрямого імуноензимного аналізу. У лунки 96-лункового полістиролового планшета вносили кон'югат $25\text{OH}\text{D}_3$ -OVA, аби запобігти перехресному реагуванню імуноглобулінів сироватки з гемоціаніном, який є протеїном-носієм у синтезованому кон'югаті для імунізації.

Результати аналізу сироватки крові мишей подано на рис. 7. Вони чітко демонструють наявність імунної відповіді на введення кон'югата $25\text{OH}\text{D}_3$ -KLH та наявність антитіл до даного кон'югата в крові мишей. У трьох з п'яти імунізованих тварин імуна відповідь не була інтенсивною, і середній титр становив 1:400. Титр специфічних імуноглобулінів у сироватці двох інших тварин становив у середньому від 1:1 000 до 1:1 600. Таку різницю можна пояснити високою спорідненістю гаптену ($25\text{OH}\text{D}_3$) до організму миші та, як наслідок, слабким розвитком імунної відповіді на цю молекулу. Реакція імунної

системи мишей на протеїн-носій була значно вищою, ніж на $25\text{OH}\text{D}_3$, що й очікувалось, оскільки гемоціанін є генетично віддаленою від організму молекулою обраних тварин (дані не наведено).

На рис. 8 подано дані аналізу титру антитіл до $25\text{OH}\text{D}_3$ імунної сироватки кролів, що їх отримано методом непрямого імуноензимного аналізу ELISA. Нами продемонстровано, що в обох піддослідних тварин наявна реакція імунної системи на пару гаптен-носій. Для молекули-носія сигнал був вищий, ніж для молекули-гаптену, що пояснюється генетичною віддаленістю молекули KLH від організму кроля (дані не наведено).

Окрім того, можна стверджувати, що у крові обох піддослідних кролів були наявні антитіла до $25\text{OH}\text{D}_3$. На основі титрувальних кривих достовірно визначено титр імуноглобулінів сироватки крові кролів до $25\text{OH}\text{D}_3$, який становить від 1:1000 до 1:10000.

Порівнюючи отримані дані для тварин різного виду, виявили, що в сироватці крові кролів титр до $25\text{OH}\text{D}_3$ вищий, ніж у мишей. Таку різницю можна пояснити імунологічними відмінностями біологічних видів, до яких належать досліджувані тварини.

Окрім того, для кролів та мишей було застосовано різні схеми імунізації, що також істотно впливає на реакцію імунної системи. Як зазначено вище, СФА використовували лише для першої імунізації мишей. У подальшому його заміняли на ІФА. Схема імунізації кролів передбачала повторне використання СФА для бустерних імунізацій, що, ймовірно, й зумовило більш істотну реакцію

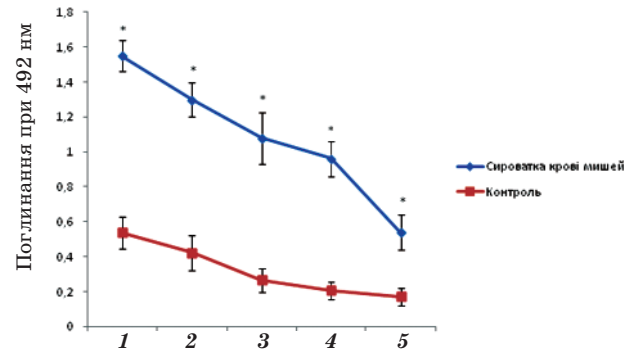


Рис. 7. Узагальнювальна крива титрування сироватки мишей, імунізованих 25ОНD₃-КЛН, що її отримано методом ELISA в серії розведень: 1 — 1/100; 2 — 1/200; 3 — 1/400; 4 — 1/800; 5 — 1/1 600
Тут і далі: * — $P < 0,05$ порівняно з контролем

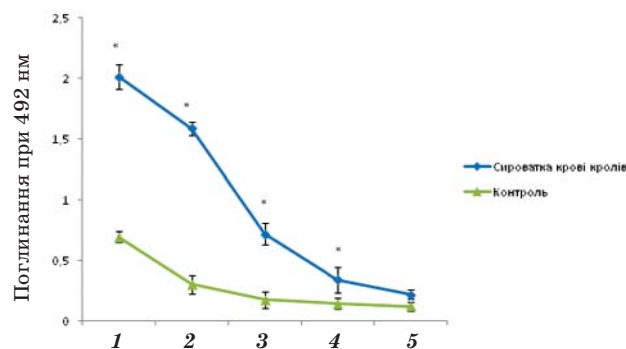


Рис. 8. Титр антигін до 25ОНD₃ у сироватці крові кролів, імунізованих 25ОНD₃-КЛН у серії розведень: 1 — 1/100; 2 — 1/1 000; 3 — 1/10 000; 4 — 1/100 000; 5 — 1/1 000 000

імуноної системи на пару гаптен–носії і, як наслідок, вищий титр імуноглобулінів до 25ОНD₃ у сироватці крові кролів.

Таким чином, нами було проаналізовано різні методи кон'югування гаптенів з протеїнами-носіями, підібрано оптимальний носій для подальшої імунізації кролів та мишей, а також синтезовано кон'югати 25ОНD₃-КЛН/OVA. Проведено імунізацію тварин

отриманим кон'югатом та визначено титр антигін до 25ОНD₃ у сироватці крові тварин. Показано, що імунона система як сірих кролів, так і білих мишей лінії Balb/c реагує на кон'югат 25ОНD₃-КЛН. Титр специфічних імуноглобулінів до 25ОНD₃ є вищим у кролів, що може бути наслідком застосування різних схем імунізації тварин.

REFERENCES

1. Cooper H. M., Paterson Y. Production of polyclonal antisera. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2001, 2 (2.4), 1–10. doi: 10.1002/0471142735.im0204s13.
2. Zegers N. D. Synthetic peptides for antibody production. *Thesis Erasmus Universiteit Rotterdam.* 1995, 248 p.
3. Dobnig H. A review of the health consequences of the vitamin D deficiency pandemic. *J. Neurol. Sci.* 2011, 311 (1–2), 15–18. doi: 10.1016/j.jns.2011.08.046.
4. Wacker M., Holick M. F. Vitamin D — effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients.* 2013, 5 (1), 111–148. doi: 10.3390/nu5010111.
5. Wang Y., Zhu J., DeLuca H. F. Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 523 (1), 123–133. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001.
6. Haussler M. R., Jurutka P. W., Mizwicki M., Norman A. W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α , 25(OH)₂vitamin

- D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011, 25 (4), 543–559. doi: 10.1016/j.beem.2011.05.010.
7. Takeyama K., Kato S. The vitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D₃. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75 (2), 208–213.
 8. White J. H. Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 523 (1), 58–63. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.006.
 9. Guillot X., Semerano L., Saldenbergh-Kernach N., Falgarone G., Boissier M. C. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine.* 2010, 77 (6), 552–557. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.09.018.
 10. Ananthakrishnan A. N., Khalili H., Higuichi L. M., Bao Y., Korzenik J. R., Giovannucci E. L., Richter J. M., Fuchs C. S., Chan A. T. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2012, 142 (3), 482–489. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.040.
 11. Huber E., Becker J., Kraus W., Kyriatsoulis A., Vogel R., Horn N., Antibodies against 25-hydroxyvitamin D. *European Patent 1 931 711 B1*, April 8, 2009.
 12. Stokes A. N., Williams B. L., French S. S. An improved competitive inhibition enzymatic immunoassay method for tetrodotoxin quantification. *Biol. Proced. Online.* 2012, 14 (3), 1–5. doi: 10.1186/1480-9222-14-3.
 13. Prakasha K. C., Raghavendra G. M., Horisa R., Chang Gowda D. Design, synthesis and antimicrobial screening of amino acid conjugated 2-amino 4-aryltiazole derivatives. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011, 3 (3), 120–125.
 14. Chun L., Xiaoping Y., Guangrong H., Hong W. Preparation and characterization of antigenic properties of gramicidin A- keyhole limpet hemocyanin and gramicidin A- ovalbumin conjugates. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8 (24), 7051–7058.
 15. Huisman H., Wynveen P., Setter P. W. Studies of the immune response and preparation of antibodies against a large panel of conjugates neurotransmitters and biogenic amines: specific polyclonal antibody response and tolerance. *J. Neurochem.* 2010, 112 (3), 829–841. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06492.x.
 16. Maleimidyl activated Protein Carriers Available at: <http://www.interchim.fr/ft/8/86695A.pdf> (accessed 15 February 2013)
 17. Hu K., Huang X., Jiang Y., Qiu J., Fang W., Yang X. Influence of hapten density on immunogenicity for anti-ciprofloxacin antibody production in mice. *BioSci. Trends.* 2012, 6 (2), 52–56.
 18. Suárez A. M., Rodri'guez J. M., Hernández P. E., Azcona-Olivera J. I. Generation of polyclonal antibodies against nisin: Immunization strategies and immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62 (6), 2117–2121.
 19. Zhao C., Liu W., Ling H., Lu S., Zhang Y., Liu J., Xi R. Preparation of Anti-gatifloxacin Antibody and Development of an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Gatifloxacin Residue in Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55 (17), 6879–6884.
 20. Hong J. Y., Kim J.-H., Choi M. J. Hapten synthesis and Influence of coating ligands on Enzyme-linked Immunoreaction of DDT. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2002, 23 (10), 1413–1419.
 21. Zhou Y., Li Y. S., Pan F. G., Liu Z. S., Wang Z. Identification of tetrodotoxin antigens and a monoclonal antibody. *Food Chem.* 2009, V. 112, P. 582–586. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.022.
 22. Pravetoni M., Naour M. L., Harmon T. M., Tucker A. M., Portoghese P. S., Pentel P. R. An oxycodone conjugate vaccine elicits drug-specific antibodies that reduce oxycodone distribution to brain and hot-Plate analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012, 341 (1), 225–232. doi: 10.1124/jpet.111.189506.
 23. Jiang Y., Huang X., Hu K., Yu W., Yang X., Lv L. Production and characterization of monoclonal antibodies against small hapten-ciprofloxacin. *Afr. J. Biotechnol.* 2011, 10 (65), 14342–14347. doi: 10.5897/AJB11.1546.
 24. Harlow E., Lane D. Antibodies. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory.* 1988, 726 p.
 25. Li Z., Song S., Xu L., Kuang H., Guo S., Xu C. Development of an Ultrasensitive Immunoassay for Detecting Tartrazine. *Sensors.* 2013, 13 (7), 8155–8169. doi: 10.3390/s130708155.

**СИНТЕЗ КОНЪЮГАТА
25-ГИДРОКСИВИТАМИНА D₃
С ГЕМОЦИАНИНОМ МОЛЛЮСКА
И ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННЫХ
СЫВОРОТОК**

*А. А. Мазанова
И. А. Шиманский
Д. Н. Петухов
Л. Б. Дробот
Н. Н. Великий
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: ann.mazanova@gmail.com

Целью работы было получение поликлональных антител, распознающих 25-гидроксивитамин D₃, для их дальнейшей характеристики и использования в иммунохимических тест-системах определения содержания 25-гидроксивитамина D₃ в сыворотке крови. Были применены методы химического синтеза иммуноконъюгатов (модифицированный карбодиимидный метод с использованием N'-этил-карбодиимида), тонкослойной хроматографии и гель-фильтрации, а также непрямого иммуноэнзимного анализа ELISA. Описаны этапы синтеза иммуноконъюгата 25-гидроксивитамина D₃ с гемоцианином моллюска KLH, который использовали для получения иммунных сывороток. В результате иммунизации мышей и кролей были получены антисыворотки, в которых определяли титры антител против 25-гидроксивитамина D₃ методом иммуноэнзимного анализа. Было продемонстрировано, что титр специфических антител выше у кролей по сравнению с мышами. Полученные поликлональные антитела могут быть использованы для создания иммунохимических тест-систем для скринингового определения содержания 25-гидроксивитамина D₃ в сыворотке крови человека как маркера обеспеченности организма витамином D₃.

Ключевые слова: 25-гидроксивитамин D₃, гаптены, иммуноэнзимный анализ, поликлональные антитела.

**SYNTHESIS OF 25-HYDROXYVITAMIN D₃
CONJUGATE WITH KEYHOLE LIMPET
HEMOCYANIN AND OBTAINING
OF IMMUNE SERA**

*A. O. Mazanova
I. O. Shymanskyi
D. M. Petukhov
L. B. Drobot
M. M. Veliky
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry of the
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: ann.mazanova@gmail.com

The study was aimed at obtaining polyclonal antibodies that recognize 25-Hydroxyvitamin D₃, for their further specifications and applications in immunochemical test systems of 25-Hydroxyvitamin D₃, determination in blood serum. We used the methods of chemical synthesis of immunoconjugates (modified carbodiimide method using N'-ethyl carbodiimide), thin layer chromatography, gel filtration and indirect immunoenzyme analysis ELISA. The work describes the stages of the synthesis of 25-Hydroxyvitamin D₃, immunoconjugate with keyhole limpet hemocyanin (KLH), which was used for receiving immune sera. As a result of mouse and rabbit immunization antisera were obtained and antibody titers against 25-Hydroxyvitamin D₃, were tested by immunoenzyme assay. It was demonstrated that the titer of specific antibodies was higher in rabbits compared with mice. The resulting polyclonal antibodies can be used for the development of immunochemical test systems for screening studies of 25-Hydroxyvitamin D₃, content in human blood serum as a marker of vitamin D₃ availability.

Key words: 25-Hydroxyvitamin D₃, haptens, immunoenzyme analysis, polyclonal antibodies.