

ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ФОРМИРУЕМЫЙ ВВЕДЕНИЕМ ТРАНСГЕННЫМ МЫШАМ ДНК-ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ КДНК ГЕНА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

Зубков А.В.¹, Бутова Л.Г.¹, Кузьмина Н.С.¹, Яковлева И.В.¹,
Гаврилова Н.Ф.¹, Корноухова А.А.¹, Сидоров А.В.¹,
Хрейм Уаель Б.В.², Кузьменко В.В.², Зубкова И.В.³, Фадеев В.В.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Во всем мире растет число больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреозит). Важнейшим моментом в диагностике диффузного токсического зоба является выявление аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (рТТГ) в сыворотке крови больных. Для дифференциальной диагностики антител к антигенам щитовидной железы перспективно тестирование на основе моноклональных антител к рецептору тиреотропного гормона человека, которые можно получить не только в результате иммунизации животных нативным или рекомбинантным белком рецептора тиреотропного гормона, но и при ДНК-иммунизации генно-инженерными конструкциями, содержащими фрагменты гена рТТГ. На базе мРНК, выделенной нами из ткани щитовидной железы пациентов с диффузным токсическим зобом, клонирован ряд фрагментов гена рецептора тиреотропина, которые могли бы быть пригодны для ДНК-иммунизации животных; оценить один из сконструированных векторов – рVAX1pТТГ (1160) в качестве иммуногена на мышинной модели стало целью настоящей работы. Наличие фрагмента гена рецептора тиреотропного гормона, размером 1160 п.н., который был трансфецирован в составе вектора рVAX1 в клеточную линию CHO, было установлено методами иммуноблоттинга и ИФА. Иммунный ответ, формирующийся на введение мышам линии BALB/c вектора рVAX1, содержащего фрагмент кДНК гена рецептора тиреотропного гормона человека, был выявлен в разных вариантах ИФА. Иммунизация животных ДНК-вектором рVAX1-рТТГ по экспериментально подобранной схе-

Адрес для переписки:

Зубков Александр Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (903) 618-02-78.
E-mail: alex_zubkov@list.ru

Address for correspondence:

Alexander V. Zubkov
I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera
5a Malyy Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (903) 618-02-78.
E-mail: alex_zubkov@list.ru

Образец цитирования:

А.В. Зубков, Л.Г. Бутова, Н.С. Кузьмина,
И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, А.А. Корноухова,
А.В. Сидоров, Б.В. Хрейм Уаель, В.В. Кузьменко,
И.В. Зубкова, В.В. Фадеев «Иммунный ответ,
формируемый введением трансгенным мышам
ДНК-вектора, содержащего фрагмент кДНК
гена рецептора тиреотропного гормона человека»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 941-952. doi: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

© Зубков А.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Zubkov, L.G. Butova, N.S. Kuzmina, I.V. Yakovleva,
N.F. Gavrilova, A.A. Kornoukhova, A.V. Sidorov, B.V. Khraim
Wael, V.V. Kuzmenko, I.V. Zubkova, V.V. Fadeev
“The immune response formed by the introduction of a DNA
vector containing a cDNA fragment of the human thyroid-
stimulating hormone receptor gene into transgenic mice”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 941-952.
doi: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

© Zubkov A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

ме оказалась эффективной для формирования у опытных животных спленоцитов, секретирующих антитела к рецептору тиреотропного гормона человека, которые были использованы для успешной гибридизации. Это подтверждалось результатами определения антител — продукции к рецептору тиреотропного гормона человека в сыворотках крови мышей: уровень продукции антител оставался высоким (титр более 1:10 000) на 8-й неделе эксперимента. В результате селекции индивидуальных клонов по критериям пролиферативной активности и стабильности продукции антител были отобраны наиболее стабильные культуры гибридом, секретирующие МкАт против рецептора тиреотропного гормона человека.

Ключевые слова: рТТГ, ДНК-иммунизация, мышинная модель аутоиммунного заболевания, МкАт против рТТГ, аутоантитела, иммунный ответ

THE IMMUNE RESPONSE FORMED BY THE INTRODUCTION OF A DNA VECTOR CONTAINING A cDNA FRAGMENT OF THE HUMAN THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE INTO TRANSGENIC MICE

Zubkov A.V.^a, Butova L.G.^a, Kuzmina N.S.^a, Yakovleva I.V.^a,
Gavrilova N.F.^a, Kornoukhova A.A.^a, Sidorov A.V.^a, Khraim Wael B.V.^b,
Kuzmenko V.V.^b, Zubkova I.V.^c, Fadeev V.V.^c

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. The number of patients with autoimmune thyroid diseases (Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis) is increasing globally. The most important part in the diagnosis of Graves' disease (GD) is the detection of autoantibodies to the thyrotropin receptor (TSHR) in Graves' patients' sera. For the differential diagnosis of antibodies to thyroid antigens, it is promising to use tests based on monoclonal antibodies to TSHR, which can be obtained not only as a result of immunization with native or recombinant TSHR protein, but also through DNA immunization with genetically engineered constructs containing fragments of the TSHR gene. Based on mRNA we isolated from the thyroid tissue in GD, a number of fragments of the thyrotropin receptor gene were cloned, suitable for DNA immunization of animals. The purpose of this work is to evaluate the immunogenic properties of one of the constructed vectors, pVAX1-TSHR (1160), in a mouse model. The successful inclusion of the extracellular domain gene fragment of the human TSHR (1160), which was transfected into CHO cells as a part of the pVAX1 vector was confirmed by immunoblotting and ELISA. The immune response formed to the injection of the pVAX1 vector into BALB/c mice, containing a fragment of the human TSHR gene, was detected in different versions of ELISA. Immunization of animals with the DNA vector pVAX1-TSHR according to an experimentally selected scheme was effective for the formation of mouse splenocytes, secreting antibodies to TSHR, which were used for successful hybridization. This was confirmed by the results of determining antibody production to TSHR in murine blood sera. The level of antibody production remained high (titer more than 1:10.000) at the 8th week of the experiment. As a result of selection of individual clones according to the criteria of proliferative activity and stability of antibody production, the most stable cultures secreting mAbs against TSHR were selected.

Keywords: TSHR, DNA immunization, mouse model of autoimmune disease, mAb against TSHR, autoantibodies, immune response

Введение

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) — аутоиммунное заболевание, приводящее к нарушению функции щитовидной железы (ЩЖ), в форме гипертиреоза, имеет распространенность в популяции от 0,5% (у мужчин) до 2,0% (у женщин), с тенденцией к увеличению заболеваемости [7]. В

сыворотке крови больных с ДТЗ аутоантитела к рецептору ТТГ, индуцирующие развитие гипертиреоза и зоба, определяются в 89-98% случаев [10]. Аутоантитела к рецептору тиреотропина (рТТГ или TSHR) представляют преимущественно изотип IgG и, следовательно, зависят от CD4⁺T-клеток для их генерации [14].

Показано, что стимулирующие ЩЖ антитела могут генерироваться у мышей, например плазмиды TSHR-ДНК, введенная разными способами мышам, индуцирует синтез тиреостимулирующих антител (TSAb) у мышей линии BALB/c, а также гипертиреоз у беспородных мышей [8]. Сообщалось о возможности разработки модели иммунного ответа, приводящей к образованию трансгенных мышей с экспрессией человеческой А-субъединицы TSHR, с помощью инъекций pVAX1-TSHR, аналогично иммунизации белком TSHR человека. Уникальный экспрессионный вектор pVAX1 часто используется для формирования иммунного ответа с помощью ДНК-вакцин [6].

В результате выделения нами мРНК из ткани ЩЖ больного ДТЗ на матрице кДНК амплифицированы ПЦР-продукты, соответствующие фрагментам гена внеклеточного домена рТТГ, и создана коллекция клонов-продуцентов рекомбинантных плазмид pAL2-T. Участок гена рТТГ, 1160 п.н., который почти полностью кодирует фрагмент альфа-субъединицы рТТГ, был реконструирован с помощью pVAX1. Нуклеотидная последовательность фрагмента рТТГ1160 после клонирования в вектор pVAX1 была определена методом секвенирования по Сэнгеру, и оказалась полностью идентичной последовательности рТТГ, депонированной в GenBank [1]. **Целью настоящей работы** стало оценить иммуногенные свойства созданного вектора pVAX1-рТТГ 1160 на модели мыши.

Материалы и методы

Штаммы и линии

Векторы: pVAX1, pVAX1-TSHR 1160;

Штамм *Escherichia coli*: XL1 Blue;

Клеточные линии:

клетки миеломы мыши линии P3X63Ag8.653, спленоциты, макрофаги мышей линии BALB/c,

клетки яичника китайского хомячка Chinese Hamster Ovary (CHO),

Cell Line: E77.4 ATCC;

Мыши линии BALB/c.

Для создания вектора pVAX1, экспрессирующего часть модели TSHR1160, использовали фрагмент гена рТТГ, кодирующий альфа-субъединицу рТТГ.

Сыворотки, антисыворотки и конъюгаты антител

Сыворотки крови доноров и больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), содержащие различные концентрации АТ к рТТГ, предоставлены ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России.

МкАт мыши против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой из корня хрена, произведены ЛТД «Сорбент» (Москва, Россия).

Иммунизация лабораторных животных

В работе использовали мышей линии BALB/c, выращенных в питомнике: Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования на животных проводили в соответствии с международными и российскими рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных. Состояние мышей (поведение, масса тела, внешний вид, дыхание) контролировали в течение периода иммунизации [2].

Для иммунизации животных в качестве антигенов использовали препараты плазмидной ДНК, реконструированной с использованием pVAX1. Для увеличения количества вектора, необходимого для иммунизации животных, плазмиды pVAX1-TSHR1160 и pVAX1 без вставки были трансформированы в компетентные клетки *Escherichia coli*, XL-1Blue, предоставленные ЗАО «Евроген» (Россия). Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры *E. coli* XL-1Blue произведено с помощью набора Plasmid Miniprep ЗАО «Евроген» (Россия) по методике производителя. Концентрацию плазмидной ДНК в полученных препаратах измеряли на анализаторе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Инъекции препаратами, содержащими рекомбинантные плазмиды pVAX1, pVAX1-TSHR1160, проводили 1,5-3,0-месячным мышам линии BALB/c, массой (18,0-23,0) г внутримышечно (в четырехглавую мышцу задней конечности) или внутрибрюшинным способом по 25,0 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на одну особь. Перед инъекцией антигены разводили в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl).

Доза и кратность введения антигена, продолжительность иммунизации и интервалы между инъекциями варьировались.

Схема для 1-го эксперимента: А. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1c экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) (n = 5), по 25 мкг в объеме (0,20 ± 0,05) мл в расчете на особь: 0, 1, 3 (недели). Контрольной группе мышей (n = 3) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме (0,20±0,05) мл. Через 7 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен. Б. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) (n = 5), по 25 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на особь: 0, 1, 3 (недели). Контрольной группе мышей (n = 3) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме (0,20±0,05) мл. Через 7 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Схема для 2-го эксперимента: А. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1

с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 5$), по 25,0 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Сроки введения 0, 2, 5 (недели); через 8 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Б. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции pVAX1 ($n = 3$), pVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 5$), по 25,0 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Сроки введения 0, 2, 5 (недели); через 8 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

В. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции pVAX1 ($n = 3$), pVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 3$), по 25 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Сроки введения 0, 1, 3, 6 (недели), контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Через 10 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Определение антител против рТТГ в ИФА в сыворотке крови пациентов с ДТЗ и здоровых доноров

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора DRG EIA3369 по протоколу производителя. В лунках 96-луночного планшета (CorningCostar; Sigma-Aldrich, Борнем, Бельгия) был сорбирован рекомбинантный рТТГ в PBS (0,5 мг/мл) в течение ночи при комнатной температуре. Далее планшеты отмывали 3 раза ФСБТ перед внесением в лунки планшета по 100 мкл образцов сыворотки крови пациентов, содержащие различные концентрации АТ к рТТГ: 1 – 24 МЕ/мл; 2 – 17,01 МЕ/мл; 3 – 14,48, МЕ/мл; 4 – 12,76 МЕ/мл; 5, 6 – < 0,300 МЕ/мл, предварительно разведенные в 10 раз ФСБТ, инкубировали планшеты при 37 °С в течение 2 ч на шейкере (700 об/мин). Планшеты отмывали 3 раза ФСБТ, добавляли МкАт мыши против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой из корня хрена. После блокирования с 1% BSA в PBS сыворотки были тестированы путем инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре. Результаты иммуноферментной реакции учитывали в течение 15-30 мин после внесения субстратно-хромогенной смеси 3,3'-5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), определяя оптическое поглощение раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера Anthos 2020 (Австрия), так же как и во всех других, представленных здесь, вариантах ИФА. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, со-

ответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль), вычитали из значения оптического поглощения в экспериментальной лунке. Титром считали разведение сыворотки, при котором значение оптического поглощения в экспериментальной лунке превышало фоновое на два стандартных отклонения.

Проведение непрямого варианта ИФА в образцах сыворотки крови иммунизированных животных

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора DRG EIA3369 по протоколу производителя. Образцы сывороток крови мышей разводили в 10 и 100 раз и вносили в лунки планшета. Выявление иммуноглобулинов мыши в тесте проводили с использованием поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с ферментной меткой (пероксидазой из корня хрена). Образцы сыворотки крови мышей до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля.

Проведение ингибиторного варианта ИФА с помощью набора фирмы DRG по методике производителя

Образцы сывороток крови мышей разводили в 10, 100 и 1000 раз и вносили в лунки планшета. К образцам добавляли биотинилированный препарат ТТГ, который связывался со свободными рТТГ. Выявление иммуноглобулинов мыши в тесте проводили с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой из корня хрена.

Проведение непрямого варианта «сэндвич» ИФА

Выделенный препарат рТТГ в количестве 10 мкг сорбировали в лунках планшета. После сорбции антигена планшеты выдерживали в течение 16 часов при +4 °С, далее отмывали трижды раствором 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Затем в лунки планшета вносили образцы сыворотки крови, культуральной жидкости и моноклональных антител, разведенные в 10, 100, 1000, 10000 в объеме 100 мкл 0,01 М ФСБ. Инкубировали в течение 60 мин при +37 °С при режиме покачивания 700 об/мин. После этого промывали трижды 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Затем вносили конъюгированные с пероксидазой из корня хрена антивидовые антитела к IgG мыши (Sigma, США) в рабочем разведении 1/10000. Инкубировали 60 мин при +37 °С при покачивании 700 об/мин. Далее промывали трижды 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Вносили в лунки планшета субстратно-хромогенную смесь, содержащую 3,3'-5,5 ТМБ, инкубировали 30 мин при +25 °С в темноте. Реакцию останавливали внесением 0,2 М раствора H₂SO₄. Интенсивность сигнала определяли при длине волны 450 нм, референтная длина волны – 620 нм.

Гибридизация. Модель pVAX1 (TSHR1160)

Иммунизацию проводили трижды (три инъекции) путем внутримышечного или внутрибрю-

шинного введения иммуногена по 25 мкг через две и три недели после предыдущей инъекции. Через три недели после последней инъекции производили забор крови для определения содержания антител к рТТГ. После анализа сыворотки крови особям, демонстрирующим наибольшее значение титра антител через 8 недель, за три дня до процедуры гибридизации проводили бустерную инъекцию рVAX1-рТТГ в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl) в количестве 25 мкг, в объеме 0,2 мл на особь. Сыворотку отделяли от клеток крови центрифугированием и хранили при температуре минус 20 °С до использования. Образцы сыворотки крови мышей до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля.

Для получения гибридом – продуцентов МкАТ к рТТГ в качестве антигена использовали препарат в форме ДНК-вакцины рVAX1-рТТГ; в качестве источника В-лимфоцитов – спленоциты мышей линии BALB/c, сыворотки которых максимально взаимодействовали с антигеном, примененным для иммунизации, по сравнению с другими особями экспериментальной группы, использовали в составе гибридизационной смеси. В составе гибридизационной смеси также использовали клетки миеломы мыши линии Р3Х63Аg8.653, растущие в суспензионной культуре (коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

В качестве фидерного слоя использовали перитонеальные макрофаги.

Культивирование гибридом *in vitro* и селекция клонов-продуцентов МкАТ против рТТГ

Гибридные клоны выращивали в среде ГАТ, содержащей 20% FCS. Рост клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа. Эффективность гибридизации рассчитывали как отношение числа лунок с растущими гибридными культурами к числу засеянных.

В лунках, где гибридные клоны имели достаточный размер для тестирования, отбирали супернатанты, в которых проверяли содержание специфических антител против искомого антигена методом ИФА в непрямом варианте. Анализу были подвергнуты супернатанты (надосадочное содержимое лунки) в разведении фосфатным буфером 1:20. В качестве отрицательного контроля служила соответствующая среда культивирования для гибридом в разведении фосфатным буфером 1:20. Критерий отбора гибридом – оптическая плотность (ОП) супернатанта среды культивирования более 0,500 при длине волны 450 нм, при отрицательном контроле ОП среды менее 0,100. Эффективность клонирования рассчитывали как отношение числа лунок с высоким уровнем синтеза МкАТ к числу лунок с растущими гибридными культурами.

Клетки из лунок, давших положительный сигнал в ИФА, наращивали в 24-луночных культуральных планшетах, 6-луночных культуральных планшетах, а затем во флаконах, объемом 75 мл, каждый из которых содержал фидерный слой из макрофагов.

По мере роста клеток супернатанты неоднократно тестировали ИФА с целью отбора стабильных клонов-продуцентов МкАТ против рТТГ, лучшие из которых были последовательно дважды клонированы методом лимитирующих разведений. Плотность суспензий контролировали под инвертированным микроскопом.

Иммуноблоттинг проводили методом «влажного» переноса белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану в буфере для иммуноблоттинга при постоянном токе 90 мА в течение 16-18 ч при температуре +4 °С [13].

Статистический анализ

Сравнение между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критерий использовали для измерения общих различий в анти-TSHR IgG уровнях с применением программного обеспечения MS Excel в графиках ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Иммуноблоттинг рекомбинантного рецептора тиреотропного гормона (TSHR387)

На рисунке 1 представлены результаты иммуноблоттинга супернатантов лизатов клеток СНО, трансфицированных рVAX1 без вставки, 4 мкг, и рVAX1-TSHR, 4 мкг.

Взаимодействие рекомбинантных белков рТТГ с аутоАТ к рТТГ в образцах сыворотки крови пациентов с ДТЗ и здоровых доноров представлено на диаграммах (рис. 2).

Иммунизация животных

Представляем результаты 2 независимых и воспроизводимых экспериментов. Динамика массы тела мышей в процессе 1-го эксперимента отражена на рисунке 3 (А – внутрибрюшинное введение иммуногена, Б – внутримышечное введение иммуногена). Результаты ИФА образцов сыворотки крови иммунизированных животных приведены на рисунках 4-6.

ИФА образцов сыворотки крови иммунизированных животных

Результаты ИФА, непрямой вариант, образцов сыворотки иммунизированных мышей (ед. ОП), полученных в 1-м эксперименте, отражены на рисунке 4.

Ингибиторный иммуноферментный анализ полученных в 1-м эксперименте образцов сыворотки иммунизированных мышей

На рисунках 5, 6 представлены результаты определения уровня продукции антител против рТТГ через ингибирование связывания рТТГ,

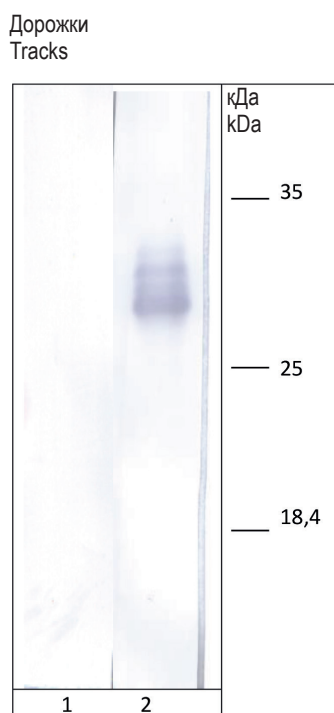


Рисунок 1. Нитроцеллюлозная мембрана, проявленная сывороткой крови с повышенным содержанием АТ к рТТГ (24,0 МЕ/мл)

Примечание. 1 – супернатант лизатов клеток CHO, трансфицированных pVAX1, 4 мкг; 2 – супернатант лизатов клеток CHO, трансфицированных pVAX1-TSHR, 4 мкг.

Figure 1. Nitrocellulose membrane, developed blood serum with an increased content of antibodies to TSHR (24.0 IU/mL)

Note. 1, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 2, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR, 4 µg.

в процентах, в образцах сыворотки мышей, иммунизированных pVAX1-TSHR (1160) двумя способами.

В ходе 2-го эксперимента массу тела мышей контролировали в течение всего периода иммунизации, как показано на рисунке 7 (А-В).

Иммуноферментный анализ полученных во 2-м эксперименте образцов сыворотки иммунных животных

Результаты ИФА отражены на рисунке 8.

Гибридизация. Модель pVAX1 (TSHR 1160). Культивирование гибридом in vitro и селекция клонов-продуцентов МкАт против рТТГ

Гибридизационная смесь для шести 96-луночных планшетов, по три планшета на каждую схему иммунизации, была подготовлена для культивирования в соотношении, приблизительно, 1:8 (30 млн клеток миеломы) и 112 млн спленоцитов (введение препарата внутрибрюшинное) и 107 млн спленоцитов (введение препарата внутримышечное).

На 14-й день после слияния из 288 засеянных лунок в 274 наблюдался рост гибридом (внутрибрюшинное введение препарата); из 288 засеянных лунок в 268 наблюдался рост гибридом (внутримышечное способ введения препарата). Растущие гибридные клетки можно было наблюдать уже на третий день после слияния.

Первичный скрининг, проведенный на 14-й день культивирования, выявил культуры, синтезирующие антитела к рТТГ, из них 95 получены при внутрибрюшинном введении препарата, 56 – при введении препарата внутримышечно. Для дальнейшей селекции из 151 использовали 56 наиболее активных гибридом, сохранивших способность к росту и синтезу антител против рТТГ (ОП > 0,800, из них n = 34, в/б; n = 22, в/м), которые были перенесены в 24-луночные культуральные планшеты (2-й пассаж). После третьего тестирования все первичные культуры гибридом были заморожены при температуре -80 °С; (ОП > 1,000, из них (n = 18, в/б), (n = 14, в/м). Супернатанты среды культивирования гибридом отправлены для хранения при температуре (0 – +4) °С. Лучшие тринадцать гибридом (ОП > 1,500, из них n = 8, в/б, n = 5, в/м), перенесены во флаконы, объемом 75 мл (3-й пассаж). Лучшие шесть из тринадцати (5 – в/б, 1 – в/м) были отобраны для клонирования методом лимитирующих разведений. Полученные в результате клонирования культуры гибридом были заморожены при температуре -80 °С.

Методами иммуноблоттинга и ИФА подтверждено наличие фрагмента гена рецептора тиреотропного гормона, размером 1160 п.н., который был трансфицирован в составе вектора pVAX1 в клетки CHO. Полосы преципитации с антителами из сыворотки крови с повышенным содержанием АТ к рТТГ (24,0 МЕ/мл) наблюдались на нитроцеллюлозной мембране только с продуктами экспрессии вектора pVAX1-TSHR1160 в CHO (рис. 1). Полосы преципитации соответствовали белкам с молекулярной массой 40, 30, 20 кДа. Наличие нескольких продуктов экспрессии рТТГ, вероятно, вызвано деградацией исходного рекомбинантного белка или экспрессией рекомбинантных белков различной длины.

Пропорциональное увеличение содержания продуктов вектора pVAX1-TSHR (рекомбинантных белков рТТГ) приблизительно в 2 раза при увеличении количества трансфицируемого вектора с 2 мкг/мл до 4 мкг/мл продемонстрировано на рисунке 2, что свидетельствует о специфичности экспрессии полученных продуктов – рекомбинантных белков рТТГ. При этом не выявлено реакции в ИФА экспрессированного фрагмента рТТГ с образцами сыворотки крови здоровых доноров. Результаты, полученные методами ИФА и иммуноблоттинга, дали основание использовать

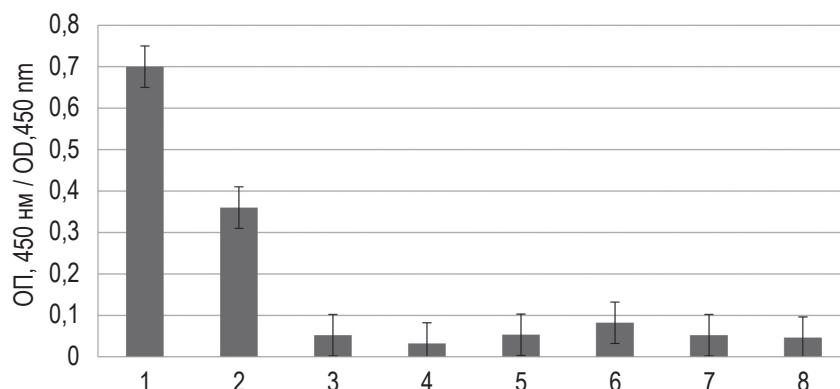


Рисунок 2. Результаты ИФА взаимодействия экспрессированного фрагмента рТТГ с образцами сыворотки крови пациентов с ДТЗ (А) и здоровых доноров (Б)

Примечание. А: 1 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 4 мкг; 2 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 2 мкг; 3 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1; 4 – супернатанты лизатов клеток CHO. Б: 5 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 4 мкг; 6 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 2 мкг; 7 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1; 8 – супернатанты лизатов клеток CHO.

Figure 2. ELISA results of interaction of the expressed TSHR fragment with blood serum samples of patients with GB (A) and from healthy donors (B)

Note. A: 1, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 4 µg; 2, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 2 µg; 3, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 4, supernatant of lysates of CHO cells. B: 5, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 4 µg; 6, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 2 µg; 7, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 8, supernatant of lysates of CHO cells.

pVAX1-TSHR в качестве ДНК-вектора для иммунизации.

В наших опытах схемы иммунизации были выбраны эмпирически и с учетом литературных данных. Для оценки иммуногенности ДНК-вакцин используют в зависимости от цели исследования различные схемы иммунизации: дозировки (от 5 мкг до 500 мкг, чаще 50 мкг на мышшь); способы введения (подкожный, внутримышечный посредством метода электропорации, внутрибрюшинный, чаще внутримышечный); кратность введения (от однократного с учетом через 4 недели, двукратного или четырехкратно-

го с двух- и трехнедельным интервалом и учетом через 3 недели после последней инъекции, чаще трехкратного с двухнедельными интервалами и учетом через 2 недели после последней инъекции) [3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17]. Для 1-го эксперимента была выбрана доза 25 мкг/мышшь, кратность – 3 инъекции – с интервалом 0, 1, 3, 6 недель, два способа введения: внутримышечный и внутрибрюшинный. Второй эксперимент отличался от 1-го эксперимента кратностью и продолжительностью иммунизации, а также изменением интервала между инъекциями, но с сохранением дозы для одной инъекции и 2 спо-

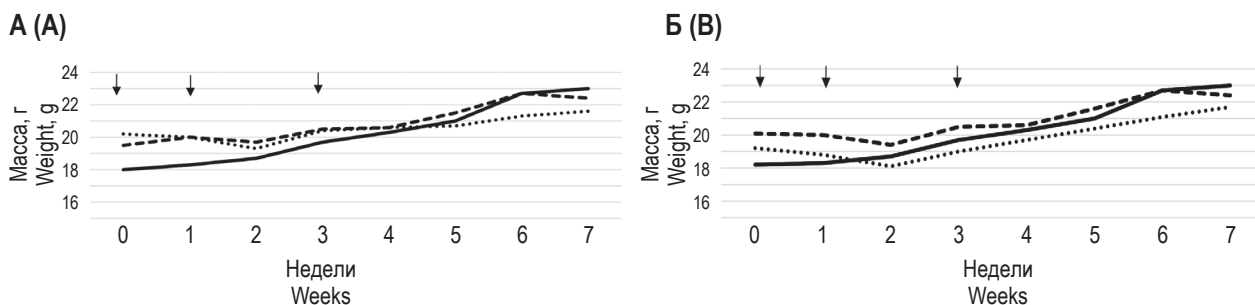


Рисунок 3. Динамика массы тела мышей в процессе 1-го эксперимента

Примечание. – pVAX1-TSHR (1160) опытная группа. ----- – pVAX1 контрольная группа. ——— – 0,9% NaCl контрольная группа. А – внутрибрюшинное введение. Б – внутримышечное введение. Время введения препаратов указано стрелками.

Figure 3. Dynamics of body weight of mice during the 1st experiment

Note., pVAX1-TSHR 1160 experimental group. -----, pVAX1 control group. ———, 0,9% NaCl control group. A, intraperitoneal injection. B, intramuscular injection. Arrows indicate the moment of drug administration.

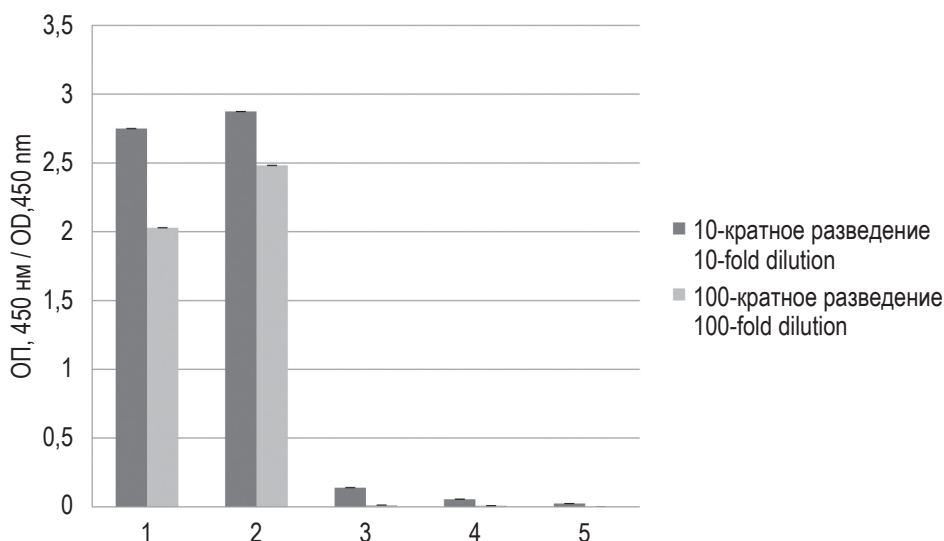


Рисунок 4. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ в сыворотке крови мышей, ИФА, непрямой вариант (1-й эксперимент)

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160), внутрибрюшинное введение. 2 – pVAX1-TSHR (1160), внутримышечное введение. 3 – pVAX1, внутримышечное введение. 4 – 0,9% NaCl, внутримышечное введение. 5 – отрицательный контроль.

Figure 4. Results of determining the level of production of antibodies against TSHR, ELISA, indirect variant (1st experiment)

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160), intraperitoneal administration. 2, pVAX1-TSHR (1160), intramuscular injection. 3, pVAX1, intramuscular injection. 4, 0,9% NaCl, intramuscular injection. 5, negative control.

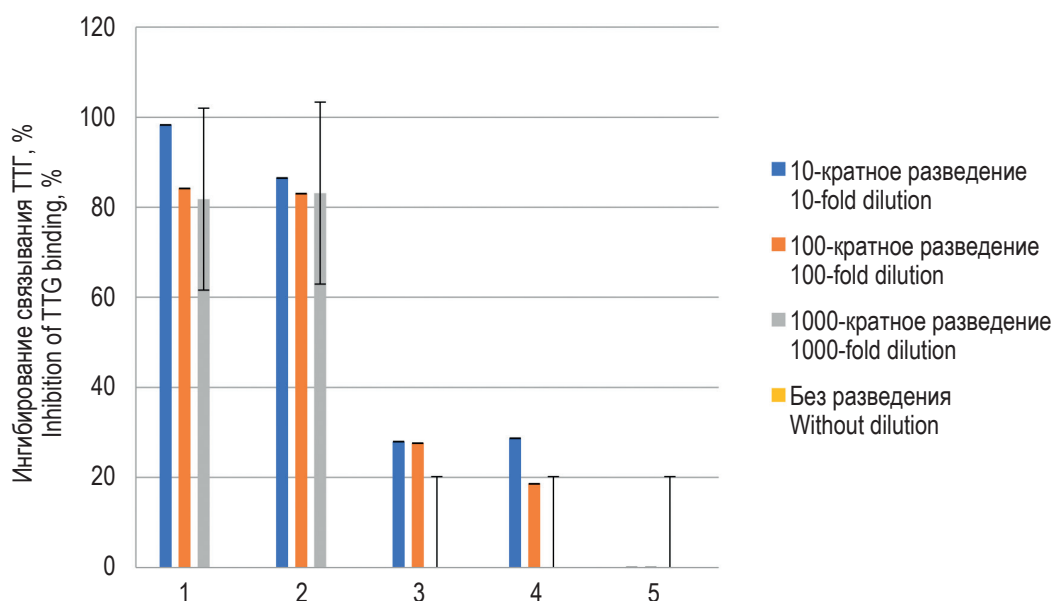


Рисунок 5. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ, через ингибирование связывания рТТГ, ИФА, ингибиторный вариант (1-й эксперимент)

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение. 2 – pVAX1-TSHR (1160) внутримышечное введение. 3 – pVAX1 – внутримышечное введение. 4 – 0,9% NaCl внутримышечное введение. 5 – отрицательный контроль.

Figure 5. Results of determining the level of production of antibodies to TSHR, by Inhibition of TSHR binding, ELISA inhibitory variant (1st experiment)

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration. 2, pVAX1-TSHR (1160) intramuscular injection. 3, pVAX1 intramuscular injection. 4, 0,9% NaCl intramuscular injection. 5, negative control.

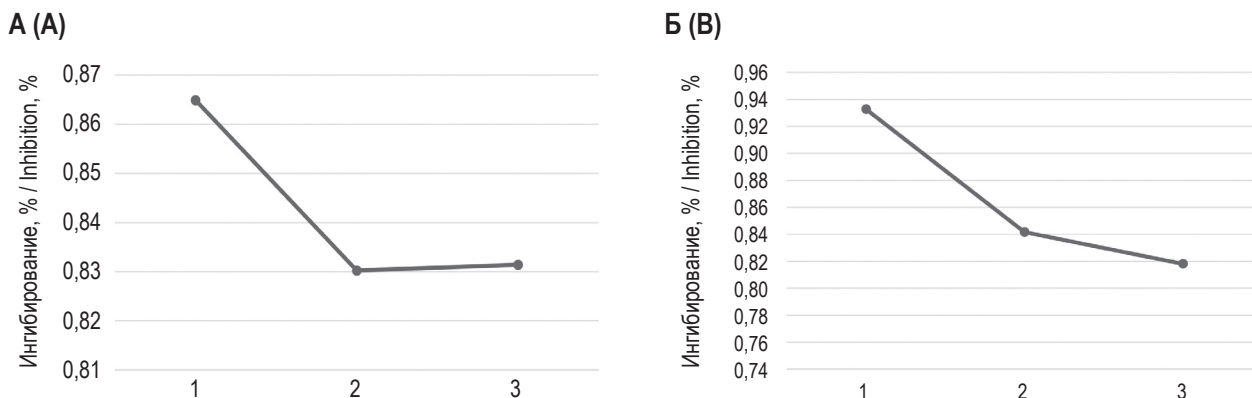


Рисунок 6. Ингибирование связывания рТТГ (дополнение к рисунку 5)

Примечание. А – внутрибрюшинное введение. Б – внутримышечное введение. 1 – 10-кратное разведение. 2 – 100-кратное разведение. 3 – 1000-кратное разведение.

Figure 6. Inhibition of TSHR binding (addition to Figure 5)

Note. A, intraperitoneal administration. B, intramuscular injection. 1, 10-fold dilution. 2, 100-fold dilution. 3, 1000-fold dilution.

способов введения внутримышечного и внутрибрюшинного. В течение всего периода наблюдений мышей взвешивали, отмечая изменения массы тела, представленные на рисунках 3, 7. Можно отметить, что в процессе обоих экспериментов масса тела животных из опытных групп, так же из контрольных групп, увеличивалась, с незначительными флуктуациями, независимо от способа введения иммуногена, что свидетельствует об отсутствии токсичности препаратов.

При определении активности антител к рТТГ в сыворотке иммунизированных мышей отмечали, что в лунках, содержащих разведенные в 10 и в 100 раз сыворотки крови мышей, иммунизированных путем внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции вектором рVAX1-TSHR, в ИФА (непрямой вариант), был получен положительный сигнал (ОП более 2,0 О. Е.). Относительно низкое значение сигнала наблюдалось в лунках отрицательного контроля, и содержащих разведенные в 10 и 100 раз сыворотки крови пре-иммунных мышей и мышей, иммунизированных внутримышечно рVAX1 без вставки, и физиологическим раствором. Значение ОП сигнала в лунках отрицательного контроля не превышало 0,024 О. Е. (рис. 4).

Высокий уровень продукции АТ к рТТГ был выявлен при анализе разведенных в 1000 раз сывороток крови мышей из опытных групп, иммунизированных путем внутримышечного или внутрибрюшинного введения вектора рVAX1-рТТГ, (ингибиторный вариант ИФА, рис. 5) пропорционально разведению сывороток, как продемонстрировано на рисунке 6: для внутримышечного (А) и внутрибрюшинного (Б) введения препарата. При анализе сывороток крови мышей контрольных групп, которым вводили, соответствен-

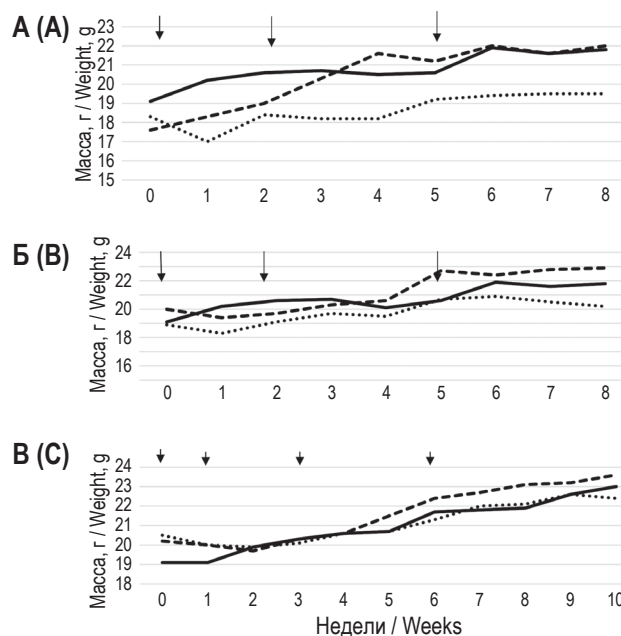


Рисунок 7. Динамика массы тела мышей в процессе 2-го эксперимента

Примечание. – опытная группа рVAX1-TSHR (1160). ---- – контрольная группа рVAX1. ——— – контрольная группа 0,9% NaCl. А – внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. Б – внутримышечное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. В – внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. Стрелки указывают время введения препарата.

Figure 7. Dynamics of body weight of mice during the 2nd experiment

Note., experimental group pVAX1-TSHR (1160). ----, control group pVAX1. ———, control group 0.9% NaCl. A, intraperitoneal administration, experiment duration 8 weeks. B, intramuscular injection, experiment duration 8 weeks. C, intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. Arrows indicate the moment of drug administration.

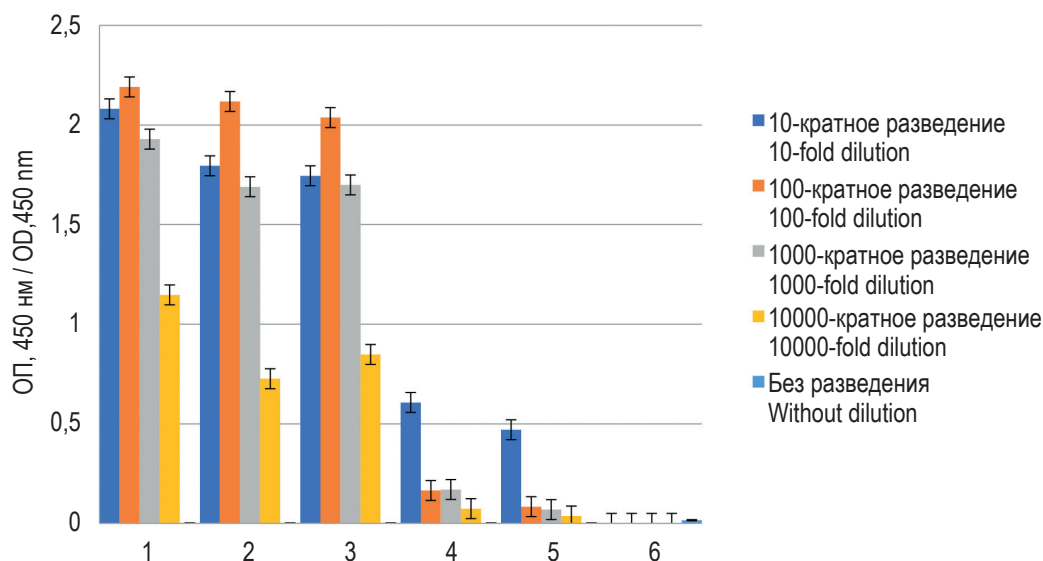


Рисунок 8. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ в ИФА, с использованием непрямого варианта «сэндвич» в сыворотках крови мышей

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. 2 – pVAX1-TSHR (1160) внутримышечное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. 3 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 4 – pVAX1 внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 5 – 0,9% NaCl внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 6 – отрицательный контроль.

Figure 8. Results of determining the level of production of antibodies against TSHR in ELISA, using the indirect “sandwich” option in the blood sera of mice

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration, experiment duration 8 weeks. 2, pVAX1-TSHR (1160) intramuscular injection, experiment duration 8 weeks. 3, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 4, pVAX1 intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 5, 0,9% NaCl intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 6, negative control.

но, вектор pVAX1 без вставки и физиологический раствор, сигнал ингибирования был невысоким.

Таким образом, вектор pVAX1-TSHR1160, содержащий фрагмент гена рецептора тиреотропного гормона человека, вызывает формирование иммунного ответа у мышей линии BALB/c, посредством внутримышечного или внутрибрюшинного введения в дозе 25 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на особь, что было подтверждено двумя вариантами ИФА – непрямым и ингибиторным.

Во втором опыте в сыворотках крови мышей из опытных групп, иммунизированных вектором pVAX1-рТТГ, как продемонстрировано на рисунке 8 (непрямой «сэндвич»-вариант, ИФА), был выявлен высокий уровень АТ к рТТГ, с титром, значительно превышающим 1:10 000, по сравнению с отрицательным контролем. В лунках отрицательного контроля, а также содержащих разведенные в 100 раз сыворотки крови мышей, которым вводили внутримышечно pVAX1 без вставки или физиологический раствор, наблюдалось отсутствие сигнала (рис. 8).

Иммунизация мышей ДНК-вектором pVAX1-TSHR (1160) с применением схемы трехкратного введения препарата путем внутрибрюшинной

или внутримышечной инъекции, в дозе 25 мкг, с двухнедельными интервалами и учетом через 2-3 недели после последней инъекции, оказалась пригодна для успешной гибридизации. Эффективность гибридизации составила 95,0% в опыте с внутрибрюшинным введением препарата, 93,0% – при внутримышечном введении препарата. Значительная часть культур гибридом оказались нестабильными продуцентами МкАт к рТТГ. Эффективность клонирования культур составляла 19,8% (53 из 268) при внутримышечном введении иммуногена; 30,4% (95 из 274) – при внутрибрюшинном введении иммуногена. В результате дальнейшей селекции была создана коллекция культур гибридом – продуцентов МкАт к рТТГ и депо МкАт против рТТГ.

Заключение

Разработана модель иммунного ответа на введение pVAX1-рТТГ мышам как с помощью внутрибрюшинных, так и внутримышечных инъекций, о чем свидетельствует способность мышей продуцировать антитела к рТТГ, уровень продукции которых с титром более 1:10 000 остается высоким на 8-й неделе эксперимента.

Иммунный ответ на введение экспрессирующегося в векторе рVAX1 фрагмента кДНК гена рецептора тиреотропина человека рТТГ 1160 на мышинной модели подтвержден методом ИФА в трех вариантах – непрямым, ингибиторном и в непрямом «сэндвич»-варианте.

Подобрана схема иммунизации трансгенных мышей линии BALB/c посредством рекомбинантного вектора рVAX1-рТТГ 1160, эффективная для формирования у опытных животных спленоцитов, секретирующих антитела к рТТГ, которые были использованы для успешной гибридизации. Эффективность гибридизации составила 95,0% (274 из 288) в опыте с внутрибрюшинным введе-

нием препарата, 93,0% (268 из 288) – при внутримышечном введении препарата.

В результате селекции индивидуальных клонов по критериям пролиферативной активности и стабильности продукции антител удалось получить стабильные культуры гибридом, секретирующие МкАт против рТТГ.

Синтез рекомбинантных белков рТТГ в результате ДНК-иммунизации открывает перспективы получения моноклональных антител к рецептору и исследования изменений структуры рТТГ в патогенезе аутоиммунных заболеваний и создания тестов для совершенствования диагностики и лечения АИЗ ЩЖ.

Список литературы / References

1. Зубков А.В., Андреева М.А., Сидоров А.В., Милованова А.В., Бутова Л.Г. Клонирование гена рецептора тиреотропного гормона человека // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 278-280. [Zubkov A.V., Andreeva M.A., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Butova L.G. Cloning of the human thyroid-stimulating hormone receptor gene. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 278-280. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006600-5.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В.Грачева. М.: ПРОФИЛЬ-2С, 2010. 358 с. [A guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology. Ed. by Karkishchenko N.N. and Gracheva S.V.]. Moscow: PROFIL-2S, 2010. 358 p.
3. Chen C.R., Pichurin P., Nagayama J. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves' disease is the culprit as well as the victim *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, no. 12, pp. 1897-1904.
4. Feng K., Zheng X., Wang R. Long-Term Protection Elicited by a DNA Vaccine Candidate Expressing the prM-E Antigen of Dengue Virus Serotype 3 in Mice. *Front. Microbiol.*, 2020, Vol. 10, 87. doi: 10.3389/fcimb.2020.00087.
5. Gilbert J.A., Kalled S.L., Moorhead J. Treatment of autoimmune hyperthyroidism in murine model Graves' disease with tumor necrosis factor family ligand inhibitor suggest a key role for B cell activating factor in disease pathology. *Endocrinology*, 2006, Vol. 147, no. 10, pp. 4561-4568.
6. Jansson L., Vrolix K., Jahraus A. Immunotherapy with epitopes blocks the immune response to TSH receptor in HLA-DR transgenic mice. *Endocrinology*, 2018, Vol. 159, no. 9, pp. 3446-3457.
7. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int. J. Celiac Dis.*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 151-155.
8. Moshkelgosha S., So P.W., Deasy N. Cutting edge: Retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology*, 2013, Vol. 154, pp. 3008-3015.
9. Rapoport B., McLachlan S.M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. *Endocr. Rev.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 114-134.
10. Peng J., Xiao Y., Wan X. Enhancement of Immune response and anti-infection of mice by porcine antimicrobial peptides and interleukin-4/6 fusion gene encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*, 2020, Vol. 8, 552. doi: 10.3390/vaccines8030552.
11. Schluter A., Horstmann M., Diaz-Cano S. Genetic immunization with mouse thyrotropin hormone receptor plasmid breaks self tolerance for a murine model of autoimmune thyroid disease and Graves' orbitopathy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 191, pp. 255-267.
12. Sonaimuthu P., Ching X.T., Fong M.Y. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with toxoplasma gondii rhoptry. *Front. Microbiol.* 2016, Vol. 7, 808. doi: 10.3389/fmicb.2016.00808.
13. Towbin H., Stachelin T., Gardon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel stonitrocellulose sheets. Procedures and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, Vol. 76, pp. 4350-4354.
14. Weetman A.P, Jateman M.E, Ealey P.A. Thyroid stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J. Clin. Invest.*, 1990, Vol. 86, no. 3, pp. 723-727.
15. Zheng B., Ding J., Chen X. Immuno efficacy of a t. Gondii secreted protein with an altered thrombospondin repeat (TgSPATR) as a novel DNA vaccine candidate against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 216. doi: 10.3389/fmicb.2017.00216.

16. Zheng X., Chen H., Wang R. Effective Protection induced by a monovalent DNA vaccine against Dengue Virus (DV) serotype 1 and a bivalent DNA vaccine against DV1 and DV2 in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, 175. doi: 10.3389/fcimb.2017.00175.

17. Zheng X., Yu X., Wang Y. Complete protection for mice conferred by a DNA vaccine based on the Japanese encephalitis virus P3 strain used to prepare the inactivated vaccine in China. *Virology*, 2020, Vol. 17, 126. doi.org/10.1186/s12985-020-01400-3.

Авторы:

Зубков А.В. — к.м.н., заведующий лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Бутова Л.Г. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кузьмина Н.С. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Яковлева И.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гаврилова Н.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Корноухова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сидоров А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Хрейм Уазель Б.В. — аспирант ИБХТН ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Кузьменко В.В. — аспирант ИБХТН ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Зубкова И.В. — врач клинической лабораторной диагностики, межклиническая клинико-диагностическая лаборатория ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Фадеев В.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой эндокринологии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Zubkov A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Butova L.G., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Kuzmina N.S., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Gavrilova N.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Kornoukhova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Sidorov A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of DNA Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Khraim Wael B.V., Postgraduate Student, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Kuzmenko V.V., Postgraduate Student, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Zubkova I.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Interclinical Clinical Diagnostic Laboratory, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Fadeev V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Endocrinology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 01.04.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 12.04.2024