53

POPIS OBJAVU
K DIPLOMU ČÍS.

Prihlásené :6.11.85 (PO 69-85)

Právo prednosti od 31.12.65

Zverejnené: Biologické práce XI/4,1965, vyd.SAV Bratislava

Udelené: 07. 12. 89

Vydané:

MDT 547.96

Autor objavu: **Styk Bohumil MUDr. DrSc., Bratislava**

Názov objavu: **Protilátkový kofaktor v ľudských a živočíšnych sérach**

Predmet objavu: Jav spočívajúci v existencii novej zložky ľudských a zvieracích sér, nazvanej autorom sérový protilátkový kofaktor, ktorý podstatne ovplyvňuje schopnosť včasného inaktivovaného imúnneho séra reagovať s vírusom chrípky.

Pri štúdiu vlastností nových chrípkových vírusov tzv. ázijskej chrípky zameranému najmä na dynamiku tvorby a charakteru špecifických protilátok sa zistilo, že titer protilátok klesá, ak sa imúnne séra pred vyšetrením zahrievajú. Najskôr sme sa domnievali, že ide o protilátky, ktoré sú citlivé na takéto zahrievanie. Ďalším výskumom sa zistilo, že na zahrievanie nie sú citlivé samotné protilátky, ale nejaká iná zložka séra, nejaký kofaktor, ktorý účinkoval spolu s protilátkami a ktorý sa zahrievaním narušil. Ak táto termolabilná zložka sa pridala v podobe normálneho séra k zahriatemu imúnnemu séru, protilátky sa reaktivovali a imúnne sérum malo titer ako pred zahriatím. Zistilo sa, že ide o novú látku - sérový protilátkový kofaktor (Styk B.,: Acta virol. 5, 334-341, 1961).

Neznalosť existencie kofaktora viedla dovtedy v rade vedeckých a diagnostických pracovísk k negatívnym výsledkom najmä pri testovaní sér po infekcii alebo imunizácii, obsahujúcich tzv. "imperfektné" protilátky (termín zavedený autorom objavu).

V ďalšom výskume sme sa zamerali na vysvetlenie a popísanie vlastností tejto dovtedy neznámej zložky živočíšnych sér sérového kofaktora, ktorá má významnú úlohu v priebehu reakcie myxovírusov s protilátkou a na dôkaz jej odlíšenia od dovtedy známych zložiek séra.

Podobný vedecký problém ešte nebol riešený. Nie sú známe žiadne publikácie, ktoré sa týkajú podstaty objavu. Už pred týmto objavom bolo známe, že aktivita niektorých antivírusových protilátok sa znižuje po tepelnej inaktivácii séra. V týchto prípadoch však ide o protilátky vyžadujúce si komplement. V ďalšej časti sú uvedené dôkazy z ktorých jednoznačne vyplýva, že kofaktor nie je totožný s komplementom, ale že ide o novú, neznámu sérovú zložku, ktorá má aktivačnú a potenciačnú funkciu.

Neskoršie literárne údaje iných autorov potvrdili objavenie sérového kofaktora. Sú to práce najmä nórskych virológov Harboeho, Strandliho a spolupracovníkov. V práci uverejnenej v Acta pathol. microbiol. scand 56 : 311 - 318, 1962 potvrdzujú správnosť, opodstatnenosť a pôvodnosť objavu.

Podstatou objavu je zistenie doteraz neznámej zložky ľudských a zvieracích sér, nazvanej autorom sérový protilátkový kofaktor. Táto zložka podstatne ovplyvňuje schopnosť včasného inaktivovaného imúnneho resp. rekonvalescentného séra reagovať s vírusom chrípky.

Pri výskume biologických vlastností kmeňov chrípky A 2 sa zistilo, že inaktivované myšie sérum má titer protilátok nižší akosérum natívne. Titer sa zvýši (zreštauruje) na pôvodnú hodnotu, ak sa k inaktivovanému séru pridá normálne čerstvé myšacie sérum. Kofaktor stabilizuje komplex vírus-protilátka a znižuje sklon tohto komplexu k disociácii. Princíp titrácie kofaktora spočíva v stanovení minimálneho kvanta natívneho normálneho séra, ktoré je ešte schopné reaktivovať pôvodný titer indikátorového (inaktivovaného) včasného imúnneho antiséra voči vírusu chrípky A 2. Ukázalo sa, že okrem zmeny produkcie včasných 19 S (Svedbergova jednotka) protilátok na protilátky typu 7 S nastáva v pozdnom hyperimúnnom sére aj zmena vnímavosti k potenciačnému efektu kofaktora. Kofaktor sa uplatňuje hlavne v teste inhibície hemaglutinácie ako i v teste neutralizácie vírusa.

Kofaktor je makroglobulínovej povahy v natívnych sérach rozličných živočíšnych druhov. Potvrdilo sa to zonálnou ultracentrifugáciou v denzitnom gradiente, ako aj gélovou filtráciou. Pri imunoelektroforéze bola kofaktorová aktivita viazaná na beta$_2$ makroglobulíny. Pri elektroforéze na papieri pri pH 9,0 sa kofaktor myšieho séra pohyboval s betaglobulínmi. Preparát kofaktora o pomerne značnej čistote sa získal precipitáciou bielkovín hovädzieho séra rivanolom (2-etoxy-6,9 diaminoakridín laktát) alebo neokalom (dibutylnaftalén sulfát) s následnou chromatografiou na dietylaminoetyl celulóze resp. karboxymetylcelulóze.

Protilátkový kofaktor nie je identický so známymi sérovými zložkami: komplementom a jeho komponentami, ani s properdínom. Je tiež odlišný od tzv. beta a gama-inhibítorov, ako aj od plazmínu.

Pretože biologické vlastnosti kofaktora by mali byť podobné ako má komplement (C') alebo jeho zložky, najväčšia pozornosť sa venovala dôkazom, že kofaktor nie je časťou komplementového systému, prípadne jeho zložiek (najmä C' 1, ktorá je tiež termolabilná).

Pri separácii normálnych sér pomocou gélovej filtrácie sa podarilo oddeliť kofaktor od zložiek komplementu. Kofaktorová aktivita sa vyskytovala (pri separácii pomocou Sephadexu G 200) prevážne v prvom vrchole obsahujúcom makroglobulíny, zatiaľ čo jednotlivé zložky komplementu boli prítomné hlavne v 7 S globulínovom vrchole.

Kvantitatívne porovnanie obsahu kofaktora a C'1 pred dekomplementizáciou sér väzbou na precipitát antigén - protilátka a po nej, vykázalo rozdiely presahujúce 4 rády.

Kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA), ktorá blokuje aktivitu zložky C'1 vychytávaním Ca^{2+} iónov, necháva kofaktorovú aktivitu intaktnou v ľudskom, myšom, konskom, prasačom, cicačiom a hovädziom sére. Kvantitatívne porovnanie aktivít C'1 a kofaktora opäť prinieslo viac ako 4-rádové rozdiely.

Látky s antikomplementárnou aktivitou, a to dextransulfát, heparín, pelentan a trypsín neovplyvnili podstatnejšie titer kofaktora, podobne ako odstránenie zložky C'3 pôsobením zymozánu, čím bola komplementová aktivita blokovaná.

Experimentálne sa takto preukázalo, že protilátkový sérový kofaktor nie je identický s komplementom ani jeho zložkami. Ďalšie metodické postupy a dôkazy, ktorými sa jednoznačne potvrdila existencia kofaktora a jeho odlišnosť od komplementu a jeho zložiek sú podrobnejšie uvedené v Biologických prácach XI/4 1965: Vírusové protilátky a sérový kofaktor.

Osobitný význam má zistenie a určenie celkom odlišných vlastností protilátkového kofaktora a iných sérových zložiek v sére novorodených prasiat. V dôsledku impermeability prasačej placenty pre sérové bielkoviny matky obsahuje sérum novorodených prasiat iba proteíny, ktoré sú syntetizované vlastným vyvíjajúcim sa organizmom. Protilátkový kofaktor

novorodených prasiat má podstatne nižšiu molekulovú hmotnosť (zistené centrifugáciou v gradiente hustoty a gélovou filtráciou, aktivita kofaktora je vo frakcii obsahujúcej albumín). Okrem toho je tento kofaktor extrémne termorezistentný. Podobne má nižšiu molekulovú hmotnosť gama-inhibítor v natívnych sérach; beta-inhibítor je zas termorezistentný. Táto časť objavu odlišných vlastností cicavčieho protilátkového kofaktora a iných zložiek séra má základný biologický význam pre oblasť tvorby proteínov a pre imunológiu vôbec.

Význam objavu spočíva najmä v jeho prínose pre rozvoj vedy v oblasti základnej biológie, imunológie a virológie, v jeho využití v zdravotníckej praxi. Poznatky o objavení protilátového kofaktora postupne overili a potvrdili viacerí domáci i zahraniční autori. Najmä publikácie Harboeho a spol. sú cenné v tom, že nielen potvrdili zistenie a význam kofaktora a rozšírili poznatky o ňom, ale si opravili vlastné predošlé názory.

K praktickému využitiu objavu kofaktora došlo vo virologicko-sérologickej diagnostike chrípky a v epidemiologickej praxi. Z objavu vyplynuli niektoré zásadné poznatky pre diagnostickú prax.

V prvom rade ide o zistenie, že kofaktor je termolabilný. Pri aplikácii akejkoľvek metódy na odstránenie nešpecifických inhibítorov sa inaktivuje. Ak však nie sú tangované vlastné protilátky, je možné pridaním nového kofaktora titer protilátok zreštaurovať na pôvodnú hodnotu.

Odstraňovanie nešpecifických inhibítorov pomocou jodistanu draselného je nevhodné. Jodistan draselný pôsobí nepriaznivo na kofaktor a často i na imperfektné protilátky.

Najvhodnejšia metóda na odstránenie nešpecifických inhibítorov je opracovanie séra pomocou enzýmu (Receptor destroying enzyme - enzým rozrušujúci receptory) z filtrátu mikróba Vibrio cholerae. Preparát RDE v ČSSR sa nevyrábal a nevhodné boli aj zahraničné preparáty. Na základe zistenia, že niektoré preparáty RDE rozrušujú včasné imperfektné protilátky

vyvinul sa taký preparát RDE, ktorý je aktívny a umožňuje reštaurovať titer kofaktorom. V tejto súvislosti vznikol vynález na "Spôsob výroby cholera filtrátu" - semipurifikovaného RDE, na ktoré bolo udelené čs. autorské osvedčenie č. 171 413 a vynález na "Spôsob finálnej úpravy cholera filtrátu" resp. RDE", na ktoré bolo udelené čs. autorské osvedčenie č. 175 665.

SLOVENSKÁ AKADÉMIA VIED
Úrad pre vynálezy a objavy
INFORMAČNÉ CENTRUM
842 53 BRATISLAVA, Dúbravská cesta 9