

## ТЕМА 4. ІМУНОЕЛЕКТРОФОРЕЗ. РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ. РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

### Імуноелектрофорез. Види імуноелектрофорезу

При дослідженні складних сумішей антигенів, молекулярні маси яких близькі, дослідження наявності окремих антигенів проводять з використанням імуноелектрофорезу. Імуноелектрофорез сполучає поділ антигенів в електричному полі за значенням заряду молекули з імунопреципітацією у гелі.

Всі методи імуноелектрофорезу засновані на електрофоретичній міграції антигенів у гелі, що може містити або не містити антитіла й на специфічній імунопреципітації антигенів при взаємодії з відповідними преципітуючими антитілами.

У кожній конкретній системі антиген-антитіло утворюються відповідні преципітати. Площа, займана цими преципітатами, пропорційна співвідношенню антиген-антитіло.

Таким чином, методи імуноелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

Вімуноелектрофорезу число молекул антитіл, що з'єднується з молекулами антигену, називають еквівалентною кількістю. Еквівалентна кількість – кількість антигену, що приєднується до певної кількості антитіл з утворенням максимальної кількості преципітату. Чіткість преципітату при електрофорезі забезпечується міграцією антитіл в область преципітату з навколишнього гелю. Розподілення та форма смуг преципітації при розподілу білків сироватки в ІЕФ аналізу є відносно стабільними і відтворюваними. Будь-яке відхилення є ненормальним. Ці відхилення можуть бути виявлені шляхом оцінки таких особливостей смуг преципітації як: позиція преципітату; спотворення кривизни або дуги преципітату; щільність і відносне подовження смуги; скорочення (гальмування), проріджування або подвоєння

Таким чином, методи імуноелектрофорезу застосовні як для імунологічної ідентифікації, так і кількісного визначення антигенів і (або) антитіл.

ІЕФ являє собою надійний і точний метод виявлення білків, їхніх структурних аномалій та зміни концентрації

### Зональний електрофорез

Зональний електрофорез - напівкількісний метод, що дозволяє розділити суміш білків в залежності від їх молекулярної маси і електричного заряду. Суть методу полягає в наступному: досліджувану суміш білків на носії (наприклад, пластині з гелем, папір, ацетат целюлози) поміщають у камеру для електрофорезу, заповнену буферним розчином і підключену до джерела постійного струму.

При електрофорезі білків сироватки звичайно виходить 5 основних смуг, які відповідають фракціям альбуміну,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -глобулінів (рис. 14).

Імуноглобуліни мігрують переважно у фракцію  $\gamma$ -глобулінів, хоча також присутні у фракціях  $\alpha_2$ - і  $\beta$ - глобулінів. Відносний вміст кожної фракції сироваткових білків можна оцінити за допомогою денситометра. За допомогою зонального електрофорезу можна досліджувати не тільки сироватку, але й інші біологічні рідини, наприклад СМР (спинозмозкова рідина) і сечу. Цей метод дозволяє оцінити білковий склад досліджуваної проби і виявити моноклональні антитіла, хоча він недостатньо чутливий для визначення моноклональних антитіл у низькій концентрації на ранніх стадіях мієломної хвороби.

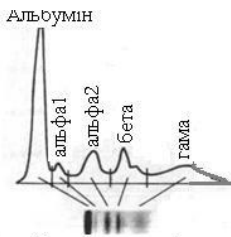


Рис.14. - Зональний електрофорез сироватки з денситограмою

### Зональний імуоелектрофорез

Суть методу полягає в наступному:

- 1) проводять електрофоретичної розділення білків в гелі;
- 2) після закінчення електрофорезу в гелі паралельно на  $\perp$  правлінню електрофорезу вирізують борозенки;
- 3) в борозенки вносять антитіла (антисироватки), наприклад до важких ( $\alpha$ -,  $\mu$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -,  $\delta$ -) або легких ( $\lambda$ -,  $\kappa$ -) ланцюгів імуноглобулінів.

Ці антитіла і розділені при електрофорезі білки дифундують назустріч один одному. У тих місцях, де антитіла зв'язуються з білками, утворюються дуги преципітації (рис.15).

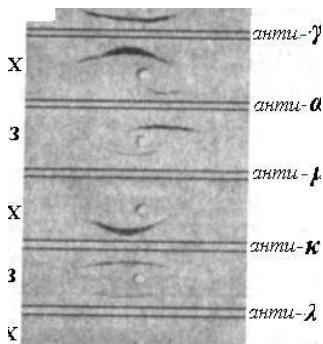


Рис.15. – Імуоелектрофорез сироватки здорової людини (З) та хворої (Х) на моноклональну гамопатію, що супроводжується підвищенням рівня  $\gamma$ - та  $\kappa$ -ланцюгів. Антитіла  $\gamma$ - та  $\kappa$ -ланцюгам утворюють більш ширші дуги преципітації з сироваткою хворого, ніж сироваткою здорової людини.

Імуоелектрофорез дозволяє оцінити лише якісний склад досліджуваної суміші білків. Оцінка результатів дослідження вимагає високої кваліфікації. Найчастіше цей метод застосовується для виявлення і характеристики моноклональних антитіл.

Відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемія Вальденстрема, злоякісних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях. Зональний імуоелектрофорез відмінний скринінг-тест, для того щоб виявити наявність аномальних білків, таких як при мієломі, макроглобулінемії Вальденстрема, злоякісних лімфомах та інших лімфопроліферативних захворюваннях.

## Ракетний імуоелектрофорез

Цей метод аналізу являє собою простий, швидкий (2 – 4 години), добре відтворюваний метод визначення даного білка в декількох зразках білкової суміші. Розбавлені розчини зразків, які підлягають порівнянню, вносять у лунки, розташовані в ряд. Електрофорез ведуть в агарових гелі, що містить моноспецифічну антисироватку. Ідентифікацію білка проводять за утворенням піку преципітації у формі ракети, а кількісне визначення можна робити за висотою піку.

Висота піка пропорційна концентрації антигену, що визначається.

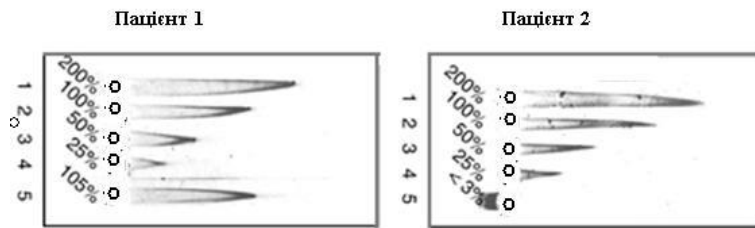


Рис. – 16. – Ракетний імуоелектрофорез.

На рис.16 відображено визначення фактору Н – регуляторного білку в системі комплементу. У лунках 1 – 4 розведення моноспецифічної сироватки до Н фактору (стандарт), у лунці 5 – досліджувана сироватка. Відповідно до отриманих даних у сироватці пацієнта 1 фактор Н відсутній, у пацієнта 2 його вміст складає 105 %.

## Електрофорез з імуофіксацією (ІФЕ)

Частіше всього електрофорез з імуофіксацією (ІФЕ) застосовують в діагностиці моноклональних гамопатій – стан, в якому один клон плазматичних клітин дає підвищений рівень одного класу імуоглобулінів.

При діагностиці моноклональних гамопатій важливо виявити наявність у сироватці крові моноклональних антитіл відповідного класу, а у сечі - κ- або λ- легких ланцюгів ( білки Бенс-Джонса).

Для виявлення моноклональних антитіл проводять ІФЕ. ІФЕ являє собою двоступеневу процедуру з використанням електрофорезу білка у чистому гелю агарози на першому етапі та імуопреципітації на другому.

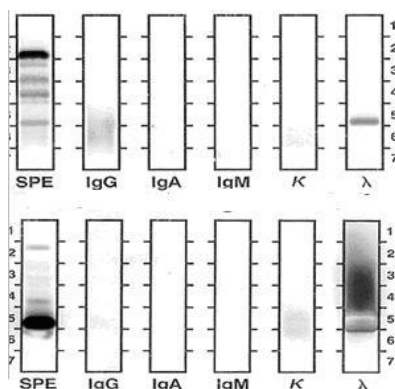


Рис.17. -Виявлення моноклональних антитіл з використанням ІФЕ

Рис. 17. –Виявлення моноклональних білків у сироватці крові та сечі за допомогою електрофорезу з імуофіксацією.

На першому етапі багатоканальною піпеткою в лунки гелю вносять досліджувану рідину пацієнта (краще як що це буде 4-5 канална піпетка, що дозволяє одразу зробити 4-5 паралельних фореграм) і проводять електрофорез.

Другий етап. По закінченню електрофорезу вирізають кожну фореграму і на кожну смужку гелю накладають змочені в розчині анти- $\kappa$ , анти- $\lambda$ , анти-IgG, анти-IgM паперові смужки (Ватман № 1)[ ] ; накривають вологою полімерною плівкою, поміщають у вологу камеру, інкубують протягом 1 години. За сей час антитіла з паперу дифундують у гель і утворюють імунні комплекси з тими антигенами, які присутні у гелі. Потім гель агарози ретельно висушують між листами фільтрувального паперу, відмивають від білків, що не зв'язались, знову просушують і забарвлюють Coomassie Brilliant Blue R або іншими барвниками для білка. У місцях локалізації відповідних моноклональних білків (антигенів), що утворили імунопреципітат, спостерігаються пофарбовані у синій кольор плями (рис. 17). Відповідно до даних рис.17 при електрофорезі білків сироватки крові у  $\gamma$ -фракції виявляється М-градієнт – наявність моноклонального імуноглобуліну (SPE). При імунофіксації встановлено, що моноклональні білки представлені G-імуноглобулінами с переважанням легких ланцюгів типу  $\lambda$ . При паралельному проведенню електрофорезу з імунофіксацією сечі ( рис.16, нижні гелі) виявляється високий рівень  $\lambda$ -ланцюгів. Таким чином, за допомогою ІФЕ встановлене G $\lambda$  тип мієломи. Встановлення типу гампатії важливо для лікаря гематолога.

Досліджуватися може сироватка, сеча, спинномозкова рідина та інші рідини тіла.

Застосування ІФЕ. ІФЕ використовується з метою встановлення наявності (або відсутності) та ідентифікації парепротейнів, виявлення підвищення або зниження рівня різних груп білків у сироватці крові й сечі. Частіше ІФЕ призначають для виявлення й ідентифікації моноклональних антитіл (надмірна продукція одного класу імуноглобулінів).

Моноклональний білок може виявлятися й у сечі й у сироватці, а може тільки в сечі. Наприклад, білок Бенс Джонсона – легкий ланцюг імуноглобулінів може виявлятися тільки в сечі. Невелика молекула цього білка легко фільтрується нирками й надходить у вторинній сечі.

Електрофорез білків сечі може бути призначений для оцінки стану нирок при цукровому діабеті й, автоімунних захворюваннях. Не призначається електрофорез при запальних інфекціях сечових шляхів

Джерела помилок при імуноелектрофорезі:

- 1)застосування струм у неправильному напрямку;
- 2)некоректний рН буфера;
- 3)некоректний час поділу;
- 4)сума перерахованих помилок.

### **Реакція зв'язування комплементу (РЗК)**

Ця реакція дозволяє оком виявити наявність, або відсутність утворення комплексу антиген-антитіло (рис.23). Вона ґрунтується на здатності комплементу зв'язуватися з комплексом АГ-АТ. С1 компонент комплементу зв'язується с Fc-фрагментами IgG і IgM у складі комплексів. Реакція перебігає у дві фази. Перша фаза – взаємодія антигену та антитіла.

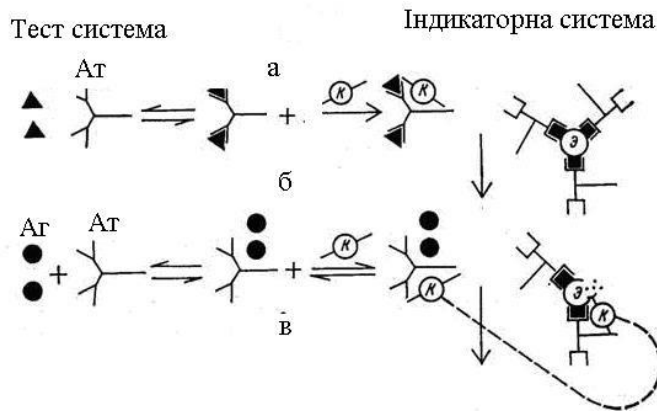


Рис. 23. - Схема реакції зв'язування комплементу  
 а - лізис сенсibilізованих еритроцитів у присутності комплементу;  
 б - відсутність гемолізу внаслідок фіксації комплементу комплексом Аг-Аг; в - лізис еритроцитів в результаті відсутності комплексу Аг-Аг.

В якості матеріалу, що містить антитіла, використовується досліджувана сироватка, до якої додається відомий антиген. До цієї системи додають розчин стандартного комплементу і інкубують при 37°C протягом однієї години. Друга фаза – виявлення результатів реакції за допомогою індикаторної гемолітичної системи (еритроцити барана і гемолітична сироватка кролика, що містить антитіла до еритроцитів барана). До суміші антиген + антитіло + комплемент (1-а фаза) додають індикаторну систему і знову інкубують при 37°C протягом 30 - 60 хв, після чого оцінюють результати реакції. Руйнування еритроцитів відбувається в разі приєднання до гемолітичної системи комплементу. Якщо комплемент раніше зв'язався на комплексі АГ + АТ, то гемоліз еритроцитів не настає. При відсутності в досліджуваній сироватці специфічних антитіл, комплекс АГ + АТ не утворюється і комплемент залишається непов'язаним. При додаванні гемолітичної системи комплемент приєднується до неї і відбувається гемоліз еритроцитів.

При позитивній реакції у досліджуваній системі відбувається зв'язування комплементу, і тоді при додаванні сенсibilізованих антитілами еритроцитів гемолізу не спостерігається. Реакцію застосовують для серодіагностики сифілісу (реакція Васермана), вірусних та бактеріальних інфекцій.

### Реакція радіального гемолізу еритроцитів

Може виконуватись в гелі. Завись еритроцитів барана поміщають в агарозний гель з комплементом; в застиглому на склі шарі гелю роблять лунки і вносять до них гемолітичну сироватку – антитіла до еритроцитів барана. Навколо лунок в результаті радіальної дифузії антитіл утворюється зона гемолізу, радіус якої прямо пропорційний титру сироватки. Якщо сорбований на еритроцитах який-небудь антиген, наприклад глікопротеїновий гемаглютинін вірусу грипу, краснухи або кліщового енцефаліту, то можна відтворити феномен гемолізу імунними сироватками до цих вірусів. Реакцію радіального гемолізу в гелі застосовують в

діагностиці вірусних інфекцій. Вона характеризується простотою постановки, нечутливістю до сироватковим інгібіторам, дозволяє титрувати сироватки крові за діаметром зони гемолізу, не вдаючись до серійних розведень.