

## АНАЛІЗ СПЕЦИФІЧНОСТІ АНТИФОСФОЛІПІДНИХ АНТИТІЛ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ФОСФОЛІПІДІВ

Б. В. ДОНСЬКОЙ, В. П. ЧЕРНИШОВ

*Інститут педіатрії акушерства та гінекології АМН України, Київ;  
e-mail: boris\_donskoy@ukr.net*

*В роботі изучали спектр антигенной специфичности антифосфолипидных антител (АФА) с использованием мышинных кофакторзависимых и кофакторнезависимых моноклональных АФА. Было установлено, что оба типа их характеризуются широкой перекрестной реактивностью к разным фосфолипидам. На примере моноклональных АФА мы показали гетерогенность последних. Фосфолипидсвязывающие сывороточные белки (кофакторы), являющиеся обязательным условием для взаимодействия кофакторзависимых АФА с фосфолипидами, могут вступать в конкурентные взаимодействия с кофакторнезависимыми, осложняя тем самым их детекцию. Также было показано, что использование стандартного метода определения АФА приводит к снижению обнаружения той части их, которая не относится к  $\beta_2$ -гликопротеинзависимым. Это, в свою очередь, становится причиной существенных противоречий данных литературы относительно частоты встречаемости и клинического значения АФА. Нами предложена модификация иммуноферментного метода их детекции, разработанная на основе изучения антигенсвязывающих свойств моноклональных АФА. Данная модификация позволяет существенно расширить спектр специфичности определяемых АФА.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: антифосфолипидные антитела, мышинные моноклональные антитела, иммуноферментный метод.*

**А**нтифосфоліпідні антитіла (АФА) – це гетерогенна популяція двох груп антитіл, які відмінні між собою за механізмом зв'язування з фосфоліпідами.

Перша група – це АФА, специфічні до епітопів, утворених унаслідок зв'язування протеїнів плазми (кофакторів) із фосфоліпідною поверхнею. Такі антитіла, які потребують для реакції наявності кофакторів ( $\beta_2$ -глікопротеїну 1– $\beta_2$ -ГП1, протромбіну та анексину) названо кофакторзалежними (КЗ АФА) [1]. Друга група – АФА, які реагують безпосередньо з фосфоліпідами і не потребують присутності кофакторів, є кофакторнезалежними (КН АФА).

КЗ АФА асоціюються із тромботичними ускладненнями [2], що є важливим лабораторним маркером антифосфоліпідного синдрому, в той час як КН АФА здебільшого не пов'язані із тромбозами. Досить часто вони індукуються запаленням, і тому циркуляція їх у крові тимчасова. Певний час КН АФА не приділяли достатньої уваги, однак останні дослідження свідчать про зв'язок між наявністю їх у крові і порушеннями репродуктивної функції у жінок [3].

Залежно від специфічності досліджуваних АФА дані літератури неоднозначні, передусім стосовно їхнього значення, насамперед, у пацієнтів зі звичним невиношуванням плода або без-

плідністю. Так, деякі автори наводять дані щодо надзвичайно високої частоти виявлення АФА у тих жінок, яким проводили *in vitro* фертилізацію (30–40%), а також вказують на вірогідну асоціацію АФА з неефективністю такої фертилізації [5–7]. Водночас в інших роботах можна знайти відомості щодо низької частоти виявлення АФА (10–15%) та відсутність зв'язку між вмістом їх і впливом фертилізації на пацієнтів тієї самої групи [8]. Однією із причин розбіжності даних є те, що в діагностичних системах виявляється лише частина спектра специфічності АФА, яка більше притаманна особам з автоімунними захворюваннями (на системний червоний вовчак, склеродермію, ревматоїдний артрит) [4].

Метою роботи було вивчення антигенної специфічності обох типів АФА (КЗ АФА та КН АФА) і розроблення лабораторно-діагностичного підходу до детекції максимально широкого спектра специфічності таких антитіл.

### Матеріали і методи

*Одержання мишачих моноклональних антифосфоліпідних антитіл.* Мишей BALB/c імунізували лімфоцитами, які виділяли з децидуальної оболонки людини шляхом внутрішньочеревного введення в повному ад'юванті Фрейнда ( $5 \cdot 10^6$ ) [9]. Для імунізації використовували зразки, в яких

вміст клітин CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> становив понад 85%. Повторну імунізацію проводили через два тижні, а останню – за 10 діб до видалення у тварин селезінки.

Злиття з мієломою та клонування гібридоми здійснювали стандартним методом [10] із певними модифікаціями [11]. Стабільні клони, що продукували моноклональні АФА, двічі реклонували для підтвердження моноклональності, після чого їх нарощували в асциті. Моноклональні АФА з асцитної рідини виділяли осадженням сульфатом амонію та гельпроникної хроматографії на Sephacryl S300 SF («Pharmacia», Швеція) для IgM моноклональних АФА або афінної хроматографії на протеїн А сефарозі («Pharmacia», Швеція) у випадку IgG моноклональних АФА. Як контроль використовували моноклональні антитіла (МАТ) проти фактора некрозу пухлин (1С1 IgM та 1А6 IgG).

Кофакторну залежність моноклональних АФА визначали за реакцією в безкофакторному середовищі у присутності  $\beta_2$ -ГП1 або сироватки людини (як джерела кофакторів). У лунки планшета (Nunc polysorp) вносили 100 мкл етанольного розчину кардіоліпіну (10 мкг/мл) фірми «Sigma» (США), а в контрольні – 100 мкл етанолу. Планшети залишали протягом ночі при 4 °С. Після повного випаровування спирту лунки промивали 0,15 М фосфатносолевим буфером (ФСБ) та блокували 1%-м розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА, чистота 99,8%) фірми «Sigma» (США) протягом однієї години. Після промивання планшета до лунок додавали: 1 мкг/мл МАТ в середовищі RPMI з 0,1% БСА – для детекції КН АФА; 1 мкг/мл МАТ в середовищі RPMI з 0,1% БСА та 1% сироватки людини – для виявлення КЗ АФА; 1 мкг/мл МАТ в RPMI з 0,1% БСА та 2 мкг/мл  $\beta_2$ -ГП1 людини («Binding site», Велика Британія) – для ідентифікації  $\beta_2$ -ГП1-залежних АФА. Після 1-годинної інкубації планшети промивали ФСБ і вносили в лунки 100 мкл козячого пероксидазного кон'югату, специфічного до мишачих імуноглобулінів («Sigma», США), в ФСБ з 0,2% БСА (тривалість інкубації 1 год). До промитих лунок планшета додавали по 100 мкл тетраметилбензину (ТМБ) фірми «Sigma» (США) в цитратному буфері з пероксидом водню, після чого залишали на 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням до лунок 100 мкл 5%-ї сірчаної кислоти. Величину абсорбції вимірювали на спектрофотометрі Multiskan («Labsystem», Швеція) при 450 нм. Від значення абсорбції в дослідних лунках (з антигеном) віднімали її значення в контрольних лунках (без антигену).

Визначення афінності моноклональних АФА проводили неконкурентним імуоферментним аналізом (ІФА) як запропоновано D. I. Beatty et al. [12].

В експериментах досліджували здатність МАТ реагувати з  $\beta_2$ -ГП1, імобілізованому на полістиролі. Розчин  $\beta_2$ -ГП1 людини – 3 мкг/мл в 0,1М карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,8) – додавали в лунки планшета (Nunc maxisorp) та інкубували протягом ночі при 4 °С, в контрольні лунки вносили 3 мкг/мл БСА в цьому самому буфері. Після блокування вільних сайтів на полістиролі до лунок додавали моноклональні АФА (1 мкг/мл) та інкубували 1 год. Візуалізацію ІФА проводили як зазначено вище.

Реактивність моноклональних АФА до фосфоліпідів детектували за відсутності та у присутності сироватки крові людини. Як антигени використовували кардіоліпін, фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилгліцерол, фосфатидилхолін та фосфатидну кислоту («Sigma», США), розчини яких (кінцева концентрація 10 мкг/мл в етанолі) додавали по 100 мкл в лунки планшета. У контрольні лунки вносили 100 мкл спирту. Планшети залишали при 4 °С до повного випаровування етанолу. Після промивання лунок ФСБ вільні сайти блокували 0,5%-м розчином БСА у ФСБ протягом 1 год при 37 °С, а в лунки вносили по 100 мкл розчину моноклональних АФА (1 мкг/мл) у ФСБ, що містив 0,1% БСА – для КН АФА, або у ФСБ з 0,1% БСА та 1% сироватки людини – для КЗ АФА). Візуалізацію результатів ІФА проводили як зазначено вище.

Для визначення впливу різних концентрацій  $\beta_2$ -ГП1, сироватки людини та бичачої сироватки на реактивність КЗ АФА та КН АФА в інкубаційний розчин вносили  $\beta_2$ -ГП1, сироватку людини та бичачу сироватку в різних концентраціях.

З метою визначення молекулярної маси кофакторів для КЗ АФА сироватку людини фракціювали за допомогою гельпроникної хроматографії з подальшим аналізом фракцій на наявність кофакторної активності. Сироватку людини (об'єм 2 мл) розділяли на хроматографічній колонці (BioRad, США) розміром 1,5 м × 1,8 см, заповненій Sephacryl S200 SF («Pharmacia», Швеція). Колонку попередньо калібрували маркерами для визначення молекулярної маси. У фракціях об'ємом 2,5 мл визначали концентрацію білка методом Лоурі, після чого ці зразки додавали до лунок попередньо покритих кардіоліпіном та заблокованих 0,5%-м БСА. Через 1 год інкубації при 4 °С до лунок додавали МАТ (кінцева концентрація 1 мкг/мл) і інкубували 1 год при кімнатній температурі. Візуалізацію результатів ІФА здійснювали як зазначено вище.

Реактивність моноклональних АФА досліджували залежно від концентрації антигену та умов його імобілізації, складу блокувального бу-

фера і умов проведення реакції (температури, рН, концентрації та джерела кофакторів).

Вивчали також можливість застосування стандартного методу детекції антифосфоліпідних антитіл [13] стосовно одержаних моноклональних АФА. Лунки планшетів покривали 100 мкл етанольного розчину кардіоліпіну (кінцева концентрація 30 мкг/мл) і залишали при 4 °С до випаровування спирту. Для блокування використовували ФСБ, який містив 10% бичачої сироватки, протягом однієї години; після промивання ФСБ у кожен лунку додавали по 100 мкл МАТ (1 або 0,2 мкг/мл у ФСБ із 10% бичачої сироватки) та 1% сироватки крові людини. Після двогодинної інкубації планшети промивали ФСБ, і в кожен лунку додавали 100 мкл козячого пероксидазного кон'югату у ФСБ, специфічного до мишачих імуноглобулінів (інкубація 1 год). Візуалізацію результатів ІФА проводили як зазначено вище.

Вивчали чутливість запропонованої модифікації методу визначення антифосфоліпідних антитіл стосовно одержаних моноклональних АФА. Лунки планшета покривали 20 мкл спиртового розчину кардіоліпіну (кінцева концентрація 75 мкг/мл), у контрольні лунки вносили 20 мкл етанолу. Планшети залишали при 37 °С до повного випаровування спирту при постійному струшуванні. Після промивання ФСБ лунки планшета блокували 0,25%-м БСА у 0,02М веронал-медіналовому буфері (рН 8,6) протягом однієї години (температура 37 °С). Після промивання лунок ФСБ до них додавали по 100 мкл розчинів МАТ (кінцева концентрація – 1 мкг/мл) в середовищі RPMI, в якому містилося 0,1% БСА, 2% сироватки людини та 0,01% твіну 20. Після 1-годинної інкубації лунки промивали ФСБ і вносили в них 100 мкл козячого пероксидазного кон'югату в ФСБ із 0,2% БСА, специфічного до мишачих імуноглобулінів, 1% козячої сироватки («Sigma»), 0,01% твіну 20 (інкубація 1 год). Візуа-

лізацію результатів ІФА проводили як зазначено вище.

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням *t*-критерія Стьюдента.

### Результати та обговорення

Нами було одержано 3 стабільні гібридомні клони, які продукували моноклональні АФА. Під час аналізу їхньої специфічності виявилось, що МАТ 510 реагували з кардіоліпіном безпосередньо як у відсутності, так і за наявності  $\beta_2$ -ГП1, сироватки людини та бичачої сироватки, тобто виявилися незалежними від кофактора антитілами. МАТ 238 та 183 взаємодіяли з кардіоліпіном лише у присутності кофакторів сироватки людини, при цьому вони не розпізнавали  $\beta_2$ -ГП1, імобілізованого на полістиролі, та не виявляли реактивності до кардіоліпіну у його присутності. Отже, МАТ 238 та 183 виявилися кофакторзалежними, але  $\beta_2$ -ГП1-незалежними моноклональними АФА. МАТ – 5A1 та 1E10, які були люб'язно надані нам для дослідження проф. С. Кюркчиевим (Софія, Болгарія), реагували з імобілізованим на полістирол  $\beta_2$ ГП1і, за відсутності фосфоліпідів, виявляючи реактивність до кардіоліпіну у присутності сироватки людини або  $\beta_2$ -ГП1, тобто були специфічними до останніх і виявилися  $\beta_2$ -ГП1-залежними моноклональними АФА (таблиця).

Одержані результати свідчать про неприйнятність використання бичачої сироватки як джерела кофакторів у системах для визначення АФА, оскільки серед кофакторзалежних антитіл лише МАТ 238 притаманна незначна (перехресна) реактивність до кардіоліпіну у присутності кофакторів бичачої сироватки, тоді як МАТ 5A1, 183 та 1E10 взаємодіяли з кардіоліпіном лише у присутності кофакторів сироватки людини (таблиця).

При вивченні перехресної специфічності моноклональних АФА було встановлено, що КЗ АФА і КН АФА є, переважно, специфічними до кар-

### Визначення кофакторної залежності моноклональних АФА

Моноклональні антитіла, №	Кардіоліпін	Кардіоліпін + $\beta_2$ -ГП1*	Кардіоліпін + сироватка людини*	Кардіоліпін + бичача сироватка*	$\beta_2$ -ГП1 на полістиролі
510	+	+	+	+	–
238	–	–	+	+	–
183	–	–	+	–	–
5A1	–	+	+	–	+
1E10	–	+	+	–	+

\* Сироватку людини, бичачу сироватку і  $\beta_2$ -ГП1 використовували як компоненти інкубаційного буфера.

діоліпіну та фосфатидилсерину, хоча загалом спектр специфічності був значно ширшим. У присутності сироватки людини кофакторзалежні моноклональні АФА 183 взаємодіяли з кардіоліпіном та фосфатидилсерином (рис. 1, А). Кофакторнезалежні моноклональні АФА 510 взаємодіяли з кардіоліпіном, фосфатидилсерином, фосфатидилетаноламіном майже з однаковою інтенсивністю як за відсутності кофакторів, так і у присутності їх (рис. 1, Б).  $\beta_2$ -ГП1-залежні моноклональні АФА 5A1 не взаємодіяли із жодним фосфоліпідом у разі відсутності в лунках сироватки людини. Однак за наявності  $\beta_2$ -ГП1 вони взаємодіяли з кардіоліпіном, фосфатидилсерином, фосфатидилетаноламіном та фосфатидною кислотою (рис. 1, В). Аналогічні результати було одержано і при визначенні специфічності моноклональних АФА 2E10. Жодне з моноклональних АФА не

взаємодіяло з фосфатидилгліцеролом та фосфатидилхоліном (рис. 1). Широкою перехресною специфічністю їх можна пояснити також подібну специфічність поліклональних АФА із сироватки людини [14].

Величина константи афінності моноклональних АФА 510 до кардіоліпіну становила  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Це значення не низьке, а тому не можна пояснити низькою афінністю високу перехресну специфічність цього МАТ до інших фосфоліпідів. Перехресна взаємодія АФА з різними фосфоліпідами, на нашу думку, пояснюється не низькою специфічністю його, а подібністю епітопів на фосфоліпідних молекулах.

Аналіз специфічності моноклональних АФА свідчить про значний вплив компонентів сироватки крові на їхню взаємодію з кардіоліпіном. Ми вважали доцільним дослідити цей вплив де-

*Рис. 1. Спектри антигенної специфічності моноклональних АФА до різних фосфоліпідів у безкофакторному середовищі та у присутності кофакторів сироватки людини: А – МАТ 183; Б – МАТ 510; В – МАТ 5A1 (кожна точка є середнім показником абсорбції у восьми лунках, одержаних у двох незалежних експериментах). На осі абсцис: а – кардіоліпін, б – фосфатидилсерин, в – фосфатидилетаноламін, г – фосфатидна кислота, д – фосфатидилгліцерол, е – фосфатидилхолін, є – контроль, ж – кардіоліпін + сироватка людини (далі СЛ), з – фосфатидилсерин + СЛ, і – фосфатидилетаноламін + СЛ, к – фосфатидна кислота + СЛ, л – фосфатидилгліцерол + СЛ, м – фосфатидилхолін + СЛ, н – контроль + СЛ.*

тальніше. Було виявлено, що сироватка людини та бичача сироватка, як і  $\beta_2$ -ГПІ, пригнічують зв'язування моноклональних КН АФА 510 з кардіоліпіном, тоді як присутність сироватки людини та  $\beta_2$ -ГПІ є обов'язковою умовою для взаємодії моноклональних КЗ АФА 5А1 та 1Е10 (рис. 2). Бичача сироватка інгібує як КН АФА 510, так і КЗ АФА 183. Таким чином, використання її в діагностичних системах для детекції АФА може бути однією із причин помилково низького виявлення як кофакторзалежних, так і кофакторнезалежних АФА.

Досліджували також компоненти сироватки крові, що відповідають за інгібування взаємодії КН АФА 510 із фосфоліпідами та одночасно відіграють роль кофакторів для КЗ АФА. Застосовуючи гельпроникну хроматографію, нам вдалося виділити білкову фракцію, в якій міститься кофактор для АФА 183. Максимальна концентрація цього протеїну виявляється у фракціях, еквівалентних 36–38 кДа (рис. 3). У моноклональних АФА 5А1 та 1Е10, специфічних до  $\beta_2$ -ГПІ, не виявлено перехресної реактивності до інших кофакторів, але вони починали взаємодіяти з кардіоліпіном у присутності фракцій з молекулярною масою 51 кДа, що містили  $\beta_2$ -ГПІ (рис. 3).

Компоненти сироватки людини у фракціях з молекулярною масою 20–60 кДа характеризуються вираженим інгібувальним впливом на реакцію моноклональних КН АФА 510 з кардіоліпіном (рис. 3). У цих самих фракціях ідентифіковано також кофактори для КЗ АФА – 5А1, 1Е10,

183 та 278. Базуючись на цих даних можна припустити, що інгібувальний ефект сироватки пов'язаний саме з фосфоліпидзв'язувальними білками і конкуренцією між ними та КН АФА. Це підтверджується результатами, які свідчать про пригнічення розчинним  $\beta_2$ -ГПІ реакції між КН АФА 510 та кардіоліпіном (рис. 2).

Одержані результати ілюструють складність одночасного виявлення обох типів АФА. Білкові фракції, в яких містяться кофактори, необхідні для взаємодії з антигеном КЗ АФА, одночасно пригнічують реактивність КН АФА. Нами було запропоновано певні зміни умов у стандартному методі визначення АФА [13], які дозволяють підвищити чутливість детекції цих типів антитіл.

Порівнюючи стандартний метод визначення АФА із запропонованою нами модифікацією, виявлено, що чутливість обох методів до  $\beta_2$ -ГПІ-залежних моноклональних АФА (5А1 та 1Е10) є однаковою. Не відрізняються вони і за рівнями неспецифічного фонового сигналу у разі використання контрольних МАТ (1С1 та 1А6) та величиною абсорбції у контрольних лунках без кардіоліпіну (рис. 4). Водночас чутливість запропонованої модифікації методу стосовно виявлення КН АФА 510 та КЗ АФА 183 значно вища порівняно зі стандартним (рис. 4). На нашу думку, одним із факторів, які розширюють специфічність методу, може бути підвищення рН на етапі блокування, що, у свою чергу, збільшує заряд на негативно заряджених молекулах фосфоліпідів, зменшуючи їхнє маскування альбуміном. Також можливо, що використання високоочищеного

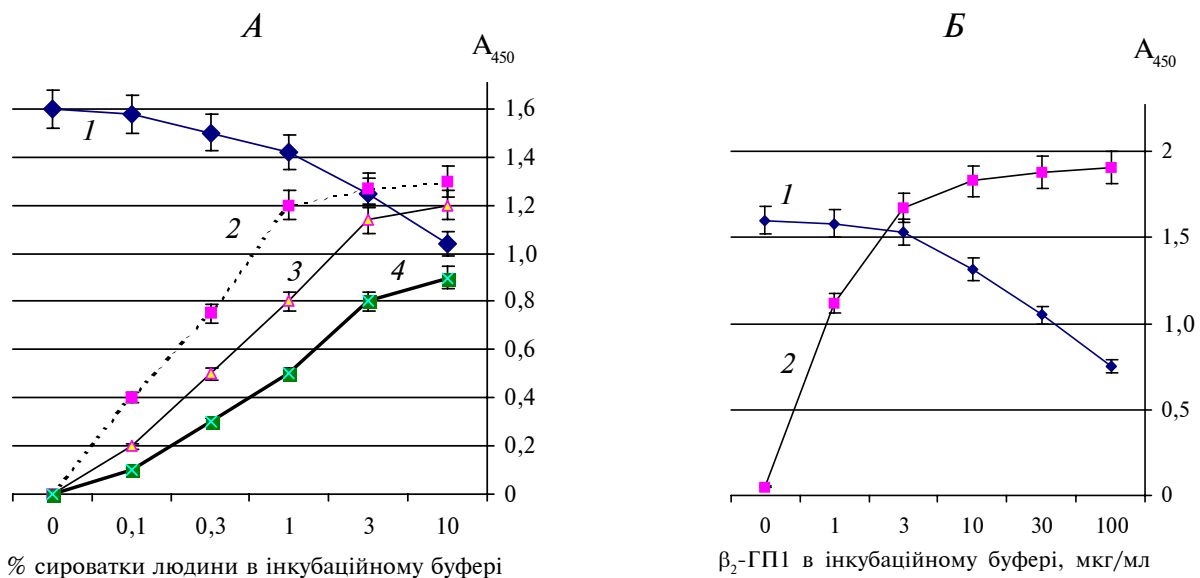


Рис. 2. Вплив протеїнів сироватки людини (А) та  $\beta_2$ -ГПІ (Б) на реактивність моноклональних АФА різної специфічності (кожна точка є середнім показником значення абсорбції у восьми лунках, одержаних у двох незалежних експериментах); 1 – АФА 510, 2 – АФА 5А1, 3 – АФА 1Е10, 4 – АФА 183.

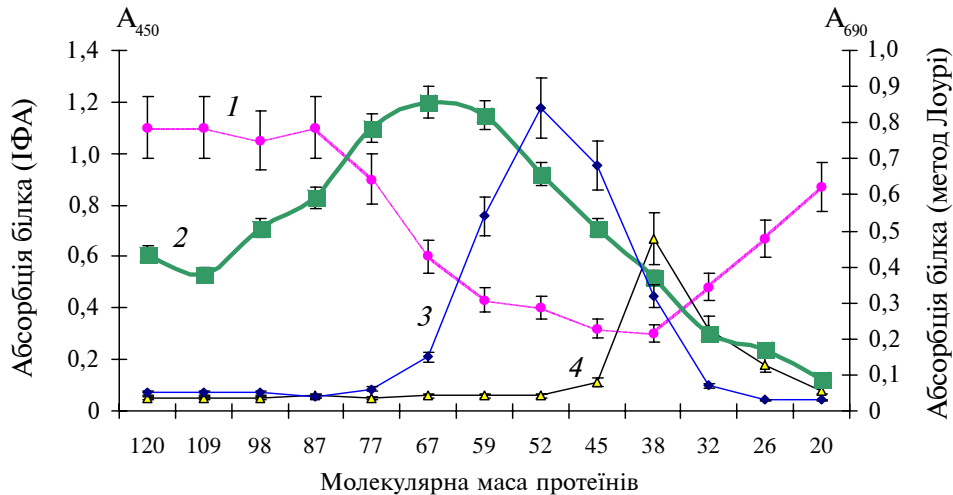


Рис. 3. Фракціонування сироватки крові людини за допомогою геліпроникної хроматографії на *Sephacryl S200 SF* та дослідження здатності фракцій впливати на реакцію монокліональних АФА з кардіоліпіном (кожна точка є середнім показником абсорбції білка в 16 лунках у чотирьох незалежних експериментах); 1 – MAT 510, 2 – загальний білок, 3 – MAT 5A1, 4 – MAT 183.

БСА та відсутність бичачої сироватки не зумовлює екранування фосфоліпідів екзогенними кофакторами, а наявність кальцію в інкубаційному буфері сприяє взаємодії з фосфоліпідами більшої кількості кофакторів сироватки крові людини.

Отже, на прикладі мишачих монокліональних АФА показано, що за характером зв'язування із фосфоліпідами вони належать до різних типів: кофакторнезалежних антитіл, які здатні реагувати із фосфоліпідами без кофакторів (протеїнів, що зв'язують фосфоліпіди) та  $\beta_2$ -ГП1-залежних, які специфічні до цього глікопротеїну і реагують з фосфоліпідами лише в комплексі з

ним, а також інших КЗ АФА (але не  $\beta_2$ -ГП1-залежних). Наведені вище дані свідчать, що детекція анти- $\beta_2$ -ГП1-специфічних АФА не є адекватною заміною АФА, оскільки не дає можливості визначити повний спектр останніх.

Монокліональні АФА характеризуються досить широким спектром специфічності: вони взаємодіють із кардіоліпіном та фосфатидилсерином та виявляють специфічність до фосфатидилетаноламіну і фосфатидної кислоти. Згідно з одержаними нами даними, поліспецифічність КН АФА, ймовірно, пов'язана не з низькою афінністю цих антитіл а, вірогідно, з подібністю антигенних епітопів на фосфоліпідних молекулах. Водночас спектр специфічності КЗ АФА вірогідно визначається здатністю того чи іншого фосфоліпіду зв'язуватися з кофакторами КЗ АФА. Це дозволяє припустити, що перехресна специфічність до фосфоліпідів АФА сироватки людини, яка виявляється за їхньої детекції, є характерною особливістю цих антитіл.

Результати визначення впливу бичачої сироватки, різних фракцій сироватки людини та  $\beta_2$ -ГП1 на реактивність монокліональних АФА щодо кардіоліпіну свідчить, що сироватки крові людини та бика, як і  $\beta_2$ -ГП1, пригнічують зв'язування КН АФА з кардіоліпіном, тимчасом як присутність сироватки людини та/або  $\beta_2$ -ГП1 є обов'язковою умовою для реактивності КЗ АФА. При цьому бичача сироватка пригнічує як КН АФА, так і КЗ АФА. Це свідчить про неможливість її використання як джерела кофакторів у системах для визначення АФА. Білкові фракції сироватки людини мають неоднаковий вплив на

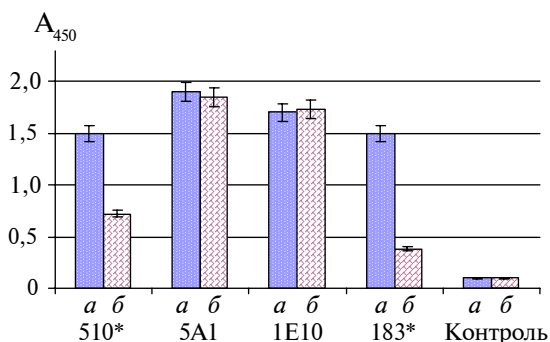


Рис. 4. Порівняння чутливості стандартного методу визначення монокліональних АФА із запропонованою нами модифікацією. Використовували 1 мкг/мл монокліональних АФА або контрольні монокліональні антитіла ІС1 (контроль); а – запропонована модифікація, б – стандартний метод. \* Дані вірогідні порівняно із запропонованою модифікацією ( $p < 0,05$ ).

реактивність моноклональних АФА: фракції, що містять кофактори, необхідні для взаємодії КЗ АФА з кардіоліпіном, посилюють таку взаємодію і водночас пригнічують зв'язування КН АФА з антигеном. Одержані нами результати свідчать про складність одночасного виявлення кофакторозалежних та кофакторнезалежних АФА, пояснюють принципові розбіжності даних літератури щодо частоти виявлення та ролі АФА у процесах життєдіяльності пацієнтів одних і тих самих клінічних груп, показують, що в разі використання стандартних методів детекції АФА можуть не виявлятися окремі типи їх.

На основі вивчення властивостей моноклональних АФА нами запропоновано модифікацію загальноприйнятого методу, що сприяє підвищенню чутливості детекції як КН АФА, так і КЗ АФА. Нами доведено можливість використання моноклональних АФА шляхом оптимізації умов проведення імуноферментної реакції для визначення АФА у сироватці крові людини. Ми вважаємо, що запропонована нами модифікація дозволить підвищити ефективність одночасного виявлення як КЗ АФА, так і КН АФА в сироватці крові людини.

#### ANALYSIS OF SPECIFICITY OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES WITH THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES OF PHOSPHOLIPIDS

*B. V. Donskoy, V. P. Chernyshov*

Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology,  
Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: boris\_donskoy@ukr.net

#### S u m m a r y

The antigenic specificity of antiphospholipid antibodies (APA) is a matter of intensive investigation. Difference in the reported involvement of APA in clinical manifestation may be due, in part, to the polyclonal nature of these antibodies and the use of serum and serum fractions for analysis. To circumvent this issue, we generated mouse monoclonal APA and compared their antigen binding patterns and conditions of this reaction.

Monoclonal APA 5A1 and 1B10 reacted with cardiolipin in a  $\beta_2$ -glycoprotein 1-dependent manner. The epitope for these antibodies consisted of  $\beta_2$ -glycoprotein1 bound to cardiolipin or immobilized on plastic plates. The specificity is similar to the autoimmune anticardiolipin antibodies described

in patients with SLE, APS and other autoimmune diseases. Monoclonal APA 510, 183, 238 reacted with cardiolipin in the absence of  $\beta_2$ -glycoprotein1.  $\beta_2$ -Glycoprotein1, either in the fluid phase or bound to cardiolipin, inhibited the binding of these antibodies. Monoclonal APA 510 was cofactor-independent while monoclonal APA 183 and 238 reacted with cardiolipin only in the presence of human serum. The results of this study indicate that APA comprise a highly heterogeneous population of antibodies with respect to the antigens they recognize, as well as depending on presence of serum components.

**К e y w o r d s:** antiphospholipid antibodies, mouse monoclonal antibodies, enzyme immunoassay.

1. *Kandiah D. A., Sali A. Y., Sheng E. J.* // *Advan. Immunology.* — 1998. — **70**, N 3. — P. 507–562.
2. *Greaves M.* // *Lancet.* — 1999. — **353**, N 5. — P. 1348–1353.
3. *Caruso S. D., Carolis N. D., Simone* // *Hum. Reprod. Update.* — 1999. — **5**, N 1. — P. 267–276.
4. *McIntyre J. A., Wegenknecht D. R., Faulk W. P.* // *Prog. Lipid Res.* — 2003. — **42**, N 9. — P. 176–237.
5. *Gleicher N.* // *Hum. Reprod.* — 1997. — **12**, N 11. — P. 13–16.
6. *Geva E., Yaron Y., Lessing J. B.* // *Fertil. Steril.* — 1994. — **62**, N 7. — P. 802–806
7. *Chernyshov V. P., Dakhno F. V., Donskoy B. V. et al.* // 2003. — 10th Inter. Symp. of Immunol. of Reproduction. — P. 81.
8. *Branch D. W.* // *Lupus.* — 1998. — **7**, N 1. — P. 90–94.
9. *Ritson A., Bulmer J. N.* // *J. of Immunol. Methods.* — 1987. — **104**, N 4. — P. 231–236.
10. *Kohler G., Milstein C.* // *Nature.* — 1975. — **256**, N 3. — P. 495–497.
11. *Водянік М. О.* Коопераційні моноклональні антитіла проти фактору некрозу пухлин. Автореф. дис... канд. біол. наук. — К., 2001. — 23 с.
12. *Beatty D. J., Beatty B. G., Vlahos W. G.* // *J. of Immunol. Methods.* — 1987. — **100**, N 7. — P. 105–116.
13. *Merkel P. A., Pierangeli S. S., Harris E. N.* // *J. Rheumat.* — 1999. — **26**, N 5. — P. 591–596.
14. *Shan H., Goldman J., Cunto G. et al.* // *J. of Autoimmunity.* — 1998. — **11**. — P. 651–660.

Отримано 16.03.2005