

## **Лекція 1. Антитіла – головний інструмент імунохімії**

*Питання для розгляду*

*Вступ до проблеми тематики курсу*

*Реакція антиген-антитіло, формування імунного комплексу – основа імунохімічного аналізу.*

*Антигени, визначення, властивості.*

*Полі – та моноспецифічні антитіла, їх одержання. Поняття афінності та авідності антитіл.*

*Будова і функція основних класів антитіл.*

*Поняття комплементарності антиген-антитіло. Імунні комплекси*

### **Вступ до проблеми тематики курсу.**

Імунний аналіз (імуноаналіз) – це застосування реакції взаємодії антигену з антитілом для визначення концентрації одного з цих реагентів в розчині. При оцінці можливостей віднесення того чи іншого методу імуноаналізу до певного типу до уваги приймаються головним чином наступні фактори:

- 1) основний принцип;
- 2) характеристики використовуваних антитіл;
- 3) система поділу (може включати твердий носій для одного з реагентів);
- 5) тип мітки, що застосовується для контролю реакції зв'язування;
- 6) тип реакції і система детектування.

### **Антитіла як реагенти імунного аналізу**

Антитіла є одним з найбільш важливих реагентів при визначенні антигенів методом імуноаналізу.

Антитіла можуть бути

- 1) полі-або моноклональними;
- 2) різного типу (IgG або IgM) і підтипу (IgG1, IgG2a);
- 3) моно-, бі- або полівалентними;
- 4) моно-або біспецифічними;
- 5) антиалотиповими або антиідіотиповими;
- 6) нативними або отриманими хімічним або генно-інженерним шляхом;
- 7) міченими або пов'язаними тим або іншим способом з твердою фазою.

Поліклональні антисироватки (поліклональні антитіла) можуть містити до 10 000 різних типів молекул IgG. Навпаки, всі молекули моноклональних антитіл повинні бути ідентичними. Моноклональні антитіла переважніше використовувати в методах конкурентного імуноаналізу, оскільки в цьому випадку можна стверджувати, що мічений або пов'язаний з твердою фазою антиген і речовина, що визначається, конкурують за один і той же центр зв'язування. Моноклональні антитіла дуже добре працюють в "сандвіч"-аналізі, оскільки, як правило, добре відома специфічність їх епітопів. Такі антитіла легко отримувати у великих кількостях і з високим ступенем чистоти. Більшість нативних антитіл бівалентні, і всі вони моноспецифічні.

Антитіла можуть бути міченими або пов'язаними з твердою фазою з допомогою пасивної адсорбції або за рахунок ковалентних зв'язків.

## **Класифікація методів імунного аналізу за способом детекції утворених комплексів антиген-антитіло**

Використання антитіл як універсального інструменту імунного аналізу засновано на специфічності взаємодії антиген-антитіла з формуванням імунних комплексів, а методи імунного аналізу розрізняються способом детекції утворених імунних комплексів.

Умовно методи лабораторної імунології можна поділити на 3 групи.

Перша група – прямі методи визначення реакції антиген-антитіло. Включають реакції преципітації та аглютинації.

Якщо антиген розчинний, можливо утворення імунних комплексів, які утворюють видимий осад, преципітат. Ця група методів зветься реакції преципітації. Вони можуть здійснюватися в розчині, на полімерній плівці або у гелі. У розчині преципітат визначають оком, лупою, за допомогою нефелометрії або турбодіметрії. При використанні гелю виявлення преципітатів можливо здійснювати оком, а після фарбування – оком та за допомогою денситометрії.

Якщо антиген нерозчинний, входить до складу клітин бактерій, найпростіших, еритроцитів або сорбований на еритроцитах та частках, то імунні комплекси утворюються на поверхні клітин бактерій, еритроцитів та часток, а антитіла в складі комплексів визначають утворення аглютинатів, які визначають оком. При використанні у якості носія антигену еритроцитів кажуть про реакції гемаглютинації, при використанні часток латексу говорять про латексаглютинацію. В основі як реакції аглютинації, так і преципітації лежить здатність антитіл і антигенів утворювати ґрати. Ґрати утворюються за умови зв'язування полівалентного антигену й двовалентного або полівалентного антитіла.

У взаємодії антигену й антитіл розрізняють три фази:

сенсibilізація, утворення ґрат, виявлення комплексу.

Сенсibilізація – зв'язування антигену й антитіла з утворенням невидимого комплексу; утворення ґрат – F(ab)<sub>2</sub>-фрагменти антитіл зв'язується з антигенними детермінантами, розташованими на різних молекулах (частках) антигену й формують ґрати, видимі як преципітат або аглютинат.

Антитіла, що викликають аглютинацію, називають аглютиніни, а преципітацію – преципітині. Цими властивостями володіють IgM та IgG.

Друга група методів визначення реакцій антиген-антитіла заснована на ідентифікації утворених імунних комплексів шляхом виявлення мітки, яку вводять в антиген або антитіла. Антитіла й антигени з мітками називають кон'югати. Мітки можуть бути ферментами – це імуноферментний аналіз, радіоактивними ізотопами – радіоімунний аналіз, флуорохромами – імунофлуоресцентний аналіз і проточна цитометрія, імуноелектронна мікроскопія. Мітять, як правило, вторинні антитіла.

Третя група заснована на використанні імуносенсорів. Принцип методів, заснованих на імуносенсорній технології, полягає в зміні фізико – хімічних властивостей мембрани або іншого носія антигену, що зв'язав антитіла. Зміна мембранного потенціалу, зміна оптичних або хімічних властивостей

середовища, що прилягає до носія, виявляються за допомогою спеціального електрода або оптичного пристрою й виражається у вигляді електричного сигналу.

### **Властивості антигенів та антитіл**

Імунологічний аналіз має у своїй основі специфічність та кількісні взаємодії антитіл з антигеном.

Відповідно до традиційних уявлень, антиген - це молекула, здатна викликати специфічний імунний відповідь, який має три форми: продукцію антитіл, розвиток реакцій клітинного імунітету і стан толерантності.

У більш широкому сенсі антигенами позначають суміші молекул, цілі мікроорганізми, клітини, що використовуються як тригер розвитку імунної відповіді, або полідетермінантні мішені для зв'язування антитіл в імунологічних тестах. Для того щоб розрізнити молекули, що індують утворення антитіл, або розвиток реакцій клітинного імунітету антиген називають імуногеном, а молекули, які є мішенями для зв'язування антитіл називають антиген. Це допомагає розділення уявлень про імуногенні і антигенні властивості молекул, що проявляються в здатності зв'язування антитіл.

У таблиці 1 узагальнені дані про типи антигенів, їхнє походження та приклади.

Таблиця 1 – Класи антигенів та їхнє походження

Клас	Походження	Приклади	
		Приклади типів	Приклади специфічності
Природні	Рослини, бактерії, тварини	Корпускулярні (частки)	Клітини крові, бактерії, віруси
		Розчинні	Токсини, токсоди*, білки, вуглеводи, глікопротеїни, ліпопротеїди
Природні модифіковані	Хімічно модифіковані природні	Білки, що пов'язані з йодом, кон'югати білок-гаптен	
Синтетичні	Молекули, що синтезовані за допомогою хімії	Поліпептиди, поліамінокислоти, мультіланцюгові сополімери	
*токсоїд – токсин, у якого в результаті обробки втрачені токсичні властивості, але збережена імуногенність			

Екзогенні антигени, які можуть викликати захворювання в організмі господаря, називаються патогени. Патогени - вірусні, бактеріальні та паразитарні антигени. Автоантигени – антигени власних тканин господаря, індують імунну відповідь і викликають розвиток автоімунних

захворювань. Антигени-алергени (наприклад, пилок), антигени, що викликають стан гіперреактивності в імунній відповіді, алергійні реакції.

Толерогени – антигени, що викликають стан толерантності, а не імунної відповіді. Прикладом природних толерогенів є антигени власних тканин господаря. Екзогенні антигени можуть бути толерогенами, якщо вони вводяться в організм реципієнта на ранній стадії його розвитку, тобто до на стадії неповного формування його імунної системи.

### **Антигени. Властивості антигенів як індукторів імунної відповіді. Валентність антигенів**

*Чужерідність та досить складна структура.* Структури на антигені, які розпізнаються імунокомпетентними клітинами й антитілами, називають антигенні детермінанти.. Структури антигенних детермінант, комплементарні паратопам антитіл називають епітопи..

Антигени, здатні індукувати імунну відповідь, характеризують

- 1) жорсткість структури,
- 2) досить висока м.м.,
- 3) здатність до процесингу в клітинах, що презентують антиген (АПК),
- 4) досить тривалий час персистування – час взаємодії з різними АПК,
- 5) специфічність – вона визначається структурою антигенних детермінант; у білків це 3 - 4 амінокислотних залишки, у вуглеводів – 5 - 6 залишків цукрів. Найбільшу значимість мають амінокислотні залишки N – і C – кінців та циклічних амінокислот.

*Детермінанти, епітопи, валентність антигенів.* Певні ділянки тривимірної структури імуногенів і антигенів називають детермінанти. Ці ділянки здатні взаємодіяти як зі специфічними рецепторами лімфоцитів, індукуючи тим самим імунну відповідь, так і з антигензв'язуючими центрами специфічних антитіл (епітопи). Складні антигени мають безліч антигенних детермінант. Одна антигенна детермінанта може бути утворена залишками 4-6 амінокислот або цукрів. Детермінанти надзвичайно різноманітні за формою та розподілу зарядів, що визначає різноманітність реакцій гуморальної імунної відповіді, її поліклональність. Уважають, що одна детермінанта доводиться на м.м. білка 5000 дальтон.

Кількість антигенних детермінант (епітопів, сайтів) визначає валентність антигенів. Антигени можуть бути одновалентні (одно сайтові), двовалентні (двох сайтові), полівалентні.

При імунізації тварин полівалентними антигенами одержують спектр антиген специфічних поліклональних антитіл.

Однакові по амінокислотному складу й послідовності амінокислот, антигенні детермінанти можуть бути різноманітні за формою, розподілу заряду. Саме тому вони розпізнаються й зв'язуються різними В – лімфоцитами й визначають поліклональну імунну відповідь.

Гаптен – сполука, яка не володіє властивостями імуногену, але придбає їх при зв'язуванні з білками – носіями. Гаптени – одно сайтові.

Антиген – структура, що розпізнається імунною системою, як що антиген ініціює імунну відповідь його звать імуноген, а як що антиген блокує імунну відповідь – це толероген.

**Антитіла. Природа та структура молекули антитіла** Антитіла належать до типу білкових молекул, які називають імуноглобуліни (Ig). В організмі людини це гетерогенна популяція, що складається з 5 класів або ізотипів. Кожен клас імуноглобуліну в цілому характеризується різними функціями, а також різними періодами напіврозпаду. Імуноглобуліни можуть бути знайдені в рідких секретах, або пов'язаними з поверхнею клітини, таких як В лімфоцити.

Основна структурна одиниця молекул антитіл – 4 мономерні ланцюга. До складу цих чотирьох ланцюгів входять два ідентичних важких (H) ланцюгів і два ідентичних легких (L) ланцюгів.

Кожний ланцюг містить N-кінець і C-кінець. N-кінці L-і H-ланцюгів є частиною варіабельного або «V» регіону, C-кінці - константного або «C» регіону. Таким чином, як в легких так і в тяжких ланцюгах є варіабельні і константні регіони, які позначаються як  $V_L$  і  $C_L$ ,  $V_H$  і  $C_H$  відповідно. У легких ланцюгах два регіонів (доменів): варіабельний і константний.  $C_H$  регіон ділиться на три області (домени), які позначаються  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  і  $C_{H3}$ . Частина молекули антитіла, яка пов'язує антиген, розташована у варіабельних регіонах легких та важких ланцюгів. Між  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  розташована петля або шарнірна ділянка. Регіон петлі формується з двох важких ланцюгів. Шарнірна ділянка забезпечує гнучку структуру антитіл. Під дією папаїну молекула імуноглобулінів на рівні шарнірної ділянки розщеплюється на два фрагменти – фрагмент, що зв'язує антиген  $F(ab)_2$  та Fc-фрагмент.

Послідовність амінокислот у константних регіонах антитіл генетично детермінована й завжди постійна для даної тварини або людини, вона визначає видову специфічність антитіл. Розрізняють 5 константних структур важких ланцюгів антитіл, назва яких визначила назву класу імуноглобулінів:  $\mu$  – IgM,  $\gamma$  – IgG,  $\alpha$  – IgA,  $\epsilon$  – IgE,  $\delta$  – IgD. Варіанти в структурі відповідних важких ланцюгів визначають підкласи імуноглобулінів. Їх 4 в IgG (IgG1, Ig2, Ig3, Ig4) і 2 в IgA (IgA1, IgA2) [ ].

Константна ділянка антитіл, називана Fc-фрагментом, відіграє важливу роль у виконанні ефекторних функцій імуноглобулінів: зв'язування з комплементарними до Fc-фрагмента рецепторами мембран нейтрофілів і моноцитів, В – лімфоцитів, рецепторами на плаценті, що забезпечує проходження материнських імуноглобулінів до плода, тобто Fc-фрагмент забезпечує взаємодію антитіл з іншими компонентами імунної системи.

Унікальною особливістю антитіл є їхня здатність вибірково, специфічно взаємодіяти з антигеном, що індукував їхній синтез. Здатністю до зв'язування з антигеном володіють тільки варіабельні домени молекули імуноглобуліну.

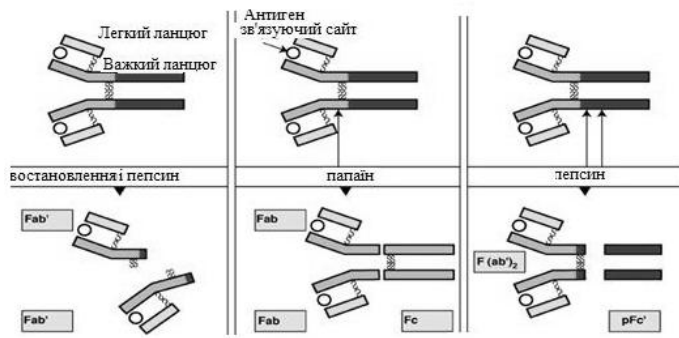


Рис – 1 – Загальна структура імуноглобулінів

Ці ділянки називають антигензв'язуючі сайти або Fab-фрагменти. Fab-фрагмент антитіла зв'язується з епітопом. При зв'язуванні антитіла з антигеном відбуваються значні конформаційні зміни всієї молекули імуноглобуліну, особливо в його константній ділянці – Fc-фрагменті (рис.1) [ ] Конформаційні зміни Fc-фрагменту є сигналом і необхідною умовою для приєднання до нього компонентів комплементу.

Специфічність антитіла до антигену є головним чинником, що забезпечує безпеку організму від дії комплементу на свої власні структури, а у випадку аутоімунних захворювань – це пусковий елемент руйнування власних тканин і клітин.

Таким чином, варіабельні домени антитіла антигенспецифічні і забезпечують розпізнавання та зв'язування антигену, що індукував їхній синтез, константні домени забезпечують зв'язок з гуморальними та клітинними ланками імунної системи. Сигналом для підключення цих ланок є зміна конформації Fc-фрагмента антитіла, що утворили комплекс з антигеном.

Що розпізнають антитіла? Структури на поверхні вірусів, бактерій, грибів та інше. Ці поверхні структури (епітопи) можуть бути: білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами, сахарами, деякими амінокислотами, фосфатними групами, метильними групами та їхніми комбінаціями. Антитіла – інструмент №1 в імунному аналізі!

### Валентність антитіла

Здатність антитіла зв'язувати кількість специфічних антигенних детермінант визначає валентність антитіла. Валентність антитіла визначається числом Fab фрагментів. IgG та IgE – 2 - х валентні; IgM - 10; IgA слизових – 4 - х валентні.



Рис. 2. – Валентність основних класів імуноглобулінів

**Афінність і авідність антитіл** Утворення імунного комплексу антиген-антитіло забезпечується просторовою компліментарністю антигенної детермінанти й антиген зв'язуючого центра антитіл (ключ-замок) та нековалентними взаємодіями між ними. Сила зв'язків антигенної детермінанти (епітопу) з антигензв'язуючим центром антитіл (паратопом) характеризує афінність антитіл. За високу афінність у разі антитіл вважають  $10^{12}/M$ , низькою –  $10^5/M$ . Загальну силу (енергію) нековалентних зв'язків між антигензв'язуючими сайтами антитіл і антигенними детермінантами антигену називають авідність. Термін афінність відноситься до зв'язування антитіла з моновалентним гаптенем або з однією антигенної детермінантою. У більшості випадків, однак, ми маємо справу із взаємодією з антигеном антисироватки, тобто сироватки імунізованої тварини або людини. У цьому випадку антисироватки взаємодіють з полівалентним антигеном. Для опису такого зв'язування використовують термін "авідність".

Оскільки гетерогенна популяція антитіл має різну афінність по відношенню до певної антигенної детермінанти, то результуюча константа асоціації представляє собою усереднене значення. У зв'язку з цим неможливо оцінити Афінність сироватки, що володіє поліспецифічністю, тобто специфічною по відношенню до безлічі детермінант одного антигену. Такі сироватки порівнюють оду з одною по їх сумарним характеристикам зв'язування з антигеном – за загальною силою реакції в обраній тест-системі, що позначається як авідність. Авідність – строго функціональний термін, який описує поведінку антитіл (сироватки) у конкретної реакції.

Авідність визначається багатьма факторами, зокрема, гетерогенністю антитіл в цієї сироватці, спрямованих до певної антигенної детермінанти, а також гетерогенністю самих детермінант. Необхідно враховувати і таку обставину. Полівалентність більшості антигенів призводить до своєрідного ефекту, що "підсилює": величезне зростання константи рівноваги, що виникає через те, що складові афінності не складаються, а перемножуються, і забезпечує цей підсилюючий ефект. Саме авідність характеризує імунну відповідь *in vivo* і служить мірою функціональної афінності антисироватки до природного полівалентного антигену. Висока авідність має перевагу перед низькою для здійснення багатьох реакцій. Математично ця величина характеризується як константа асоціації ( $K_a$ ), що розраховується в стані рівноваги між концентрацією імунного комплексу й концентрацією антитіла й антигену.

Приклад: IgM, як правило, має більш низьку Афінність, чим IgG, але IgM високоавідний пентамер, 10-валентний, тому він більш ефективно зв'язує антиген.

### **Специфічність антитіл**

Специфічність антитіл – це показник того, наскільки вибірково вони взаємодіють з молекулами антигенів певного типу. Специфічність поліклональних антитіл визначається сукупністю специфічних взаємодій з

численними антигенними детермінантами, які можуть бути або не бути унікальними, тобто притаманними тільки молекулам певної речовини. Кожна молекула антитіла специфічна до тієї антигенної детермінанти, з якою вона зв'язується, це уявлення про специфічність в найбільш вузькому сенсі. Специфічність антитіл до антигену визначається тим, що його детермінанти відбирали відповідні В лімфоцити з комплементарними антигензв'язуючими центрами на мембранних імуноглобулінах (рис.3)

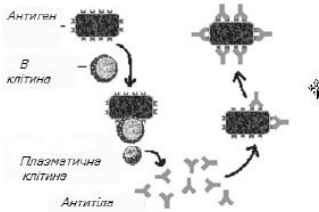


Рис.3 – Антиген визначає В клітинну імунну відповідь

На відміну від цього специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей антитіл, які вона містить. Антисироватки зв'язується з одним певним антигеном тільки в тому випадку, якщо сукупність специфічностей антигензв'язуючих центрів антитіл у сироватці спрямована на детермінанти тільки цього антигену. Однак, як правило, деякі детермінанти є спільними для декількох антигенів (одні й ті ж білки близьких видів тварин). У цьому випадку деякі з антитіл, що утворюються у відповідь на стимуляцію даними антигеном, можуть зв'язуватися і з іншими антигенами. Такі антитіла називають перехресно-реагуючими, а сироватку, що містить їх, неспецифічною, перехресно-реагуючою. Специфічність такої сироватки можна підвищити шляхом очищення на сорбенті. Процес очищення називають виснаженням сироватки. В процесі очищення перехресно-реагуючі антитіла відділяють шляхом контакту з антигенами, які містять антигенні детермінанти спільні з індукують антигеном і знаходяться на імуносорбенті (нерозчинна форма антигенів на сорбенті).

### **Одержання антитіл. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючі антитіла**

Антитіла одержують шляхом імунізації тварин, з наступним відділенням сироватки крові й називають антисироватками. Специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей утворюючих її антитіл і здатністю до зв'язування з антигеном. Тому їх називають поліклональними.

Можливі наступні варіанти зв'язування антитіл сироватки з антигеном. Всі антигензв'язуючі центри антитіл взаємодіють тільки з одним антигеном, його детермінантами. Такі сироватки називають моноспецифічні.

При імунізації тварин навіть добре очищеним антигеном отримують поліспецифічні, перехресно-реагуючі сироватки.

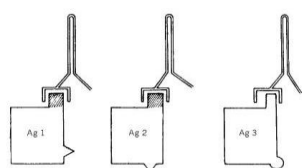


Рис. 4. – Перехресні реакції антитіл

Поняття перехресної реакції може бути застосовано й до антигену. Перехресно-реагуючий антиген – той антиген, котрий зв'язується з антитілами, утворення



яких було індуковано іншим антигеном, що володіють із цим антиген загальними антигенними детермінантами.

### Властивості поліклональних антисироваток

Поліклональна антисироватка – це сироватка імунізованої тварини – кролика, кози, барана й т.д.



Рис. 5. – Антигенні детермінанти та поліклональна сироватка.

Відповідно до рис. 5 поліклональна сироватка походить від численних клонів антитіла-продукуючих клітин і може мати кілька різної специфічності двовалентних антитіл (анти-A1, анти-A2, анти-A3, анти-A4, анти-B1 анти-D3), що здатні реагувати з кожною детермінантою (A, B, C, D) на одному рідному антигені (Ag), що зображений в центрі. Детермінанти A, B, C розташовані на поверхні полівалентного глобулярного нативного білка. Внутрішня детермінанта D може бути похована у середині ядра нативного білка, і антитіла реагують з цією латентною детермінантою тільки тоді, коли антиген знаходиться в денатурованому стану. Кожна тварина, яка імунізована антигеном, може виробляти антитіла до деяких або всіх з цих визначальних детермінант.

Поліклональна сироватка тому, що антиген, яким імунізували тварину, був полідетермінантним (A, B, C, D, рис.5). Вона містить антитіла неоднакової специфічності стосовно його детермінантів (епітопів). Основна перевага цих сироваток – здатність до утворення великих нерозчинних імунних комплексів з антигеном, преципітаті, аглютинації клітин, у мембранах яких є антиген. Такі реакції зручно спостерігати й нефелометризувати. Основні обмеження у використанні поліклональних антисироваток: гетерогенність по специфічності навіть при взаємодії з антигеном невеликої м.м.; не стандартність, яка обумовлена необхідністю імунізації декількох тварин і в різний термін. В утворенні таких антисироваток брали участь численні клітинні клони, тому поліспецифічні сироватки різні по класу, підкласу й афінності.

З поліспецифічних сироваток можна приготувати:

- поліспецифічні до безлічі окремих антигенів;
- олігоспецифічні – специфічні до невеликого числа окремих антигенів;
- моноспецифічні – специфічні до одного єдиного антигену.

В останньому випадку вони теж поліспецифічні – специфічні до різних антигенних детермінантів одного антигену.

Крім того, у ході гуморальної імунної відповіді на індивідуальну антигенну детермінанту антитіла продукуються численними клітинними клонами; тому за той самий епітоп можуть конкурувати антитіла з різною афінністю.

Практичне значення подібної гетерогенності однієї сироватки або різних сироваток полягає в тому, що кожна сироватка унікальна по складу антитіл,

оптимальним умовам зв'язування з антигеном, поведженню в імунологічних реакціях.

Ця обставина ставить за обов'язок щораз приймати рішення відносно придатності наявної сироватки для конкретного імунологічного тесту.