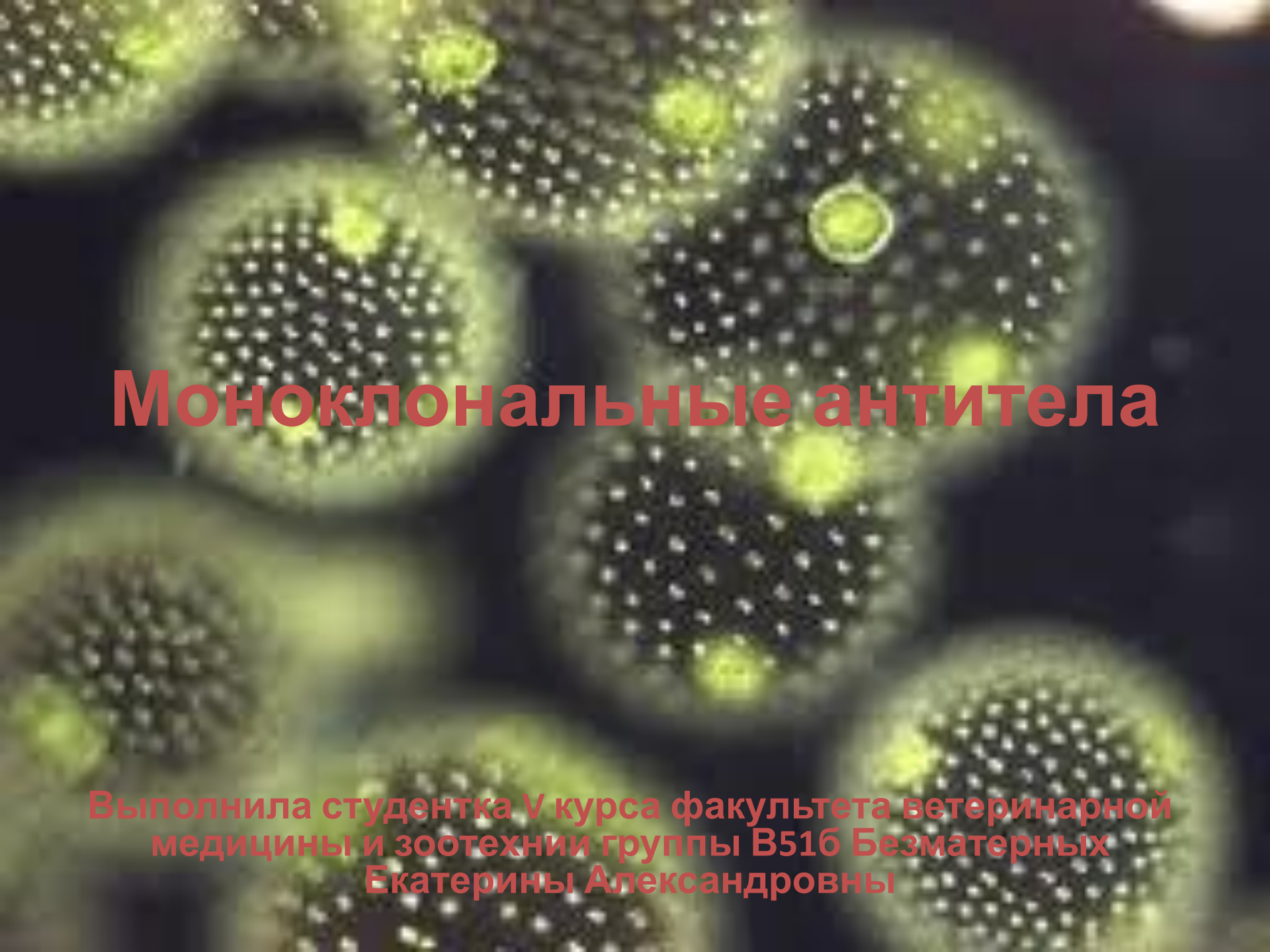
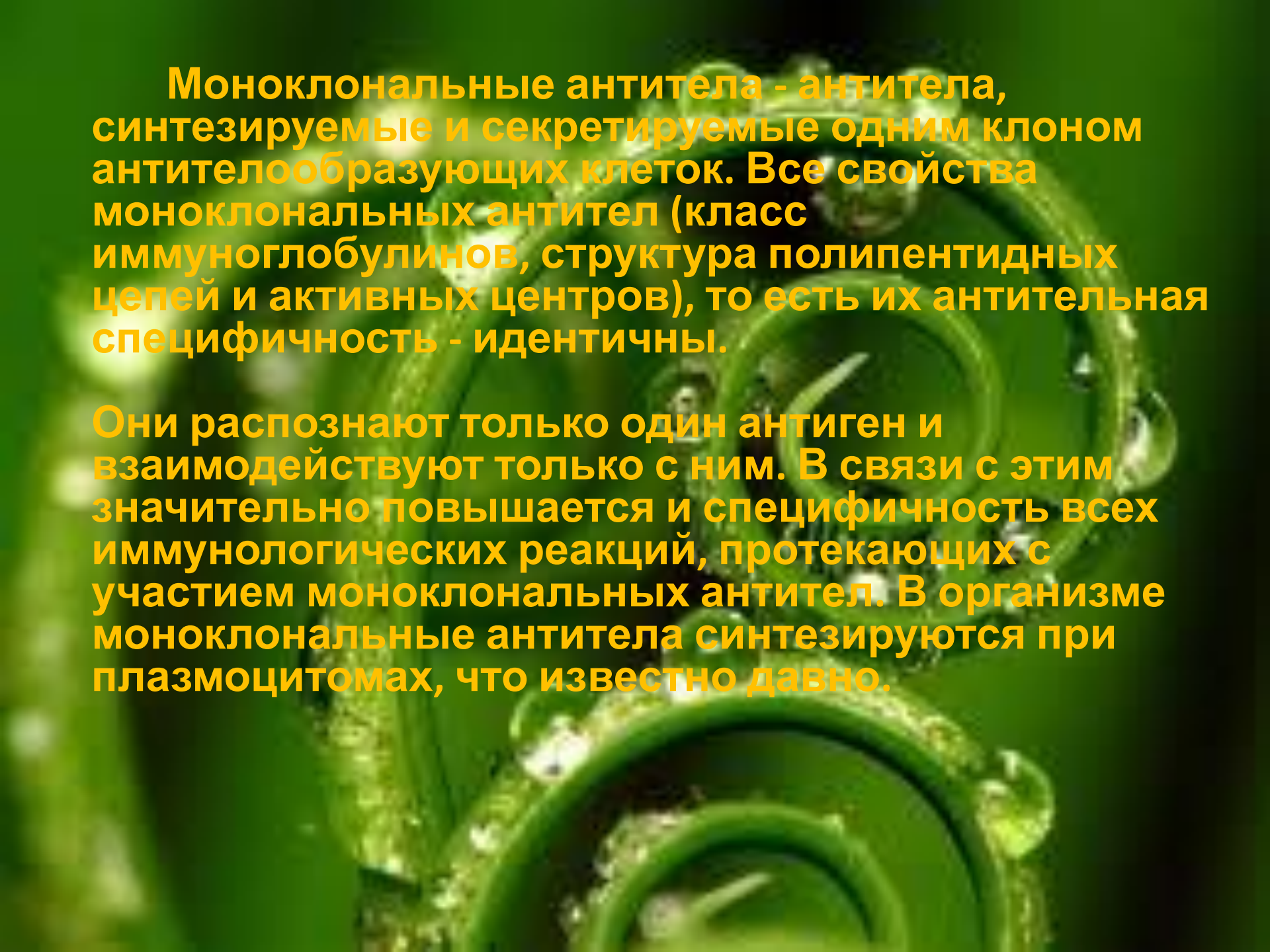




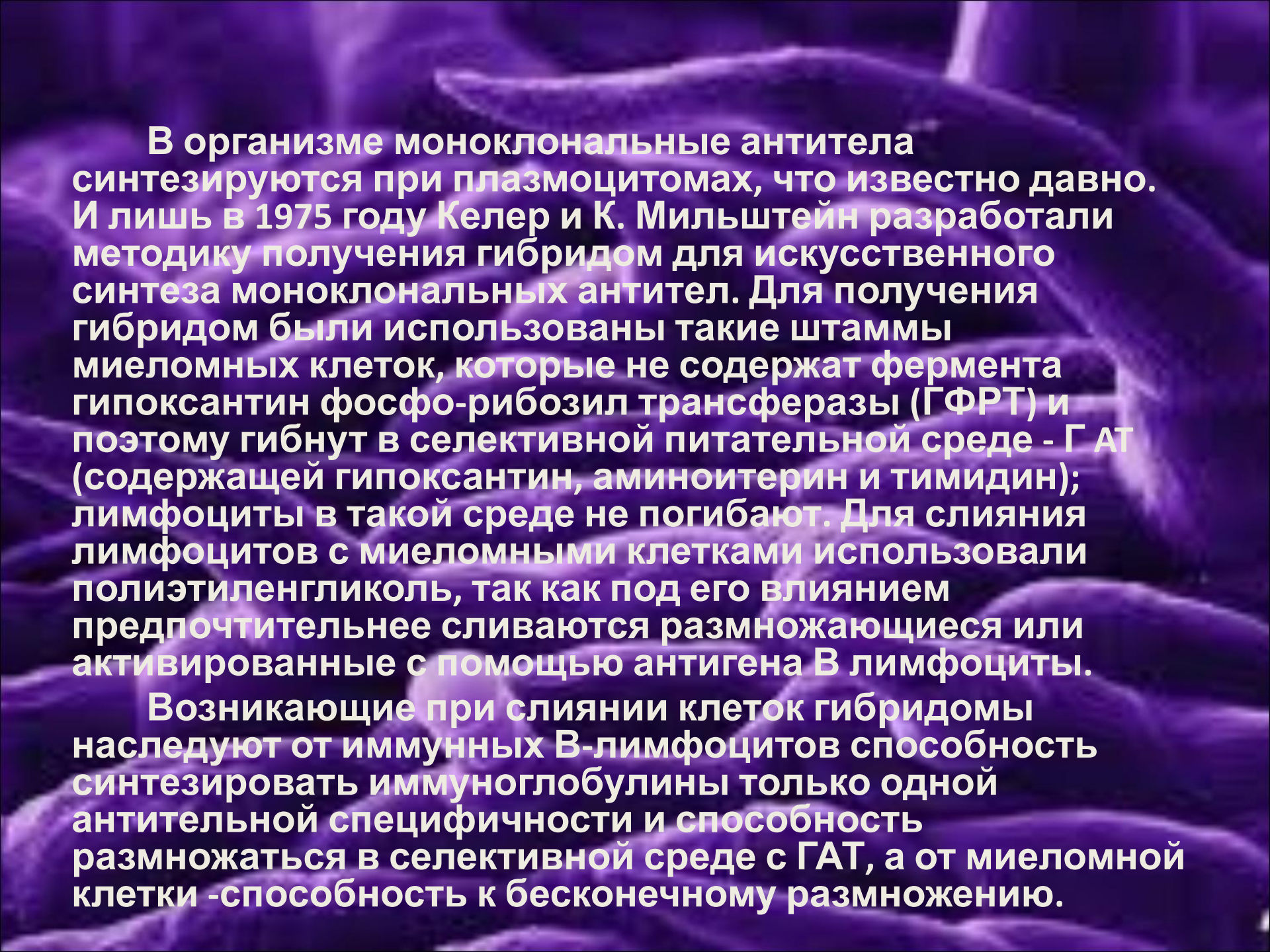
Моноклональные антитела

Выполнила студентка V курса факультета ветеринарной
медицины и зоотехнии группы В516 Безматерных
Екатерины Александровны



Моноклональные антитела - антитела, синтезируемые и секретируемые одним клоном антителообразующих клеток. Все свойства моноклональных антител (класс иммуноглобулинов, структура полипептидных цепей и активных центров), то есть их антительная специфичность - идентичны.

Они распознают только один антиген и взаимодействуют только с ним. В связи с этим значительно повышается и специфичность всех иммунологических реакций, протекающих с участием моноклональных антител. В организме моноклональные антитела синтезируются при плазмоцитомах, что известно давно.

A background image showing a dense network of plant roots submerged in a liquid medium, likely a nutrient solution or culture medium, used in biological experiments.

В организме моноклональные антитела синтезируются при плазмоцитомах, что известно давно. И лишь в 1975 году Келер и К. Мильштейн разработали методику получения гибридом для искусственного синтеза моноклональных антител. Для получения гибридом были использованы такие штаммы миеломных клеток, которые не содержат фермента гипоксантин фосфо-рибозил трансферазы (ГФРТ) и поэтому гибнут в селективной питательной среде - Г АТ (содержащей гипоксантин, аминоитерин и тимидин); лимфоциты в такой среде не погибают. Для слияния лимфоцитов с миеломными клетками использовали полиэтиленгликоль, так как под его влиянием предпочтительнее сливаются размножающиеся или активированные с помощью антигена В лимфоциты.

Возникающие при слиянии клеток гибридомы наследуют от иммунных В-лимфоцитов способность синтезировать иммуноглобулины только одной антительной специфичности и способность размножаться в селективной среде с ГАТ, а от миеломной клетки - способность к бесконечному размножению.

Процесс получения гибридом включает определенные этапы:

- 1) Получение линии миеломных клеток (мышинные или крысиные клеточные линии).
- 2) Получение иммунных В лимфоцитов (антителообразующих клеток) из селезенки иммунизированного соответствующим антигеном животного.
- 3) Создание условий для слияния клеток (одна из 10^4 клеток).
- 4) Выделение гибридом и отбор из них интересующего клона.
- 5) Накопление клеток полученного клона для его практического использования.

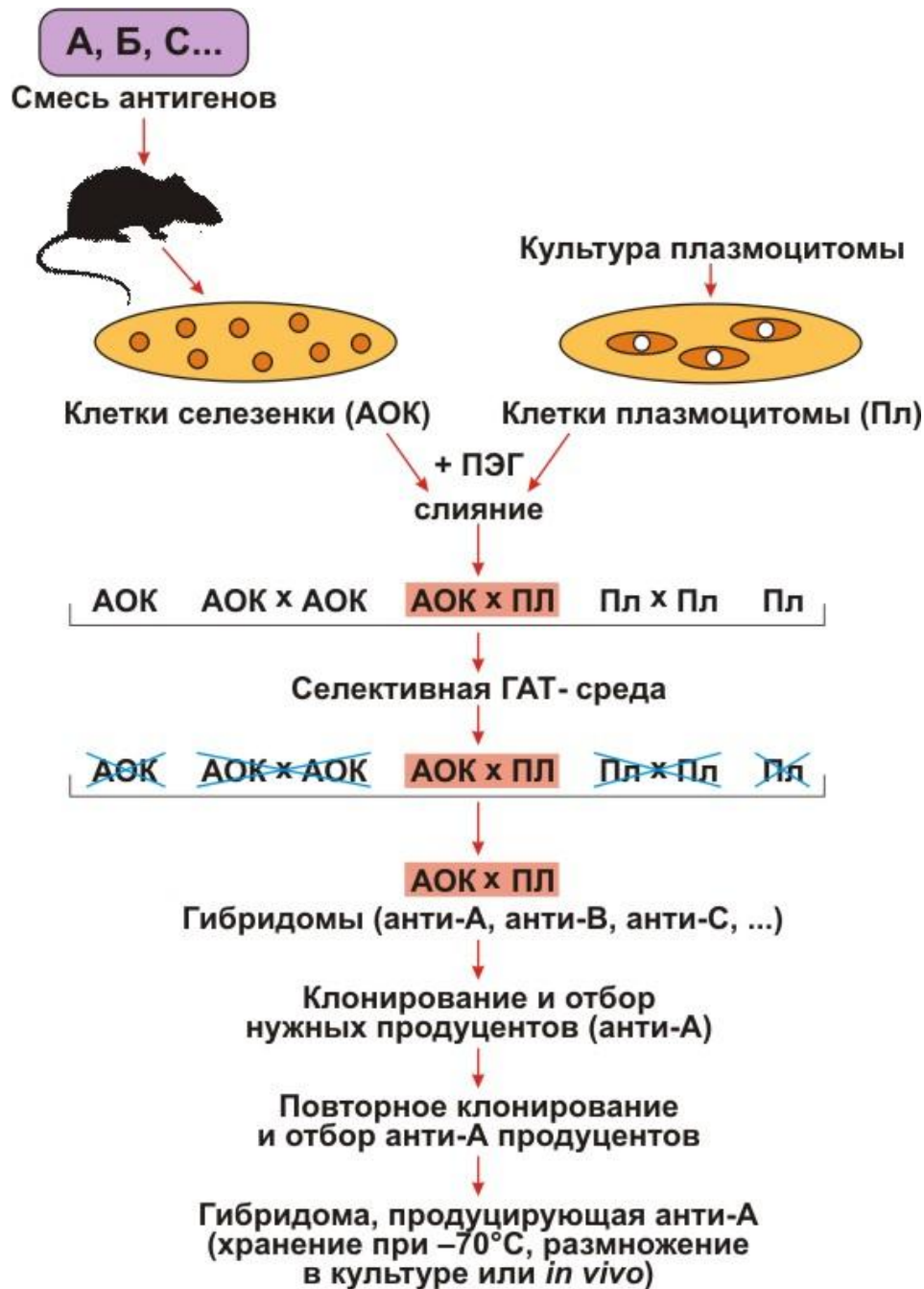


Схема получения гибридом.

А, В, С — многокомпонентная смесь антигенов, использованная для иммунизации;

АОК — антителообразующие клетки селезенки;

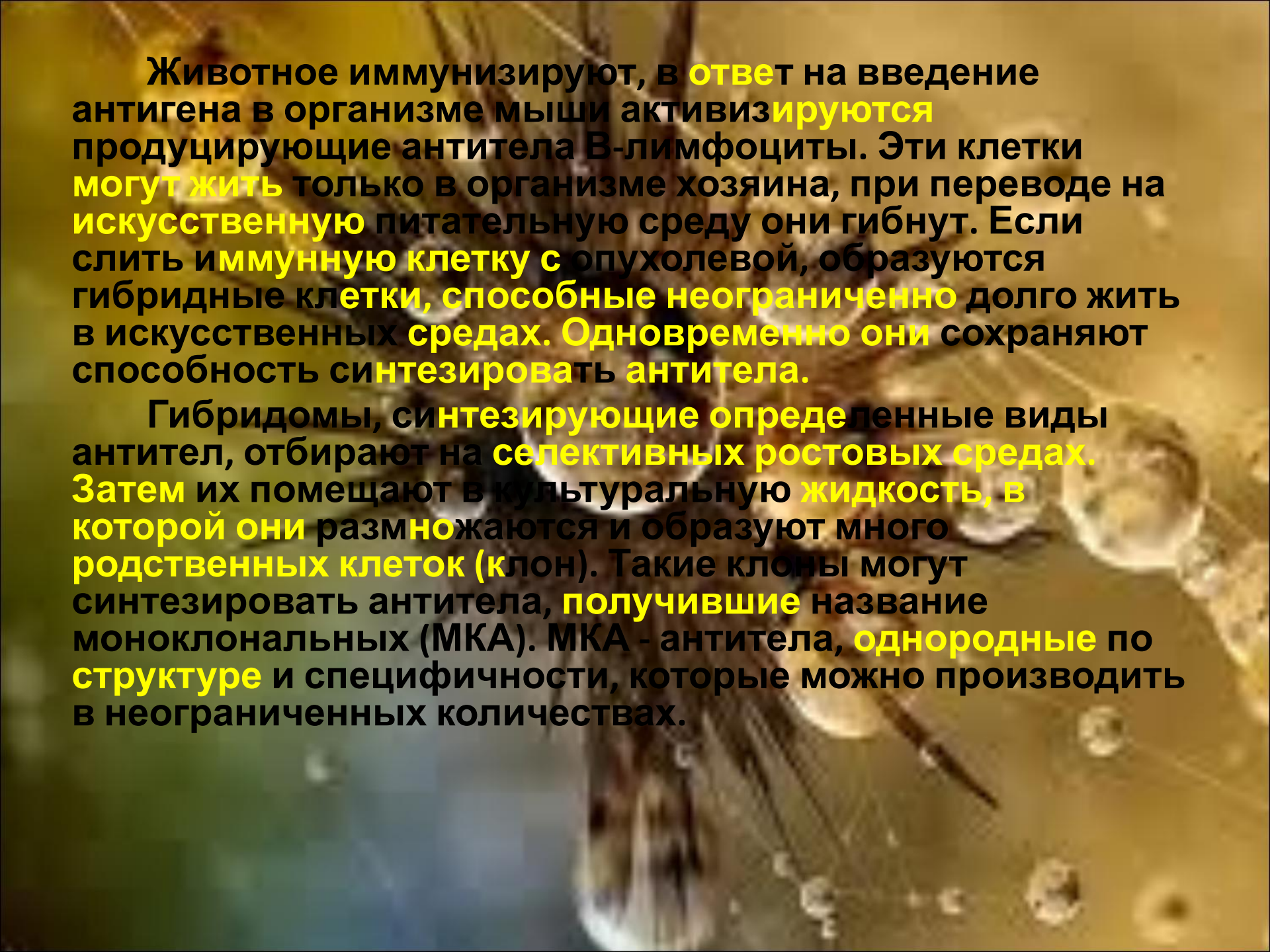
Пл — клетки плазмоцитомы, не растущие в селективной ГАТ-среде;

ПЭГ — полиэтиленгликоль;

ГАТ — среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин;

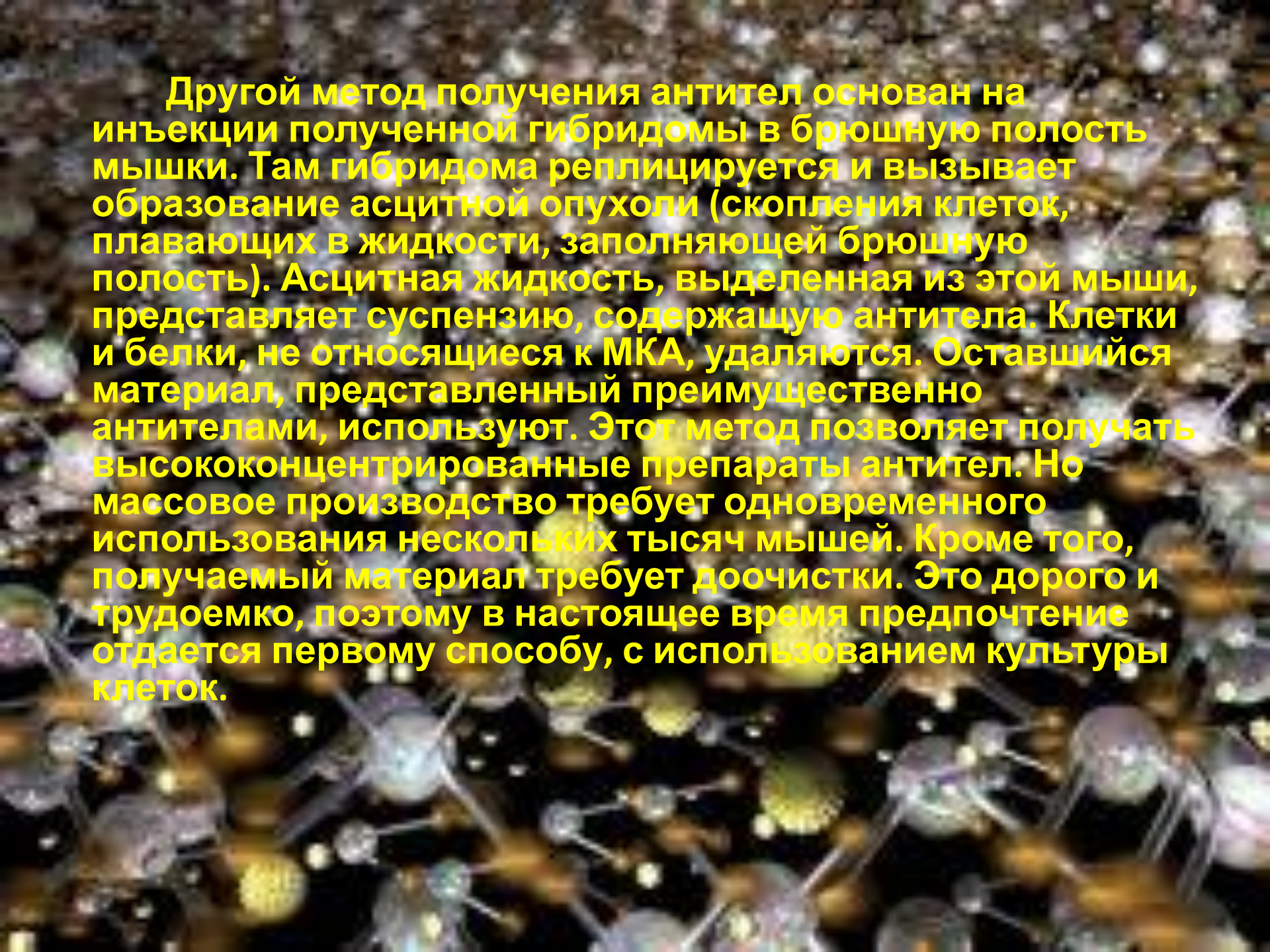
анти-А, анти-В, анти-С — моноклональные антитела соответственно к А-, В-, С-антигенам.

Следующий этап после получения гибридом — клонирование и отбор нужных клонов. Выжившие в ГАТ клетки рассеивали в специальные пластиковые планшеты, содержащие обычно 96 лунок емкостью примерно по 0,2 см³. В каждую лунку помещали в среднем по 10 гибридных клеток, которые культивировали в присутствии «кормящих» клеток, не имеющих отношения к гибриdomам, но способствующих их росту. После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяли на присутствие антител нужной специфичности. Для этого использовали микрометоды выявления антител к соответствующему антигену. Клетки из лунок, содержащих нужные антитела, клонировали (то есть повторно рассеивали по таким же лункам, но из расчета 1 клетка на лунку), вновь культивировали и проверяли на присутствие нужных антител. Процедуру повторяли 1–2 раза. Таким образом, отбирали клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности, то есть моноклональные антитела. Полученные клоны можно заморозить при –70 °С и хранить до того, пока они не потребуются. Их можно культивировать и накапливать антитела в культуральной среде, а можно привить мышам (так как гибридомы — это опухолевые клетки), где они будут расти и накапливать колоссальные количества моноклональных антител. От одной мышки можно получить антител не меньше, чем от кролика. Эти антитела не содержат посторонних антител и настолько однородны физико-химически, что могут рассматриваться как чистые химические

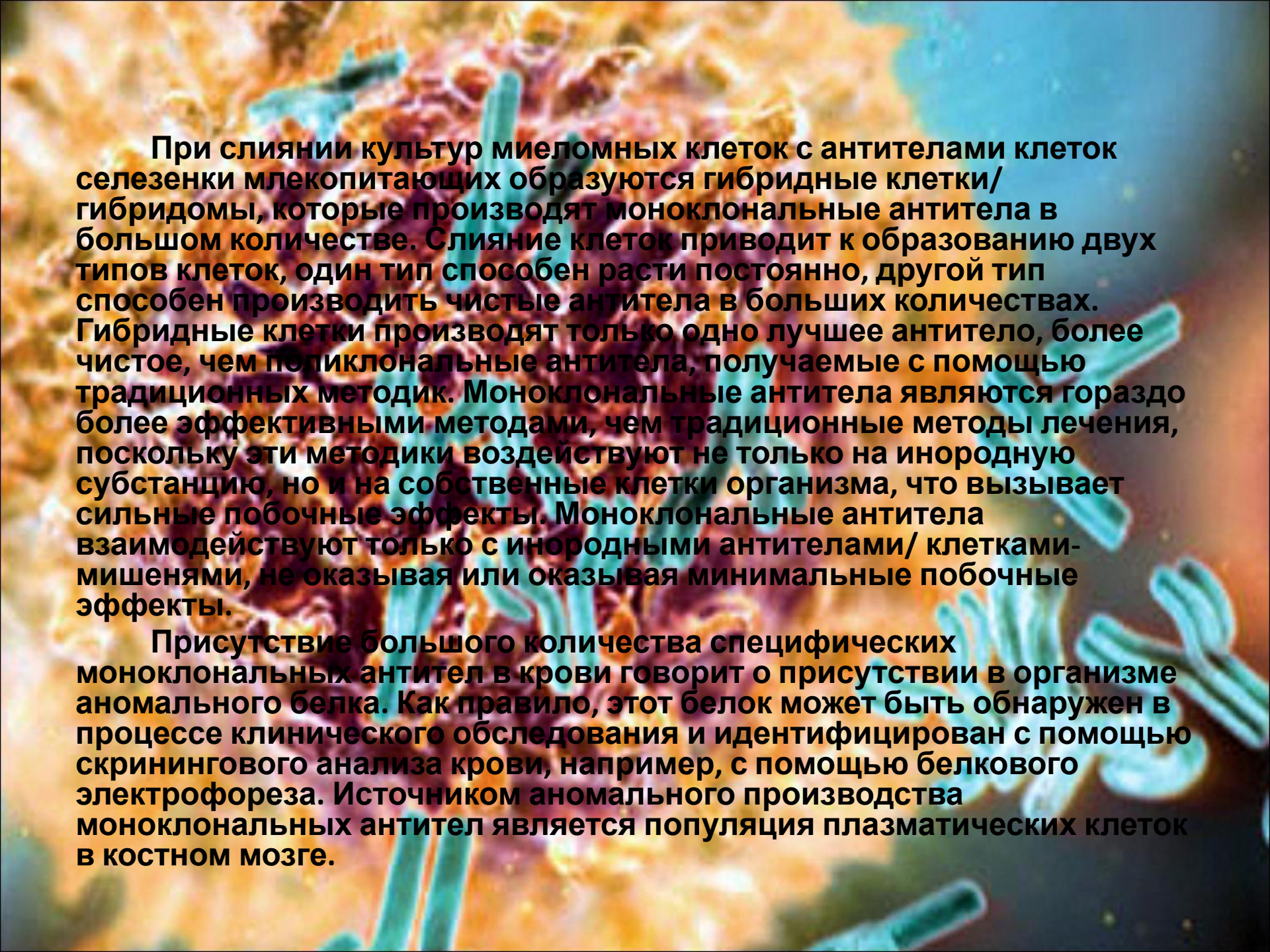
A microscopic view of cells, likely B-lymphocytes, showing their characteristic round shape and internal structure. The background is a warm, golden-brown color, and the cells are scattered across the frame, some appearing more distinct than others.

Животное иммунизируют, в **ответ** на введение антигена в организме **мыш**и активизируются продуцирующие антитела В-лимфоциты. Эти клетки **могут жить** только в организме хозяина, при переводе на **искусственную** питательную среду они гибнут. Если слить **иммунную клетку** с опухолевой, образуются гибридные клетки, **способные неограниченно** долго жить в искусственных **средах**. **Одновременно они** сохраняют способность **синтезировать антитела**.

Гибридомы, **синтезирующие определенные** виды антител, отбирают на **селективных ростовых средах**. **Затем** их помещают в культуральную **жидкость**, в которой они **размножаются** и образуют много **родственных клеток (клон)**. Такие клоны могут синтезировать антитела, **получившие** название моноклональных (МКА). МКА - антитела, **однородные по структуре** и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.



Другой метод получения антител основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мышки. Там гибридома реплицируется и вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МКА, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Этот метод позволяет получать высококонцентрированные препараты антител. Но массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Кроме того, получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу, с использованием культуры клеток.

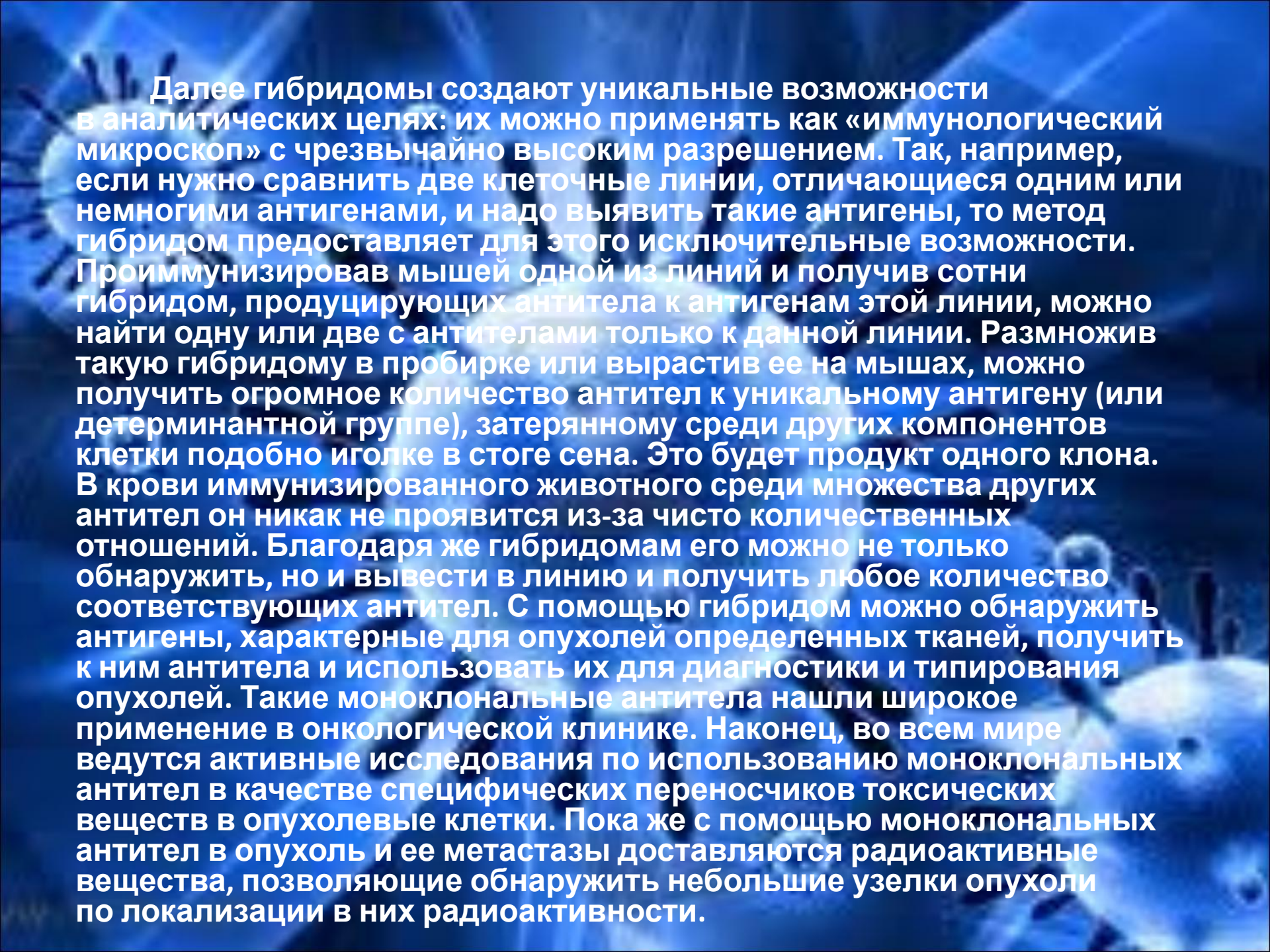


При слиянии культур миеломных клеток с антителами клеток селезенки млекопитающих образуются гибридные клетки/гибридомы, которые производят моноклональные антитела в большом количестве. Слияние клеток приводит к образованию двух типов клеток, один тип способен расти постоянно, другой тип способен производить чистые антитела в больших количествах. Гибридные клетки производят только одно лучшее антитело, более чистое, чем поликлональные антитела, получаемые с помощью традиционных методик. Моноклональные антитела являются гораздо более эффективными методами, чем традиционные методы лечения, поскольку эти методики воздействуют не только на инородную субстанцию, но и на собственные клетки организма, что вызывает сильные побочные эффекты. Моноклональные антитела взаимодействуют только с инородными антителами/клетками-мишенями, не оказывая или оказывая минимальные побочные эффекты.

Присутствие большого количества специфических моноклональных антител в крови говорит о присутствии в организме аномального белка. Как правило, этот белок может быть обнаружен в процессе клинического обследования и идентифицирован с помощью скринингового анализа крови, например, с помощью белкового электрофореза. Источником аномального производства моноклональных антител является популяция плазматических клеток в костном мозге.

Применение

Обычные поликлональные антитела давно и широко применяются для определения биологически активных веществ — белков крови и других биологических жидкостей, гормонов, ростовых факторов, клеточных рецепторов, медиаторов воспаления и иммунитета, бактериальных и вирусных антигенов, различных ядов и т.п. Моноклональные антитела из-за высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения успешно вытесняют и заменяют иммунные сыворотки.



Далее гибридомы создают уникальные возможности в аналитических целях: их можно применять как «иммунологический микроскоп» с чрезвычайно высоким разрешением. Так, например, если нужно сравнить две клеточные линии, отличающиеся одним или немногими антигенами, и надо выявить такие антигены, то метод гибридом предоставляет для этого исключительные возможности. Проиммунизировав мышей одной из линий и получив сотни гибридом, продуцирующих антитела к антигенам этой линии, можно найти одну или две с антителами только к данной линии. Размножив такую гибридому в пробирке или вырастив ее на мышах, можно получить огромное количество антител к уникальному антигену (или детерминантной группе), затерянному среди других компонентов клетки подобно иголке в стоге сена. Это будет продукт одного клона. В крови иммунизированного животного среди множества других антител он никак не проявится из-за чисто количественных отношений. Благодаря же гибриdomам его можно не только обнаружить, но и вывести в линию и получить любое количество соответствующих антител. С помощью гибридом можно обнаружить антигены, характерные для опухолей определенных тканей, получить к ним антитела и использовать их для диагностики и типирования опухолей. Такие моноклональные антитела нашли широкое применение в онкологической клинике. Наконец, во всем мире ведутся активные исследования по использованию моноклональных антител в качестве специфических переносчиков токсических веществ в опухолевые клетки. Пока же с помощью моноклональных антител в опухоль и ее метастазы доставляются радиоактивные вещества, позволяющие обнаружить небольшие узелки опухоли по локализации в них радиоактивности.

Гибридомы сыграли и продолжают играть огромную роль в фундаментальной и прикладной иммунологии. Они созданы на основе клонально-селекционной теории иммунитета и явились самым ярким и окончательным доказательством этой теории. Гибридомы сделали реальностью предполагаемые клоны антителообразующих клеток и позволили даже обнаружить их существование в организме до введения соответствующего антигена. Гибридомы революционизировали иммунологическую промышленность и создали в ней совершенно новые области. Благодаря гибридомам возникли новые методы диагностики многих заболеваний и открылись новые пути для изучения злокачественных опухолей. И хотя гибридомы скорее относятся к гениальным изобретениям, а не к открытиям, они были отмечены в 1984 году Нобелевской премией «за открытие и разработку принципов выработки моноклональных антител с помощью гибридом». Если бы Кёлер и Мильштейн запатентовали свой метод, они вскоре бы стали миллиардерами, так как все, кто использовал бы гибридомы в коммерческих целях, должны были бы платить за право пользоваться патентом. Авторы гибридом, несомненно, понимали это, но в интересах развития науки не пошли на такой шаг. Метод гибридом беспрепятственно вошел во все сферы иммунологии, и сами авторы всемерно способствовали этому, предоставляя свою клеточную линию плазмоцитомы для исследований всем желающим. И первые гибридомы в нашей стране, полученные в 1979–1980 годах, были созданы на основе клеток, ведущих происхождение из лаборатории этих авторов и с их любезного разрешения.