



УДК 577.112:612.115

© 2011

О. П. Костюченко, І. М. Колеснікова, Л. М. Литвинова,
Т. А. Кошель, Н. Е. Луговська,
член-кореспондент НАН України Е. В. Луговської,
академік НАН України С. В. Комісаренко

Моноклональні антитіла, які розпізнають нову антигенну детермінанту на D-димері фібрину людини

Отримано гібридому, яка продукує моноклональні антитіла (монАТ) I-1D, що належать до ізотипу Ig G1, K_D для них з D-димером становить $5,0 \cdot 10^{-10}$ моль/л. За результатами непрямого та конкурентного тІФА, монАТ I-1D добре реагують з D-димером, незначною мірою з D-фрагментом та не реагують з фібриногеном, фібрином desAABB і з E₃-фрагментом фібриногену. Імуноблотаналізом з відновленим D-димером виявлено, що епітоп монАТ I-1D розташований на β-поліпептидному ланцюзі (Bβ 134-461). У конкурентному тІФА монАТ I-1D та отримані нами раніше монАТ III-3B не конкурують за місце зв'язування на молекулі D-димеру, тому їх можна застосовувати для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини за допомогою бісайтового тІФА, латексного та імунохроматографічного методів.

D-димер є молекулярним маркером деградації фібрину, який формується при послідовній дії трьох ензимів: тромбіну, фактора XIIIa та плазміну. Тромбін на першому етапі відщеплює від фібриногену фібринопептиди A і B з утворенням фібрину, який зв'язує фактор XIII та плазміноген, на подальшому — тромбін активує фактор XIII з утворенням активної трансглютамінази — фактора XIIIa, який каталізує формування ковалентних зв'язків між D-доменами у полімерному фібрині. І нарешті, плазмін розщеплює прошитий фібрин із звільненням продуктів деградації фібрину, зокрема D-димеру. D-димер може існувати в продуктах деградації фібрину, які походять з розчинного фібрину, раніше, ніж він утворить тверду фазу, або після того, як фібринова сітка буде деградована плазміном [1]. Визначення D-димеру використовується для ранньої діагностики та моніторингу дисемінованої інтраваскулярної коагуляції, тромбозу глибоких вен, емболії легенів, інфаркту міокарда та ін. [2–5]. Відомо кілька гібридом, описаних в науковій та патентній літературі, що продукують моноклональні антитіла (монАТ) до D-димеру, проте питання щодо удосконалення та стандартизації тест-систем з їх використанням залишається невирішеним [6, 7].

Метою дослідження було отримання монАТ, що є специфічними до D-димеру фібрину, які б розпізнавали іншу антигенну детермінанту, ніж раніше отримані нами монАТ

до D-димеру III-3B, і які разом можна було б використати у бісайтовому твердофазному імуноферментному аналізі (тІФА) D-димеру в плазмі крові [8].

Як антиген для отримання специфічних монАТ був використаний D-димер у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР): 0,01 моль/л K^+ -фосфатний буфер з 0,14 моль/л NaCl, рН 7,4 [9]. Мишам лінії BALB/c вводили в черевну порожнину 100 мкг D-димеру у вигляді емульсії перший раз з повним, а через три тижні з неповним ад'ювантом Фрейнда. Через 10–14 днів визначали титр специфічних антитіл у сироватці крові імунізованих мишей за допомогою тІФА. Через 4–6 тижнів після останньої імунізації і за 4 доби до проведення гібридизації мишам вводили антиген у ЗФР. Для гібридизації брали клітини селезінки імунізованої миші та клітини мієломи X63-Ag8.653 (“Flow Laboratories”, Англія). До осаду суміші клітин впродовж 1 хв додавали 1 мл 50% поліетиленгліколю з молекулярною масою 1450 Да (“Sigma”). Через 1 хв клітини промивали поживним середовищем Хенкса методом центрифугування при 1 тис. об/хв. Осад клітин суспендували в селективному поживному середовищі RPMI 1640, яке містило 10^{-4} моль/л гіпоксантину, $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л аміноптерину, $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л тимідину (ГАТ), 20% ембріональної сироватки великої рогатої худоби, та розсівали в 24-лункові планшети. Через 10 днів у лунках з клітинами поживне середовище з ГАТ замінювали на поживне середовище з ГТ та проводили скринінг гібридом на наявність специфічних антитіл, використовуючи тІФА. Як антигени в лунках планшета адсорбували D-димер та фібриноген. Позитивні гібридами клоноували методом кінцевих розведень [10]. Частину клітин заморожували за загальноприйнятим методом, а частину культивували для нагромадження культуральної рідини. МонАТ виділяли з культуральної рідини методом афінної хроматографії на сефарозі з іммобілізованим протеїном G (“Amersham”, Швеція). Зв'язані з сорбентом монАТ елюювали 0,1 моль/л гліцин-HCl буфером, рН 3,0. Для запобігання процесу денатурації монАТ у кожну пробірку додавали 1 моль/л розчин K_2HPO_4 , щоб зсунути рН до нейтрального. Наявність білка у фракціях визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 280 нм. Діаліз і концентрування розчину антитіл проводили за допомогою ультрафільтрації на концентраторі (“Amicon”, США). Клас та субклас монАТ визначали за допомогою антисироваток до ізотипів імуноглобулінів миші (“Sigma”, США).

Було отримано кілька гібридом, які синтезували монАТ, що перехресно реагували з фібриногеном і D-димером, та одну гібридому, яка продукувала специфічні монАТ до D-димеру.

МонАТ є специфічними до D-димеру I-1D, належать до ізотипу Ig G1. Визначено константу дисоціації (K_D) цих монАТ у реакції з D-димером за допомогою непрямого конкурентного тІФА, як описано в роботах [11, 12]. K_D для монАТ I-1D становить $5,0 \cdot 10^{-10}$ моль/л.

Для попередньої локалізації епітопів монАТ I-1D використовували білки та їх фрагменти: фібриноген, фібрин desAABB, D-димер фібрину, D- й E-фрагменти фібриногену, що отримані в нашій лабораторії [13, 14]. Вказані білки та фрагменти в концентрації 10 мкг/мл адсорбували на полістиролових планшетах впродовж 18 год при 4 °C в оптимальних умовах для кожного антигену: для фібриногену — 0,02 моль/л амоній ацетатний буфер, рН 8,5; для фібрину цей самий буфер з додаванням сечовини до 3 моль/л, для D-димеру фібрину, D- й E-фрагментів фібриногену — 0,02 моль/л бікарбонатний буфер, рН 9,5. Після відмивання білків, які не адсорбувалися, в лунки планшета вносили очищені монАТ. Зв'язані з антигеном монАТ виявляли за допомогою мічених пероксидазою антитіл кроля до Ig G миші (“Sigma”, США). Результати тІФА для монАТ I-1D (рис. 1) свідчать про те, що ці антитіла добре реагують з D-димером, незначною мірою з D-фрагментом та не реагують з фібриногеном, фібрином desAABB і з E3-фрагментом фібриногену.

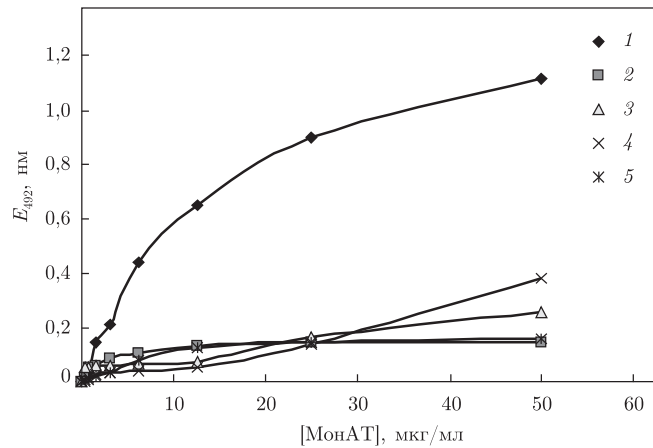


Рис. 1. Зв'язування іммобілізованих на планшеті D-димеру (1), фібриногену (2), фібрину desAABB (3), D- й E₃-фрагментів (відповідно 4 й 5) монАТ I-1D залежно від їх концентрації

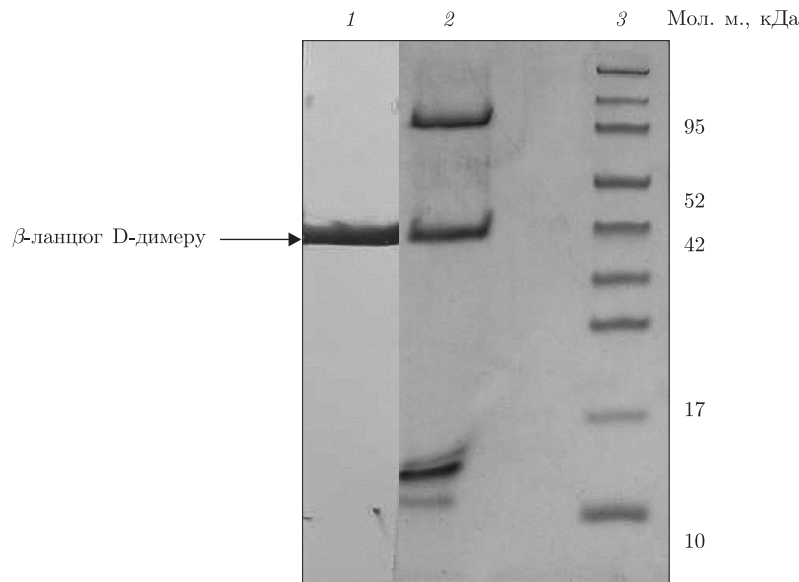


Рис. 2. Імуноблотаналіз з монАТ I-1D (1) та електрофореграма (10%-го ПААГ з 0,1%-м ДС-На, кумасі R-250) D-димеру, відновленого β -меркаптоетанолом (2), маркери молекулярної маси (3)

За допомогою імуноблотаналізу з використанням D-димеру, відновленого β -меркаптоетанолом, було показано, що монАТ I-1D реагують з трьох поліпептидних ланцюгів D-димеру лише з його β -ланцюгом. На рис. 2 наведено дані, які свідчать про появу неоантигенної детермінанти на β -ланцюзі (V β 134-461), яка утворюється при розщепленні фібрину плазміном.

Для того щоб з'ясувати, чи збігаються епітопи досліджуваних монАТ та раніше нами отриманих монАТ III-ЗВ до D-димеру, був проведений конкурентний тІФА. У лунках планшета з адсорбованим D-димером змішували розчин відповідних конкуруючих монАТ з різною концентрацією (об'єм 50 мкл) та однакову кількість біотинильованих монАТ III-ЗВ (об'єм 50 мкл). У контрольні лунки вносили лише біотинильовані антитіла в такій самій концентрації. Мічені біотином антитіла, які зв'язалися з D-димером, виявляли за допомогою

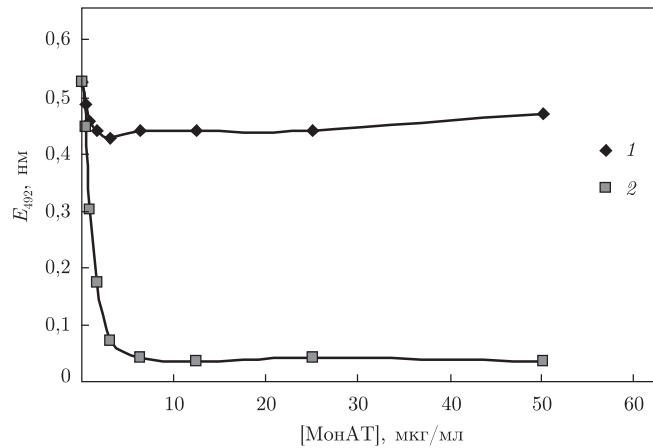


Рис. 3. Конкуренція монАТ I-1D (1) й III-3B (2) з біотинильованими монАТ III-3B за місце зв'язування на D-димері

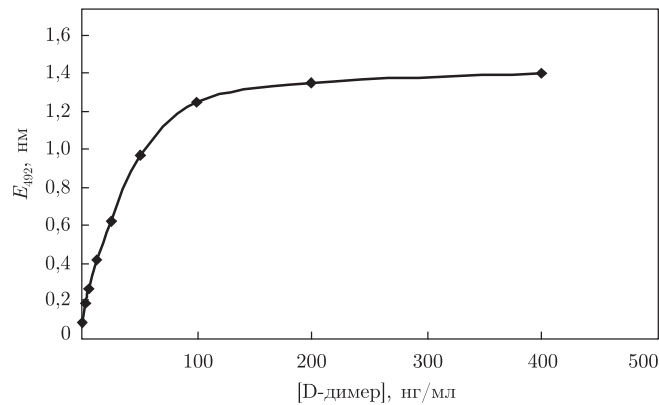


Рис. 4. Залежність зв'язування монАТ III-3B ("catch"-АТ), іммобілізованих на планшеті, від концентрації D-димеру в розчині та біотинильованих монАТ I-1D ("tag"-АТ) у бісайтовому тІФА

кон'югата стрептавідин-пероксидаза ("Sigma", США). Показано, що монАТ I-1D та III-3B не конкурують за місце зв'язування на $V\beta$ -ланцюзі D-димеру (рис. 3).

Оскільки отримані досліджувані монАТ є специфічними до D-димеру, нами було використано їх для розробки імуноферментного методу кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини, який є одним з головних маркерів активаційного стану системи зсідання крові та фібринолізу. З цією метою в лунки планшета з адсорбованими монАТ III-3B вносили різні концентрації D-димеру (для побудови калібрувального графіка) та зразки плазми крові людини, що розведені в 10 разів ЗФР, який містив 0,1%-й твін-20, 5%-е знежирене сухе молоко та 0,38%-й цитрат натрію. Для виявлення D-димеру, який зв'язався з адсорбованими монАТ III-3B ("catch"-антитіла), використовували досліджувані монАТ I-1D, мічені біотином ("tag"-антитіла). Мітку виявляли при додаванні кон'югата стрептавідину з пероксидазою ("Sigma", США) та субстратного розчину перекису водню з *o*-фенілендіаміном. Як видно з рис. 4, при застосуванні цієї пари специфічних монАТ можна кількісно визначати необхідні концентрації D-димеру в плазмі крові людини за допомогою бісайтового тІФА. Пару цих антитіл також можна використовувати для напівкількісних (але більш швидких) імунохроматографічного та латексного методів визначення D-димеру в плазмі крові.

1. Adams S. S., Key N. S., Greenberg C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects // Blood. – 2009. – **113**, No 13. – P. 2878–2887.
2. Ota S., Wada H., Nobori T. et al. Diagnosis of deep vein thrombosis by plasma-soluble fibrin or D-dimer // Am. J. Hematol. – 2005. – **79**. – P. 274–280.
3. Ieko M., Nakabayashi T., Tarumi T. et al. Soluble fibrin monomer degradation products as a potentially useful marker for hypercoagulable states with accelerated fibrinolysis // Clin. Chim. Acta. – 2007. – **386**. – P. 38–45.
4. Shibata T., Magari Y., Mizumaga S. et al. Significance of urinary fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) D-dimer measured by highly sensitive ELISA method with a new monoclonal antibody (D-D E72) in various renal diseases // Nippon Jinzo Gakkai Shi. – 1994. – **36**, No 7. – P. 805–812.
5. Jennings I., Woods T. A., Kitchen D. P. et al. Laboratory D-dimer measurement: improved agreement between methods through calibration // Thromb. Haemost. – 2007. – **98**, No 5. – P. 1127–1135.
6. Hart R., Bate I., Dinh D. et al. The detection of D-dimer in plasma by enzyme immunoassay: improved discrimination is obtained with a more specific signal antibody // Blood Coagul. Fibrinol. – 1994. – **5**, No 2. – P. 227–232.
7. Gaffney P. J. Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2001. – **936**. – P. 594–610.
8. Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G. et al. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // Thromb. Res. – 2002. – **107**. – P. 151–156.
9. Marder V. J., Budzynski A. Z., Barlov G. H. Comparison of the physicochemical properties of fragment D derivatives of fibrinogen and fragment DD of cross-linked fibrin // Biochim. Biophys. Acta. – 1976. – **427**, No 2. – P. 1–14.
10. Kohler G., Milstein C. Continuous of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1975. – **256**. – P. 495–497.
11. Friquet B., Chaffote A. F., Djavadi-Ochaniance Z., Goldberg M. E. Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J. Immunol. Meth. – 1985. – **77**, No 2. – P. 305–319.
12. Stevens F. G. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody // Mol. Immunol. – 1987. – **24**, No 10. – P. 1055–1060.
13. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen-fibrin interaction // Biochem. Biophys. Acta. – 1968. – **154**. – P. 367–380.
14. Medved L. V., Novochatni V. V., Privalov P. L. The preparation and investigation of the structure organization of the active and nonactive form of D fragment of fibrinogen molecule // Mol. Biol. – 1982. – **16**. – P. 1195–1202.

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

Надійшло до редакції 21.10.2010

E. P. Kostiuchenco, I. N. Kolesnikova, L. M. Litvinova, T. A. Koshel,
N. E. Lugovskaya, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoy,**
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

Monoclonal antibodies that recognize new neoantigenic determinant of D-dimer of human fibrin

The hybridoma which produces monoclonal antibodies (mAbs) to D-dimer has been obtained. These mAbs react specifically with human D-dimer without cross-reaction with fibrinogen, fibrin, D- and E₃-fragments. Immunoblot analysis with D-dimer showed that epitopes for these mAbs were situated in the peptide constituent of D-dimer fragment Bβ 134-461. It has also been shown that the D-dimer specific mAbs obtained can be used in sandwich ELISA as a tag-mAbs biotinylated with catch-mAbs III-3B for the quantification of a D-dimer, which is one of the most important molecular markers of the thrombotic state, in human blood plasma.