

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ БІОЛОГІЇ, ГЕОГРАФІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ
КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ЛЮДИНИ ТА ІМУНОЛОГІЇ

Бесчасний С.П., Гасюк О.М., Шкуропат А.В.

ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ В БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНІ

Навчальний посібник

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти

спеціальності Е1 «Біологія та біохімія»

Івано-Франківськ, 2025

УДК: 57.083.3

Рекомендовано

вченою радою Херсонського державного університету

(протокол від 24.11.2025 № 3)

Укладачі: С.П. Бесчасний – к. б.н., доцент кафедри біології людини та імунології ХДУ
О.М. Гасюк – к. б.н., доцент, завідувачка кафедри біології людини та імунології ХДУ
А.В. Шкурпат – к. б.н., доцент кафедри біології людини та імунології ХДУ

Рецензенти:

М.М. Байляк – д.б.н, професор, завідувачка кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника .

Г.В. Коробейников – д.б.н, професор кафедри біомеханіки Національного університету фізичного виховання і спорту України.

О.В. Корольова – к.б.н., доцент, завідувачка кафедри медичної біології та фізики, мікробіології, гістології, фізіології та патофізіології Чорноморського національного університету імені Петра Могили.

В.Л. Соколенко – к. б.н., доцент кафедри клітинної біології та методики викладання біологічних дисциплін Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького.

Посібник «Імунологічні методи дослідження в біології та медицині» є виданням, що систематизує сучасні знання про структуру, функції та взаємодію основних компонентів імунної системи. У виданні розглянуто принципи роботи антитіл, антигенів, комплементу, а також класичні та сучасні імунологічні методи. Може бути корисним також фахівцям лабораторної діагностики та дослідникам у галузі біомедицини.

Рекомендовано здобувачам першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності Е1 «Біологія та біохімія»

ISBN 978-617-8670-27-6

УДК: 57.083.3

© Бесчасний С.П., Гасюк О.М, Шкурпат А.В. 2025

Зміст

Вступ.....	5
Компоненти імунних реакцій. Антитіла.....	6
Структура IgG-антитіл.....	10
Отримання антитіл.....	11
Кон'югати.....	17
Антигени.....	20
Бактерійні антигени.....	25
Антигени вірусів.....	27
Головний комплекс гістосумісності	29
Антигени системи АВ0 груп крові.....	32
Антигени системи Резус (Rh).....	34
Антигенні діагностикуми.....	35
Система комплементу.....	38
Роль білків системи комплементу	40
Методи імуно-хімічного аналізу. Реакції преципітації.....	46
Реакція кільцепреципітації.....	48
Реакція преципітації в гелі.....	49
Реакція Оухтерлоні.....	51
Реакція флокуляції.....	53
Реакції аглютинації.....	54
Латекс-аглютинація.....	64
Реакція коаглютинації.....	65
Пряма реакція Кумбса.....	67
Імуноелектрофорез.....	69
Ракетний імуноелектрофорез.....	74
Електросинерез.....	76
Перехресний (двовірний) імуноелектрофорез.....	78
Реакції нейтралізації.....	80
Серодіагностика вірусних захворювань.....	81
Ідентифікація токсинів.....	82

Реакції зв'язування комплементу.....	84
Реакція радіального гемолізу.....	90
Реакція імунного прилипання.....	91
Реакції з використанням міток.....	93
Радіоімунний аналіз.....	93
Імунорадіометричний аналіз.....	97
Флуоресцентний імунний аналіз.....	98
Поляризаційний флуоресцентний імуноаналіз.....	101
Імуноферментний аналіз.....	104
Вестерн-блот.....	106
Імуно-хроматографічний аналіз.....	114
Імуносенсиори.....	117
Імуногістохімічні дослідження.....	122
Імунофлуоресценція.....	124
Література.....	127

ВСТУП

Використання імунологічних методів у біології та медицині дозволяє досліджувати різноманітні біологічні процеси та встановлювати точний діагноз. Імунологічні дослідження стали важливою складовою сучасної біомедицини, особливо в умовах зростання інфекційної, онкологічної та аутоімунної патології. Володіння такими методами є необхідною складовою професійної підготовки майбутніх біологів, медиків, фармацевтів, а також фахівців із лабораторної діагностики.

Даний посібник розкриває основні закономірності функціонування імунної системи, природу антигенів та антитіл. Також у ньому висвітлено принципи та практичні аспекти найпоширеніших імунологічних методів, що застосовуються у біологічній, медичній і ветеринарній практиці.

Особливу увагу приділено методам аглютинації, преципітації, імуноферментного аналізу та імунофлуоресценції, а також характеристиці моноклональних антитіл, діагностичних сироваток і кон'югатів, особливостям їх отримання та застосування.

Посібник призначений для здобувачів спеціальності Е1 «Біологія та біохімія», які вивчають імунологію, мікробіологію та лабораторну діагностику біологічних систем.

КОМПОНЕНТИ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ

АНТИТІЛА

Імуноглобуліни (антитіла) — це білки, які відіграють ключову роль у захисті організму від інфекцій. У 1890 році Еміль фон Берінг і Шібасабуро Кітасато виявили, що сироватка крові тварин, які отримали імунітет до правця або дифтерії, може нейтралізувати токсини цих збудників. Це відкриття стало основою ідеї про те, що кров містить речовини, здатні боротися з патогенами. На початку 20 століття було встановлено, що антитіла являють собою білкові молекули. У 1930-х роках Арне Тіселіус і Елвін Кабат, використовуючи метод електрофоретичного розділення, довели, що антитіла належать до γ -глобулінової фракції сироватки. Ці білки отримали назву імуноглобуліни. У 1950-х роках важливий внесок у розуміння структури антитіл зробили Джеральд Едельман і Родні Портер. Використовуючи хімічні методи, вони встановили, що імуноглобуліни складаються з чотирьох поліпептидних ланцюгів — двох легких і двох важких, які утворюють Y-подібну структуру. За це відкриття в 1972 році їм було присуджено Нобелівську премію з хімії.

Антитіла, або імуноглобуліни, — це білки, які синтезуються В-лімфоцитами у відповідь на надходження до організму сторонніх речовин — антигенів. Антигеном може бути будь-яка структура, що має ознаки «чужорідності»: бактерії, віруси, гриби, паразити, токсини, білки,

полісахариди, клітини інших організмів або навіть змінені власні клітини (наприклад, пухлинні).

Контакт антигену з імунною системою є пусковим сигналом для утворення специфічної імунної відповіді. В першу чергу антиген розпізнається спеціалізованими клітинами — антигенпрезентувальними (макрофагами й дендритними клітинами). Вони поглинають антиген, розщеплюють його на фрагменти й презентують їх на своїй поверхні у комплексі з білками головного комплексу гістосумісності (МНС).

Далі ці фрагменти розпізнаються Т-хелперами ($CD4^+$ Т-лімфоцитами), які активують В-лімфоцити за допомогою цитокінів. Отримавши такий стимул, В-клітини починають проліферувати й диференціюватися у плазматичні клітини — основні продуценти антитіл.

Таким чином, стимулом для утворення антитіл є поява в організмі антигену, який розпізнається імунною системою як чужорідний. Цей процес відбувається лише за умови участі допоміжних клітин та сигнальних молекул — в кооперації клітин імунної системи.

Надзвичайна різноманітність антитіл, які може синтезувати організм, є однією з найбільш вражаючих властивостей імунної системи. Кожне антитіло здатне специфічно розпізнавати лише один або кілька близьких епітопів — ділянок антигену, з якими воно взаємодіє.

Ця унікальність зумовлена особливим генетичним механізмом формування варіабельних ділянок антитіл. Генетичні послідовності, що кодують важкі (H) і легкі (L) ланцюги імуноглобулінів, не є цілісними. Вони складаються з окремих частин ДНК — V (*variable*), D (*diversity*) і J (*joining*). На стадії дозрівання В-лімфоцитів ці сегменти випадково комбінуються

(процес V(D)J-рекомбінації), утворюючи нові унікальні гени, що кодують варіабельні ділянки антитіл.

Додаткову різноманітність створює процес соматичної гіпермутації, який відбувається вже після активації В-клітин антигеном. У цих клітинах відбуваються точкові мутації у варіабельних ділянках генів, що може підвищити або, навпаки, знизити афінність антитіла до антигену. Клітини, які продукують антитіла з найвищою спорідненістю до антигену, виживають і проліферують.

Таким чином, унікальність антитіл забезпечується поєднанням трьох механізмів: рекомбінацією генетичних сегментів (V(D)J-рекомбінація); соматичною гіпермутацією; селекцією В-клітин у лімфоїдних органах.

Антитіла, що циркулюють у крові та тканинних рідинах, належать до різних класів — IgG, IgM, IgA, IgE та IgD, які відрізняються структурою важких ланцюгів, локалізацією та функціями.

IgG — найпоширеніший клас антитіл у плазмі (понад 70 %). Це мономер, що проходить крізь судини і плаценту, забезпечує тривалий імунітет.

IgM — перший клас антитіл, який синтезується у відповідь на проникнення антигену. Має пентамерну структуру, активує комплемент.

IgA — головний захисний фактор слизових оболонок дихальної, травної та сечостатевої систем.

IgE — медіатор алергічних реакцій негайного типу, бере участь у протипаразитарному імунітеті.

IgD — функція цього класу менш вивчена, але він присутній на поверхні В-лімфоцитів, які ще не контактували з антигенами, і відіграє роль у їх активації.

Антитіла забезпечують специфічний захист організму від інфекційних агентів і токсичних речовин. До основних механізмів їх дії можна віднести наступне:

1. Нейтралізація антигенів (зв'язування токсинів або вірусів, блокування їх взаємодії з клітинними рецепторами).
2. Аглютинація та преципітація (утворення агрегатів, що полегшують фагоцитоз).
3. Опсонізація (покриття мікробів антитілами для кращого поглинання макрофагами).
4. Активація комплементу (запуск каскаду реакцій, що призводить до лізису клітин).
5. Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (руйнування клітин, покритих антитілами).
6. Пасивний імунітет (передача антитіл матері плоду або новонародженому).

IgG є найпоширенішим типом антитіл, який використовується для проведення імуноаналізу.

Антитіла є ключовими ефektorними молекулами імунної системи. Їх продукція — результат взаємодії клітинних і гуморальних компонентів імунітету. Завдяки рекомбінації та селекції імунна система здатна створювати мільйони унікальних антитіл, кожне з яких розпізнає свій антиген із надзвичайною точністю.

Структура IgG-антитіл

Цей тип антитіл являє собою білки Y-подібної форми (рис. 1), що складаються з чотирьох пептидних ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками. Основні структурні фрагменти IgG мають назву Fc і Fab. Антигензв'язуючі сайти (Fabs) IgG є двома ідентичними областями у верхній частині молекули, які є місцями взаємодії антитіла з антигеном.

Ділянка Fc є хвостом антитіла та є тією частиною, яка розпізнається організмом як «власна», є видоспецифічною. Оскільки антитіла є відносно

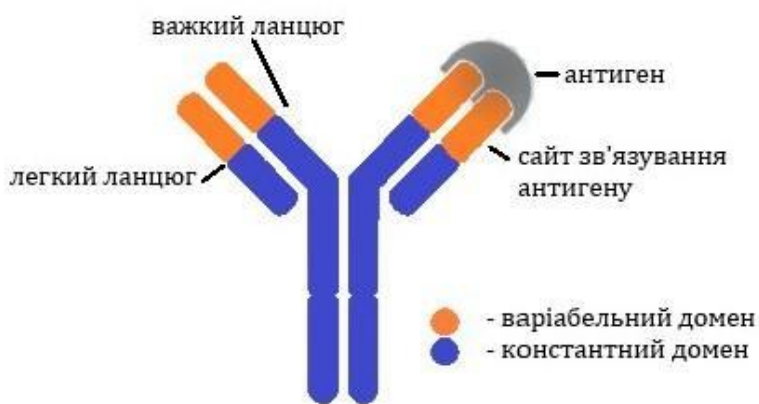


Рис. 1. Схематичне зображення імуноглобуліну IgG з антигеном

великими за розмірами білками, вони також можуть виступати у ролі антигенів. Через це здатність до розпізнавання власних антитіл запобігає імунним реакціям проти власних антитіл. Якщо кролю увести імуноглобуліни людини, тоді у

нього почнуть вироблятися антитіла проти цих введених антитіл. Такі антитіла отримали назву «антиімуноглобуліни». Цю властивість використовують в медицині. Для лікування ревматоїдного артрити вводять специфічні до рецепторів фактору некрозу пухлин- α імуноглобуліни.

Через деякий час вони стають неефективними і доводиться збільшувати дозу. Використання мишачих моноклональних антитіл призводить до того, що в організмі людини починають утворюватися антитіла проти цих антитіл, що і спричиняє зниження ефективності препаратів на основі моноклональних антитіл. Для подолання цього явища

була розроблена технологія гуманізованих антитіл, за якої у мишачому моноклональному антитілі «замінюється» Fc-фрагмент на людський. Завдяки цьому використання препарату на основі гуманізованих антитіл може бути довготривалим та без будь-яких побічних ефектів.

Отримання антитіл

У лабораторній діагностиці використовують декілька типів антитіл за походженням: поліклональні та моноклональні. Поліклональні антитіла виявляють значну кількість антигенів. Через те, що антитіла цього типу утворюють різні клони В-лімфоцитів, можливі хибно-позитивні результати дослідження.

Поліклональні антитіла є сумішшю антитіл, які продукуються різними клонами лімфоцитів у відповідь на введення антигену. Вони розпізнають і зв'язуються з різними епітопами одного антигену. Отримання поліклональних антитіл — це багатоступеневий процес, який передбачає імунізацію тварин, збір крові, очищення антитіл і контроль їхньої якості.

Перший етап полягає у відборі антигену, проти якого планують отримати антитіла. Для підвищення імуногенності антиген зазвичай зв'язують із ад'ювантами, такими як ад'ювант Фрейнда. Це допомагає посилити імунну відповідь у тварини.

Для отримання поліклональних антитіл найчастіше імунізують кролів, мишей, щурів, овець або кіз. Вибір залежить від необхідного об'єму антитіл та специфічності імунної відповіді. Наприклад, організм великих тварин (вівці або кози) здатен забезпечити більшу кількість антитіл.

Антиген обов'язково вводять разом із ад'ювантом. Ін'єкції можуть здійснюватися підшкірно, внутрішньом'язово або внутрішньовенно. Процедура повторюється кілька разів з певними інтервалами (підтримуюча імунізація) для стимуляції більш потужної і тривалої імунної відповіді. Зазвичай весь цикл імунізації триває 4–8 тижнів.

Після достатнього рівня імунізації проводять забір крові з вени. Збирання порції крові виконують обережно, забезпечуючи комфорт тварини та збереження її здоров'я. Сироватка, отримана з крові, містить поліклональні антитіла.

Кров, отримана після забору, повинна бути відцентрифугована для відділення сироватки. Після очищення поліклональні антитіла тестують для перевірки їхньої специфічності, активності та чистоти. Для цього використовують методи ELISA, Вестерн-блот або імунофлуоресценції. Готові антитіла зберігають у буферному розчині за низької температури (зазвичай -20°C або нижче) для збереження їхньої активності. За необхідності додають консерванти для запобігання бактеріального росту.

Моноклональні антитіла (МКА) — це антитіла, які виробляються з єдиного типу імунних клітин (клону) та є специфічними до одного антигену. Їх відкриття стало революційним у діагностиці та лікуванні багатьох захворювань, зокрема раку, аутоімунних захворювань та інфекційних патологій.

Жорж Келер і Сезар Мілштейн зробили прорив, розробивши метод отримання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології. Вони поєднали В-лімфоцити миші (які продукують антитіла) з клітинами мієломи (раковими клітинами), що дозволило створити «гібридоми». Гібридоми здатні безперервно продукувати специфічні антитіла в культурі

клітин. На початку 1980-х років моноклональні антитіла почали вперше застосовувати у діагностиці, зокрема для визначення груп крові.

З метою отримання певної гібридоми на початку відбирають та готують відповідний антиген. Часто антиген зв'язують із носієм та проводять імунізацію лабораторної миші (рис. 2). Ін'єкції антигену проводять кілька разів із певними інтервалами, щоб досягти максимальної імунної відповіді. Після цього перевіряють рівень специфічних антитіл у сироватці крові тварини (наприклад, методом ІФА).

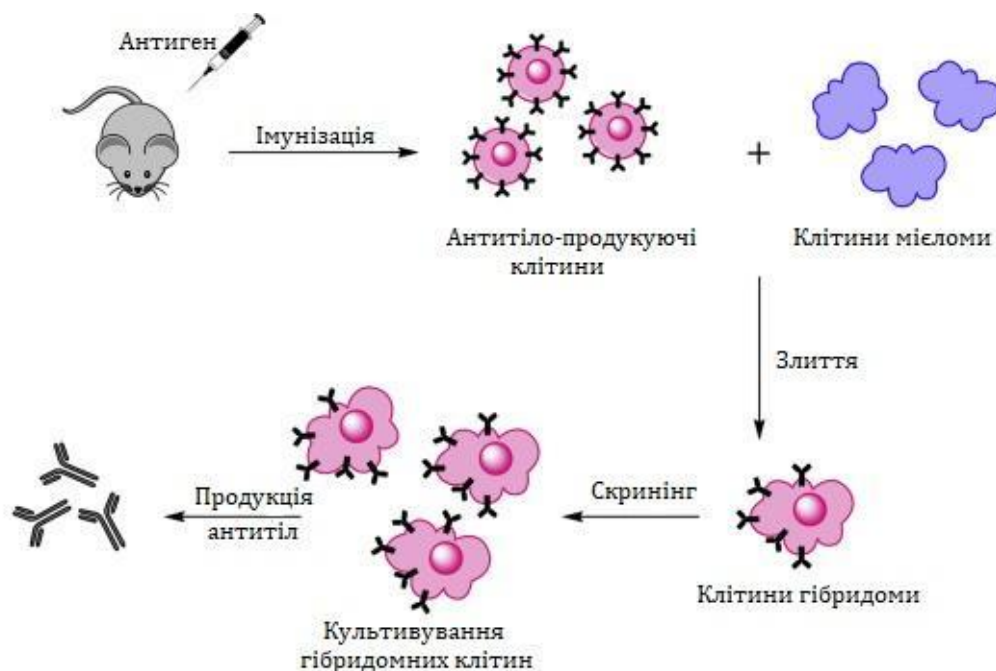


Рис. 2. Узагальнена схема отримання моноклональних антитіл

По завершенню імунізації у миші забирають селезінку для подальшої ізоляції В-лімфоцитів. В-лімфоцити селезінки культивують спільно із клітинами мієломи (ракові клітини, здатні до необмеженого поділу). Злиття клітин здійснюється після додавання спеціальних сполук, які частково розчиняють клітинні стінки (найчастіше це поліетиленгліколь). Як результат злиття отримуються гібридоми, які поєднують здатність до

вироблення антитіл (від В-лімфоцитів) та необмеженого поділу (від мієломних клітин). Отримані клітини вирощують у селективному середовищі (наприклад, ГАТ-середовище, у якому негібридні клітини гинуть), яке дозволяє виживати лише гібриdomам. Гібриdomи тестують на здатність продукувати антитіла до відповідного антигену із використанням методів ІФА, імунофлуоресценції або імуноблотингу.

Гібриdomи, які продукують необхідні антитіла, піддаються клонуванню для отримання однорідної популяції клітин. Відібрані клоновані гібриdomи вирощують у великих масштабах.

Отримані гібриdomи можна безперервно культивувати й отримувати велику кількість моноклональних антитіл та зберігати за низької температури тривалий час.

Технологія отримання гібриdom має величезне значення для імунології, молекулярної біології та медицини. Завдяки цій технології з'явилися нові методи діагностики та лікування багатьох захворювань. Моноклональні антитіла мають велику специфічність, стандартність й використовуються для виявлення різноманітних антигенів, онкомаркерів, гормонів, білків.

Діагностичні сироватки класифікують залежно від вмісту активних компонентів, що визначає їх специфічні властивості та застосування. Виокремлюють три групи сироваток.

Моновалентні — ці сироватки містять антитіла, спрямовані лише проти одного конкретного антигену. Їх використовують для точного визначення конкретного збудника або антигену й отримують шляхом імунізації тварин одним антигеном. Найчастіше їх застосовують для

визначення груп крові (AB0-система, Rh-фактор), ідентифікації певного виду бактерій або вірусів.

Полівалентні (або поліспецифічні) сироватки містять суміш антитіл, спрямованих проти кількох різних антигенів або збудників. Вони забезпечують ширше охоплення антигенів, часто використовуються для скринінгових досліджень (діагностики змішаних інфекцій, попередньої ідентифікації родів або груп збудників).

Монорецепторні діагностичні сироватки містять антитіла, спрямовані проти одного конкретного антигену або рецептора. Вони є високоспецифічними і використовуються для точного визначення конкретного антигену, збудника або рецептора в діагностичних дослідженнях. Таким чином, антитіла в сироватці розпізнають лише один тип антигену або епітоп, забезпечують високу точність діагностики, оскільки реакція відбувається лише за наявності відповідного антигену.

В залежності від характеру імунологічних реакцій, які лежать в основі їх дії, діагностичні сироватки поділяються на кілька основних типів. Ця класифікація відображає специфічність їх використання в лабораторній діагностиці та імунологічних дослідженнях.

Аглютинуючі сироватки. Ці сироватки обумовлюють реакцію аглютинації (злипання клітин, бактерій або навантажених антигенами часток) за участі специфічних антитіл. Їх застосовують для виявлення бактеріальних антигенів, визначення груп крові (AB0, Rh), діагностики інфекційних захворювань.

Преципітуючі сироватки взаємодіють із розчинними антигенами, утворюючи нерозчинні преципітати у вигляді кілець або смуг преципітації

(використовуються для виявлення розчинних антигенів у біологічних рідинах).

Гемолітичні сироватки — це тип діагностичних сироваток, які містять антитіла, що викликають гемоліз (руйнування еритроцитів). Ці сироватки застосовуються для досліджень, пов'язаних з реакцією антитіла на еритроцити, а також для вивчення системи комплементу, оскільки гемоліз зазвичай відбувається саме за участі комплементу.

Люмінесцентні сироватки містять антитіла, зв'язані з люмінесцентними мітками, такими як флуоресцентні барвники або молекули. Ці мітки випромінюють світло під впливом ультрафіолетового або іншого виду світла. Їх використовують в методах люмінесцентної мікроскопії для виявлення антигенів або антитіл у біологічних зразках. Люмінесцентні сироватки працюють за принципом люмінесценції, коли антитіла, марковані флуоресцентними барвниками (таким як флуоресцеїн, родамін), зв'язуються з відповідними антигенами в зразку, а потім, під впливом ультрафіолету, випромінюють світло певного кольору. Це дозволяє візуалізувати або виявити місце зв'язування антитіл з антигенами.

Антитоксичні (нейтралізуючі) сироватки містять специфічні антитіла, здатні інактивувати токсини, що продукуються бактеріями або іншими патогенними мікроорганізмами. Їх дія спрямована на виявлення, зв'язування та нейтралізацію біологічно активних токсичних сполук, зокрема бактеріальних екзотоксинів і деяких інших шкідливих продуктів мікробного метаболізму.

Механізм дії антитоксичних сироваток полягає у високоспецифічному зв'язуванні антитіл з токсичними молекулами, що призводить до втрати ними біологічної активності. Утворення комплексу «антиген–антитіло» перешкоджає взаємодії токсинів із клітинами-мішенями організму, запобігаючи розвитку патологічних ефектів. Такі сироватки широко застосовують у клінічній практиці для специфічної терапії ботулізму, дифтерії та правця, зокрема у вигляді правцевої антитоксичної сироватки.

Кон'югати

Кон'югати — це хімічні сполуки, утворені шляхом ковалентного зв'язування двох або більше молекул з різними властивостями. В лабораторній діагностиці кон'югати відіграють ключову роль, особливо в імунологічних методах дослідження. Кон'югат складається з антитіла (IgG, IgM або їх Fab-фрагментів), яке відповідає за розпізнавання та зв'язування з цільовим антигеном й маркера або «мітки» (ферменту, флуорофору, радіоізотопу тощо), що дозволяє детектувати утворений комплекс.

Кон'югати широко використовують у лабораторній діагностиці як високоспецифічні реагенти для виявлення різноманітних біологічних молекул. В імуноферментному аналізі (ІФА) ферментні кон'югати антитіл взаємодіють зі специфічними антигенами, після чого додають субстрат, який під дією ферменту змінює колір, дозволяючи детектувати та кількісно визначати широкий спектр аналітів – від інфекційних агентів до гормонів.

У проточній цитометрії та імуофлуоресценції використовують флуоресцентні кон'югати, які після зв'язування з цільовими структурами випромінюють світло певної довжини хвилі, що дозволяє визначати клітинні маркери при імуофенотипуванні лейкозів або ідентифікувати

антигени в тканинах. В імуногістохімії ферментні кон'югати використовують для візуалізації антигенів у гістологічних препаратах, що особливо важливо при діагностиці онкологічних захворювань та визначенні прогностичних маркерів. У молекулярній біології біотинільовані кон'югати нуклеїнових кислот дозволяють виявляти специфічні послідовності ДНК або РНК при гібридизації *in situ*.

Ферментні кон'югати, які використовуються в ІФА, містять у своєму складі ферменти (пероксидазу хрону, лужну фосфатазу, β -галактозидазу). За цього методу детекція відбувається шляхом додавання субстрату, який змінює колір під дією ферменту. Флуоресцентні кон'югати містять флуорохроми (флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), родамін, Alexa Fluor, фікоеритрин). Цей тип кон'югатів застосовують в імунофлуоресцентному аналізі, проточній цитометрії. Вони випромінюють світло певної довжини хвилі при освітленні ультрафіолетовим спектром.

Радіоактивні кон'югати містять радіоізотопи ($I-125$, $H-3$, $C-14$). Використовуються в радіоімунному аналізі (RIA), при цьому детекція відбувається за допомогою сцинтиляційних лічильників.

Біотинові кон'югати містять біотин, який володіє високою афінністю до авідину/стрептавідину. З метою посилення сигналу цей тип кон'югатів використовується в комбінації з авідином, міченим ферментом або флуорохромом.

Приготування кон'югатів передбачає кілька послідовних етапів. Спочатку проводять очищення компонентів: антитіл (або інших лігандів) та міток (ферментів, флуорохромів тощо) для отримання високочистих реагентів. Далі здійснюють активацію функціональних груп на одному або обох компонентах за допомогою біфункціональних зшиваючих агентів

(кросс-лінкерів) — наприклад, глутаральдегіду чи періодату натрію, що створює реакційноздатні групи. Безпосередня кон'югація відбувається при змішуванні активованих компонентів у оптимальних умовах (рН, температура, іонна сила) з контролем стехіометрії для досягнення бажаного співвідношення мітка/ліганд. По завершенні реакції кон'югат очищають від незв'язаних компонентів методами гель-фільтрації, діалізу чи афінної хроматографії. Після цього проводять його стабілізацію додаванням білків-стабілізаторів (BSA, желатин) та консервантів (азид натрію, тимеросал) для забезпечення тривалого зберігання у замороженому або ліофілізованому стані.

Використання кон'югатів у лабораторній діагностиці має низку суттєвих переваг. Насамперед, вони забезпечують високу специфічність аналізу завдяки здатності антитіл чи інших лігандів розпізнавати конкретні молекулярні структури з надзвичайною точністю, мінімізуючи хибнопозитивні результати. Одночасно кон'югати демонструють виняткову чутливість, дозволяючи детектувати аналіти у надзвичайно низьких концентраціях (пікомолярних чи навіть фемтомолярних), що критично важливо для ранньої діагностики багатьох захворювань. Значною перевагою є можливість кількісного визначення цільових молекул. Це дозволяє оцінювати динаміку патологічних процесів та ефективність лікування. Кон'югати забезпечують швидке отримання результатів порівняно з традиційними методами культивування чи іншими технологіями, що важливо для термінової діагностики.

Використання кон'югатів дозволило автоматизувати значну частину діагностичних процедур, знижуючи вплив людського фактора та підвищуючи пропускну здатність лабораторій. Також важливим є

універсальність цього підходу, який дозволяє адаптувати однакові принципи для виявлення різноманітних біомолекул – від низькомолекулярних гормонів до комплексних білкових антигенів та нуклеїнових кислот.

Одночасно із перевагами є і недоліки: обмежена стабільність багатьох кон'югатів вимагає спеціальних умов зберігання (часто за низьких температур) та обмежує термін придатності, а деградація кон'югатів може призводити до хибних результатів. Технічні складнощі при виготовленні кон'югатів пов'язані із необхідністю контролювати стехіометрію, зберігати активність компонентів та досягати оптимального ступеня мічення. При надмірному міченні може відбуватися втрата специфічності антитіл через блокування активних сайтів зв'язування. Ризик перехресних реакцій з подібними епітопами в тому, що може давати хибнопозитивні результати, особливо при аналізі складних біологічних зразків. Деякі методи з використанням кон'югатів (особливо радіоімунний аналіз) пов'язані з потенційними небезпеками для персоналу та довкілля, що вимагає додаткових заходів безпеки. Варіативність між партіями кон'югатів може ускладнювати стандартизацію методів, а чутливість до умов реакції (рН, температура, іонна сила) може впливати на відтворюваність результатів.

АНТИГЕНИ

Антигеном називають будь-яку молекулу або структуру, яка викликає імунну відповідь в організмі. Зазвичай антигенами є чужорідні речовини,

що потрапляють в організм (бактерії, віруси, токсини або інші алергени). Імунна система розпізнає ці антигени як «ворожі» або «чужі» та виробляє антитіла, щоб нейтралізувати або знищити їх.

Антигенність речовин – це властивість, яка проявляється у здатності певної молекули або речовини викликати імунну відповідь. Ця властивість залежить від кількох факторів, таких як розмір, структура і склад молекули, а також способу її введення до організму.

Імунна система різних видів може по-різному реагувати на один і той самий антиген. Це пов'язано з відмінностями в генетичній структурі, наборі антигенів, що розпізнаються, та механізмах імунної відповіді. Тобто, антиген, який викликає потужну імунну відповідь у однієї тварини, може викликати слабку відповідь у іншій.

Антигени можуть бути великими та складними молекулами. Величезна кількість біологічно активних макромолекул, таких як білки та полісахариди, можуть виступати в ролі антигену. Ці макромолекули здатні викликати імунну відповідь через свою складну структуру і велику кількість потенційно різних епітопів (специфічних ділянок антигену, які розпізнаються антитілами).

Виокремлюють наступні аспекти макромолекулярної характеристики:

- 1. Розмір.** Макромолекули мають більший розмір порівняно з низькомолекулярними сполуками, що може посилити їхню здатність викликати імунну відповідь.
- 2. Структурна складність.** Завдяки складним тривимірним структурам, макромолекули мають численні епітопи, які можуть бути розпізнані імунною системою.

3. Специфічність. Специфічність антигену залежить від унікальності його епітопів, які взаємодіють з відповідними антитілами або Т-клітинами.

Антигени, в залежності *від походження*, також можна розділити наступним чином:

1. Екзогенні антигени. До них належать ті антигени, які потрапляють в організм із зовнішнього середовища. Вони можуть бути частинами бактерій, вірусів, грибів або паразитів, а також токсинами і алергенами. Імунна система розпізнає ці антигени як чужорідні і запускає імунну відповідь для їх нейтралізації або знищення.

2. Ендогенні антигени. Цей тип антигенів утворюються всередині клітин організму. Наприклад, це можуть бути білки, які продукуються інфікованими вірусом клітинами, або аномальні білки, що утворюються в результаті мутацій (як у випадку з раковими клітинами). Імунна система також здатна розпізнавати ендогенні антигени і реагувати на них.

У залежності від *видового походження* виокремлюють:

1. Аутоантигени. Це нормальні компоненти клітин організму, які в певних ситуаціях можуть бути помилково розпізнані імунною системою як чужорідні. Це спричиняє розвиток аутоімунних захворювань, за яких імунна система атакує власні тканини організму.

2. Ксеногенні антигени. Вони походять від організмів іншого виду. Наприклад, антигени, присутні у клітинах тварин, які використовуються для трансплантації або виробництва біологічних препаратів.

3. Алогенні антигени. Це антигени, які походять від іншої особи того ж виду. Вони викликають імунну відповідь, якщо потрапляють в організм реципієнта.

4. Ізоантигени. Це антигени, які спільні для частини, але не всіх особин одного виду. Залежно від генетичних відмінностей у межах популяції, вони можуть бути причиною імунної відповіді (наприклад, групи крові за системою АВО).

5. Гетероантигени. Антигени, які спільні для різних видів, але структурно схожі. Можуть викликати перехресний імунітет (тобто реакцію на подібні антигени в різних видах). Прикладом є антигени бактерій, що нагадують молекули організму-господаря.

За здатністю викликати імунну відповідь антигени поділяють на повноцінні (імуногени) та гаптени.

Повноцінні антигени самостійно викликають імунну відповідь (продукція антитіл, активація Т-лімфоцитів). До цієї групи належать великі молекули, зокрема вірусні білки або полісахариди.

Гаптени самостійно не здатні викликати імунну відповідь. Вони мають невелику молекулярну масу, тому їх розмір або структура не дозволяють активувати імунну систему. Вони набувають імуногенності після поєднання з високомолекулярним носієм (білком або полісахаридом). Гаптенами можуть виступати деякі антибіотики (пеніцилін), токсини або хімічні сполуки.

Молекули антигену складаються з двох основних функціональних компонентів: епітопу і носія. Кожен із них виконує важливу роль у процесі стимуляції імунної відповіді. *Enitop* — це невелика ділянка молекули антигену, яку розпізнають імунні рецептори, такі як антитіла або Т-

клітинні рецептори. Він є активною частиною антигену, яка безпосередньо взаємодіє з елементами імунної системи. Зазвичай епітоп складається з 5 – 15 амінокислот (для білкових антигенів) або 5 – 7 моносахаридів. За структурою виокремлюють *лінійні епітопи* (розпізнаються за послідовністю їх амінокислот) та *конфірмаційні епітопи* (формуються завдяки третинній структурі білка, залежать від просторової конфігурації молекули). Один антиген може мати кілька різних епітопів, які взаємодіють із різними антитілами чи рецепторами.

Антигени класифікують за механізмом їхньої взаємодії з клітинами імунної системи, зокрема за участю Т-лімфоцитів. Відповідно, розрізняють тимус-залежні (Т-залежні) та тимус-незалежні (Т-незалежні) антигени.

Т-залежні антигени — це молекули, здатні стимулювати В-лімфоцити лише за участі Т-хелперів (CD^{4+} Т-клітин). Ці антигени, як правило, мають білкову природу і є найбільш ефективними для формування повноцінної імунної відповіді. До Т-залежних антигенів належать вірусні капсидні білки, бактеріальні токсини (наприклад, дифтерійний токсин), білки вакцин.

Т-незалежні антигени — це молекули, які можуть стимулювати В-лімфоцити без участі Т-клітин. Вони, як правило, мають небілкову природу і є полісахаридами, ліпополісахаридами або іншими молекулами з повторюваною структурою. Імунна відповідь, спричинена Т-незалежними антигенами, має особливості. Вони полягають у тому, що відсутнє формування довготривалої імунної пам'яті, продукуються переважно IgM, швидкий, але менш специфічний характер імунної відповіді.

Бактерійні антигени

Антигени бактерійних клітин представляють собою складну систему молекулярних структур, які відіграють ключову роль у взаємодії патогенів з імунною системою організму-хазяїна. Різноманітність та специфічність бактерійних антигенів обумовлює їх важливе значення у патогенезі

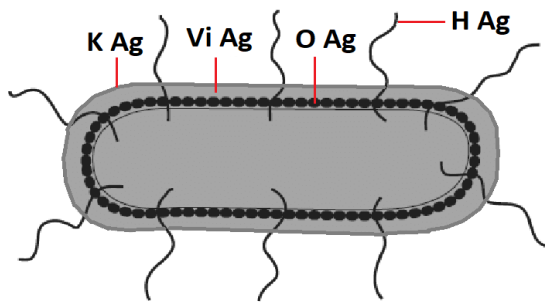


Рис. 3. Основні типи антигенів бактерій

інфекційних захворювань та у формуванні захисного імунітету (рис. 3).

O-антигени, також відомі як соматичні антигени, є невід'ємною частиною ліпополісахаридного комплексу клітинної стінки

грамнегативних бактерій. Їх структура представлена специфічними повторюваними олігосахаридними одиницями, які формують зовнішню частину ЛПС. Важливість O-антигенів полягає в їх здатності викликати потужну імунну відповідь та формувати серологічну специфічність бактерій. Термостабільність O-антигенів (вони зберігають свої властивості при нагріванні до 100°C) робить їх надійними маркерами для серологічної діагностики. У структурі O-антигену виділяють кор-олігосахарид та O-специфічний полісахарид, які разом з ліпідом А формують повноцінну молекулу ліпополісахариду.

K-антигени (капсульні антигени) формують зовнішній захисний шар багатьох патогенних бактерій. Вони представлені переважно високомолекулярними полісахаридами, хоча у деяких видів бактерій можуть бути й білкової природи. K-антигени виконують множинні функції: захищають бактерію від фагоцитозу, маскують інші поверхневі антигени

від розпізнавання імунною системою, беруть участь у адгезії до клітин хазяїна. Особливістю К-антигенів є їх відносно низька імуногенність, що частково пояснює здатність капсульних бактерій уникати імунного нагляду. Структурне різноманіття К-антигенів використовується для класифікації бактерій та епідеміологічного типування.

Н-антигени (джгутикові) – це складні білкові структури, основним компонентом яких є флагелін. На відміну від О-антигенів, вони термолабільні та легко руйнуються при нагріванні. Структурна організація Н-антигенів забезпечує не лише рухливість бактерій, але й відіграє важливу роль у процесах колонізації та інвазії. Антигенна специфічність Н-антигенів настільки висока, що дозволяє проводити детальне серологічне типування бактерій. Молекулярна структура флагеліну містить консервативні домени, необхідні для збірки джгутика, та варіабельні домени, які визначають серологічну специфічність.

М-протеїн, який властивий передусім для стрептококів, є одним з найбільш важливих факторів вірулентності. Він представлений фібрилярним білком, який формує специфічні поверхневі структури клітинної стінки. М-протеїн має виражені антифагоцитарні властивості та здатний індукувати утворення опсонізуючих антитіл. Висока антигенна варіабельність М-протеїну (відомо понад 100 серотипів) обумовлює складність створення ефективних вакцин проти стрептококових інфекцій.

Vi-антиген, характерний для *Salmonella typhi* та деяких інших ентеробактерій, представляє собою лінійний гомополімер N-ацетилгалактозамінурунової кислоти. Цей антиген відіграє ключову роль у вірулентності збудника черевного тифу, захищаючи бактерію від комплемент-залежного лізису та фагоцитозу. Vi-антиген має виражені

імуногенні властивості та використовується для створення ефективних вакцин. Його присутність на поверхні бактеріальної клітини маскує О-антиген, ускладнюючи серологічну діагностику.

Екзотоксини як специфічні антигени. Бактеріальні екзотоксини, є секретованими білковими молекулами, тож володіють вираженими антигенними властивостями. Їх молекулярна структура часто включає ферментативно активний А-компонент та В-компонент, відповідальний за зв'язування з клітинами-мішенями. Висока імуногенність екзотоксинів дозволяє використовувати їх інактивовані форми (анатоксини) для створення високоефективних вакцин. Специфічність екзотоксинів для певних видів бактерій робить їх важливими діагностичними маркерами.

Антигени вірусів

Антигени вірусів є ключовими компонентами, які забезпечують розпізнавання вірусних частинок імунною системою організму. Вони складаються з білків, глікопротеїнів, а в деяких випадках — з ліпідів або інших молекул, які формують вірус або продукуються під час його реплікації. Вірусні білки неоднорідні, володіють різними антигенними властивостями.

Виокремлюють протективні антигени вірусів — це антигени, які сприяють формуванню захисної імунної відповіді, дозволяє організму ефективно боротися з вірусною інфекцією. Вони є основними мішенями для імунної системи, активуючи як гуморальний, так і клітинний імунітет. Вони також можуть використовуватися для розробки вакцин.

Поверхневі білки вірусів є одними з найбільш важливих протективних антигенів, оскільки вони безпосередньо взаємодіють з імунною системою.

Глікопротеїни оболонки та капсидні білки безоболонкових вірусів є головними проєктивними антигенами.

Для вірусів, таких як вірус грипу (містять гемаглютинін та нейрамінідазу), ці білки важливі для прикріплення вірусу до клітин-господарів. Імунна система розпізнає ці антигени, що дозволяє формувати антитіла, здатні блокувати проникнення вірусу в клітину (рис. 4). Гемаглютинін (НА) та нейрамінідаза (НА) вірусу грипу є класичними прикладами проєктивних антигенів, оскільки антитіла до них можуть нейтралізувати вірус і запобігти інфекції.

У простих вібріонів антигени зв'язані із нуклеокапсидами. За хімічним складом вони належать до дезоксирибонуклеопротейдів або рибонуклеопротейдів. Через те, що вони є розчинними сполуками, їх позначають як S-антигени (з лат. *solutio* – розчин). У більш складних вірусів антигенні компоненти пов'язані із нуклеокапсидами або з глікопротеїдами зовнішньої оболонки.

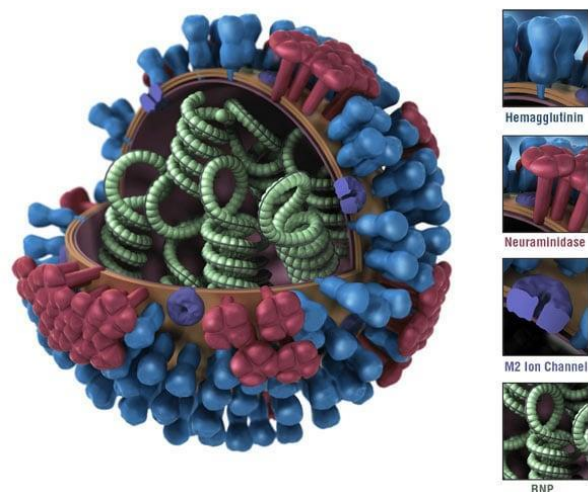


Рис. 4. Модель вірусу грипу (синім кольором показано гемаглютиніни, бордовим – нейрамінідаза) [1]

Віруси мають властивість періодично мутувати, змінювати свою антигенність. Ці зміни обумовлені точковими мутаціями в гені та мають назву «антигенний дрейф». Через антигенний дрейф вірусів виникають складнощі у створенні ефективної противірусної вакцини.

У випадку різкої зміни антигенності за рахунок рекомбінації між

декількома генами виникає «антигенний шифт». Через це явище з'являються нові штами вірусу грипу в яких істотно змінений гемаглютинін. Це спричиняє пандемію грипу через те, що імунна система не встигає вчасно зреагувати на вірусну інфекцію.

Головний комплекс гістосумісності (МНС, *major histocompatibility complex*) є ключовою сукупністю генів, які кодують поверхневі клітинні білки, що забезпечують нормальне функціонування імунного захисту. Вони відіграють центральну роль у регуляції імунної відповіді, зокрема в процесах, що залучають Т-лімфоцити, й забезпечують ідентифікацію клітин організму як «своїх» або «чужих» (рис. 5). Ці білки критично важливі у розвитку аутоімунних процесів, приживленню трансплантанта, успішності вагітності.

Молекули гістосумісності є глікопротеїнами, що експресуються на поверхні клітин організму. Вони належать до великого комплексу гена, відомого як генетичний комплекс гістосумісності (HLA у людини, МНС у інших ссавців), розташованого в короткому плечі 6-ї хромосоми. У людини цей комплекс містить сотні генів, які визначають варіативність молекул МНС та їх здатність зв'язувати і презентувати пептидні фрагменти. МНС відіграє важливу роль у захисті організму від інфекцій та пухлинних клітин. Виокремлюють молекули МНС класу I та класу II.

Молекули МНС класу I експресуються на всіх клітинах організму і складаються з одного важкого альфа-ланцюга, з'єданого з β 2-мікроглобуліном. Вони беруть участь у презентації пептидів, що виникають у результаті розпаду білків внутрішньоклітинного походження (вірусні білки або аномальні білки, вироблені раковими клітинами). Молекули МНС

класу I здатні зв'язувати пептиди довжиною від 8 до 10 амінокислот, і ці комплекси транспортуються до поверхні клітини, де вони можуть бути розпізнані Т-кілерами (CD8+ Т-лімфоцитами). Це дозволяє імунній системі знищувати вірус-інфіковані клітини (або трансформовані в пухлинні).

Молекули МНС класу II складаються з двох ланцюгів (альфа- і бета-ланцюгів) і експресуються переважно на поверхні антиген-презентуючих клітин (АПК), таких як дендритні клітини, макрофаги та В-лімфоцити. Ці молекули презентують пептиди, які потрапили в клітину ззовні (наприклад, антигени бактерій або інших патогенів) внаслідок фагоцитозу. Молекули МНС класу II зв'язують пептиди довжиною від 13 до 25 амінокислот і презентують їх на поверхні клітини для подальшого розпізнавання Т-хелперами (CD4+ Т-лімфоцитами). Взаємодія між Т-хелперами і антиген-презентуючими клітинами активує ефektorні клітини

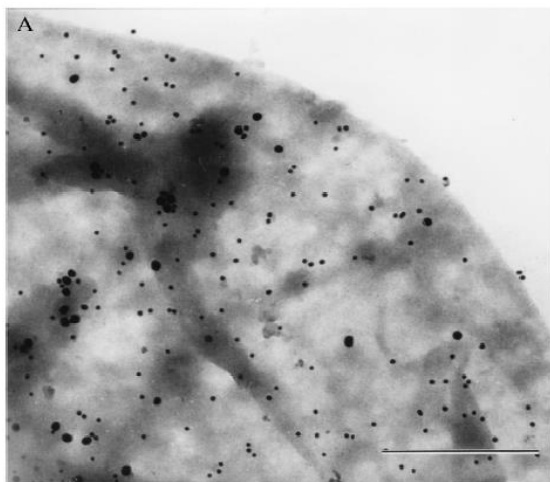


Рис. 5. МНС I і МНС II на мембрані лейкоциту (візуалізовані колоїдним золотом) [2]

і сприяє запуску адаптивної імунної відповіді.

Молекули МНС є ключовими для **презентації антигену** - процесу, завдяки якому імунна система розпізнає та реагує на чужорідні молекули. Молекули МНС забезпечують:

– *Розпізнавання антигенів.* Молекули МНС переносять пептидні фрагменти, що є частинами чужорідних молекул, на поверхню клітини де їх можуть розпізнати Т-лімфоцити, тим самим ініціюючи адаптивну імунну відповідь.

- *Ідентифікацію заражених або трансформованих клітин.* Видозміни молекул МНС класу I дозволяють Т-кілерним клітинам виявляти і знищувати клітини, інфіковані вірусами або раковими клітинами.
- *Активацію Т-хелперів.* Зв'язані із фрагментами антигенів молекули МНС класу II важливі для активації Т-хелперів, які в свою чергу регулюють інші компоненти імунної відповіді, стимулюючи В-лімфоцити й CD8+ Т-клітини, підвищуючи активність макрофагів.

Комплекс гістосумісності є високоваріабельним, що дозволяє організму ефективно реагувати на широкий спектр патогенів. Варіації у генах, які кодують молекули МНС, визначають індивідуальну здатність організму до розпізнавання і відповіді на різні інфекції та антигени. Це має також значення в контексті трансплантації органів, оскільки відсутність схожості між МНС молекулами донора і реципієнта призводить до відторгнення трансплантату.

Дефекти або аномалії в молекулах МНС обумовлюють різноманітні імунологічні порушення. Можуть виникати аутоімунні захворювання внаслідок порушення толерантності до власних антигенів, такі як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит та інші. Варіативність молекул МНС може також визначати індивідуальну сприйнятливість до інфекцій та розвитку раку, оскільки здатність імунної системи ефективно розпізнавати і знищувати пухлинні клітини залежить від специфічності молекул МНС.

Молекули гістосумісності є основними компонентами імунної системи, що забезпечують специфічне розпізнавання антигенів і регуляцію імунної відповіді. Вони є необхідними для ефективної боротьби організму з інфекціями, збереженням гомеостазу та підтримання імунної

толерантності. Генетична варіативність молекул МНС також має важливе значення для розвитку індивідуальної імунної відповіді, а також в контексті трансплантації органів і розвитку імунних захворювань.

Антигени крові (системи АВ0) — це специфічні молекули, які розташовані на поверхні еритроцитів й визначають групу крові людини. При переливанні несумісної крові ці антигени обумовлюють аглютинацію еритроцитів у судинному руслі.

Основою системи АВ0 є наявність природних антитіл (аглютинінів) проти антигенів, які перебувають на поверхні чужорідних еритроцитів (таблиця 1). Антигени системи АВ0 визначають наявність у людській популяції чотирьох груп крові (0 (I), A (II), B (III) и АВ (IV)). У осіб другої групи крові на поверхні еритроцитів присутні олігосахаридні антигени з кінцевим залишком N-ацетилгалактозаміну.

Таблиця 1.

Антигени системи АВ0

Група крові	Антиген (аглютиногени)	Антитіла (аглютиніни)
I (0)	0 (відсутній, олігосахарид недобудований)	Анти-А, анти-В
II (A)	(N-ацетил-D-галактозамін)	Анти-В
III (B)	(D-галактоза)	Анти-А
IV (AB)	(N-ацетил-D-галактозамін, D-галактоза)	Відсутні

Антиген крові у осіб із третьою групою крові від другої групи відрізняється лише заміною кінцевого залишку олігосахариду на галактозу. Індивідууми із четвертою групою крові мають обидва антигени (А та В). У випадку першої групи крові олігосахарид вкорочений на кінцевий залишок цукру. Причиною групових відмінностей крові є невеликі мутації у ферментах, які відповідають за перенесення кінцевого залишку цукру на олігосахариди глікопротеїну мембрани еритроциту.

У крові осіб групи А присутні антитіла проти антигену В. У крові групи В є антитіла проти антигену А. Група 0 має антитіла проти антигенів А та В. У групи АВ відсутні антитіла проти групоспецифічних антигенів. Група крові людини не може змінюватися протягом життя, оскільки вона визначається генетично. Це фундаментальна біологічна характеристика, яка формується ще під час внутрішньоутробного розвитку. Однак існує декілька ситуацій, коли може здаватися, що група крові «змінилася». При трансплантації кісткового мозку нові клітини донора починають виробляти еритроцити зі своїми антигенами і через це у людини може визначатися група крові донора (це не є зміною власної групи крові, а заміна кровотворної системи). Часто іншу групу крові можуть встановити помилково через технічні помилки під час проведення аналізу.

Деякі захворювання (певні види лейкемії, тяжкі бактеріальні інфекції та деякі онкологічні захворювання) можуть тимчасово впливати на визначення групи крові. Інколи у новонароджених можливе помилкове встановлення групи крові через те, що материнські антитіла можуть впливати на результати тестів.

Важливо розуміти, що у всіх цих випадках генетично зумовлена група крові людини залишається незмінною. Змінюються лише результати її визначення через різні зовнішні фактори.

При переливанні несумісної крові розвивається гостра гемолітична трансфузійна реакція, яка може бути смертельно небезпечною. На першій фазі (перші хвилини) антитіла реципієнта розпізнають чужі антигени на донорських еритроцитах, формуються комплекси антиген-антитіло, активується система комплементу та починається внутрішньосудинний гемоліз (руйнування еритроцитів). Друга фаза (30-60 хвилин) супроводжується утворенням токсичних продуктів розпаду еритроцитів та активації системи згортання крові. Через декілька годин розвивається ДВЗ-синдром (порушення згортання крові), гостра ниркова недостатність та розвиток шоку.

Антигени системи Резус (Rh)

Ця система являє собою комплекс трансмембранних глікопротеїнів, які експресуються на поверхні еритроцитів людини. Система кодується двома гомологічними генами — RHD та RHCE, розташованими на хромосомі 1p34-p36.

Антигени системи Rh представлені інтегральними мембранними глікопротеїнами масою 30-32 кДа, що пронизують мембрану еритроцита 12 разів. Протеїн RhD відповідає за експресію D-антигену, тоді як протеїн RhCE — за експресію антигенів C/c та E/e. Відсутність гена RHD обумовлює до Rh-негативний фенотип.

D-антиген характеризується найвищою імуногенністю серед антигенів системи Rh. При потраплянні D-позитивних еритроцитів в

організм D-негативного реципієнта відбувається активна продукція анти-D антитіл класу IgG. Описано понад 50 варіантів D-антигену, включаючи слабкі (weak D) та часткові (partial D) варіанти, що мають знижену експресію або структурні модифікації епітопів.

Система Rh має критичне значення в трансфузіології та акушерстві. Під час вагітності Rh-негативної жінки Rh-позитивним плодом відбувається сенсibilізація материнського організму з подальшою продукцією анти-D антитіл, які, проникаючи через плаценту, викликають імуноопосередкований гемоліз еритроцитів плода. Профілактика Rh-конфлікту базується на застосуванні анти-D імуноглобуліну (на 28-32 тижні вагітності, протягом 72 годин після пологів, при травмах живота під час вагітності).

Переливання Rh-позитивних еритроцитів Rh-негативному реципієнту також призводить до розвитку гемолітичних трансфузійних реакцій при повторних трансфузіях.

Антигенні діагностикуми

Це спеціальні біологічні препарати, які використовуються для виявлення антигенів у зразках біологічного матеріалу, таких як кров, слина, тканини або інші рідини організму. Вони широко застосовуються в діагностиці інфекційних захворювань, дослідженнях імунної системи та для ідентифікації патогенів. Для отримання діагностикумів використовують штами з високою чутливістю до антитіл та здатністю тривалий час зберігати антигенні властивості. Важливим є те, що колонії штамів для посилення здатності до аглютинації повинні мати S-форму.

Корпускулярні антигени — це антигени, які входять до складу клітинних структур або часток (корпускул), таких як бактерії, віруси, клітини організму або їхні фрагменти. Їх використовують для виготовлення діагностикумів, які дозволяють виявляти імунну відповідь організму на специфічні патогени. Корпускулярні антигени-діагностикуми готують з тканин заражених тварин, курячих ембріонів або культур клітин. Ці антигени обробляють ефіром, центрифугують та консервують розчином формаліну або фенолу. Корпускулярні антигени використовують для проведення реакції аглютинації й реакції зв'язування комплементу.

Розчинні антигени необхідні для досліджень із застосуванням реакції зв'язування комплементу або при проведенні реакції імунодифузії. Цей тип антигенів отримують шляхом екстрагування мікробів з колоній, вирощених на агарі.

Бактеріальні діагностикуми можуть містити інактивовану суспензію мікроорганізмів або окремі антигенні компоненти бактерій (О-, Н- чи Vi-антигени) та застосовуються в реакціях аглютинації.

Для отримання джгутикового Н-антигену використовують обробку рухливих мікроорганізмів формаліном, що знижує активність соматичного антигену. Процес передбачає додавання 0,2 % формаліну до суспензії агарової культури бактерій у фізіологічному розчині з подальшим витриманням протягом 24 годин у термостаті при 37°C.

О-антиген виготовляють з урахуванням різної стійкості О- та Н-антигенів до нагрівання. Найпростішим методом отримання О-антигену є нагрівання пробірки зі змивом агарової культури відповідного мікроорганізму у киплячій водяній бані протягом 1,5–2 годин.

Vi-антиген отримують із поверхневих компонентів бактеріальних клітин, стабілізують 25 % розчином хлориду кальцію, а потім консервують формаліном.

Для виготовлення бактеріальних антигенів використовуються як живі культури, так і стандартизовані суспензії убитих мікроорганізмів. Через технічні складнощі та ризик зараження працівників лабораторії живі культури застосовуються рідко, тоді як діагностикуми на основі інактивованих культур є більш безпечними та зручними.

Вірусні діагностикуми містять інактивовані віруси, отримані із культур клітин, курячих ембріонів, заражених тварин. Цей тип діагностикумів використовують у реакції зв'язування комплексу, реакції гальмування гемаглютинації, реакції нейтралізації.

Еритроцитарні діагностикуми — це діагностичні препарати, які базуються на використанні сенсibilізованих (оброблених) еритроцитів специфічними антигенами або антитілами. Вони широко застосовуються у медичній діагностиці для виявлення антитіл, антигенів та інших біологічних маркерів у зразках крові.

Основою еритроцитарних діагностикумів є реакції гемаглютинації — злипання еритроцитів, яке виникає під час взаємодії антигенів і антитіл. Якщо у досліджуваному матеріалі є специфічний компонент (антиген або антитіло), він зв'язується з сенсibilізованими еритроцитами, спричиняючи аглютинацію. Для виготовлення цього типу діагностикумів використовують еритроцити барана, оскільки вони володіють найбільшою адсорбуючою властивістю. Можна використовувати еритроцити інших тварин. Обробка баранячих еритроцитів таніном посилює їхню адсорбційну ємність, після чого їх сенсibilізують антигеном.

Перевагою еритроцитарних діагностиків є простота у використанні, реакція гемаглютинації зазвичай займає кілька хвилин, можливість стандартизації результатів.

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТУ

Система комплементу являє собою частину вродженої ланки імунної системи до складу якої входять групи білків, які містяться у плазмі крові та на поверхні клітин. Ця система відіграє ключову роль у захисті організму від інфекцій, підтримці запальних процесів та регуляції імунних реакцій.

Наприкінці 19 століття німецький вчений Ганс Ернст Август Бухнер у 1889 році виявив, що безклітинна кров'яна сироватка має антибактеріальні властивості. Він назвав цю речовину «алексином» (від грец. «захист»).

Ключовий прорив стався у 1895 році, коли бельгійський імунолог Жуль Борде зробив фундаментальне відкриття. Він продемонстрував, що для лізису (руйнування) бактерій потрібні два компоненти сироватки: термостабільний компонент (антитіла) та термолабільний компонент (власне комплемент).

У 1899 році Пауль Ерліх запропонував термін «комплемент» замість «алексину», оскільки ця система доповнювала (комплементувала) дію антитіл. Він також розробив метод визначення активності комплементу.

Протягом 1907-1909 років Ерліх разом із Гансом Сахсом розробили кількісний метод визначення активності комплементу — реакцію

зв'язування комплементу. Відтоді ця реакція стала важливим діагностичним інструментом.

У 1920-х роках розпочалося вивчення окремих компонентів системи комплементу. Манфред Мейєр у 1920 році виділив перший компонент (C1). Поступово були ідентифіковані й інші компоненти. Значний прорив стався у 1950-х роках, коли Ірвін Лепов та Луїс Пілемер відкрили альтернативний шлях активації комплементу, який не потребував присутності антитіл. Це відкриття показало, що система комплементу може активуватися різними способами.

У 1960-70-х роках були детально вивчені всі компоненти системи комплементу та встановлено послідовність їх активації. У 1980-х роках було відкрито лектиновий шлях активації комплементу, що став третім відомим шляхом активації після класичного та альтернативного.

Система комплементу містить біля 20 взаємодіючих компонентів. Ці всі компоненти є розчинними білками з молекулярною масою від 24 000 до 40 000 Да, які циркулюють у крові та тканинній рідині. Переважна більшість білків комплементу синтезуються макрофагами печінки та складають до 5% від усієї глобулінової фракції плазми. Більшість з цих білків не активні до тих пір, доки не почнеться їхня активація в результаті імунної відповіді.

Частина сироваткових білків належить до системи комплементу, позначається латинською літерою С з додаванням числового позначення номера компонента. Номер компонента надавався білкам у черзі їхнього відкриття (не плутати з етапами активації). Деякі білки мають назви факторів з додаванням латинських літер В, D, H, I.

Продукти розщеплення білків позначають так само, як і вихідні компоненти комплексу, проте маленькими латинськими літерами. Якщо розщеплюється фактор В – отримуються фрагменти Ва та Вb. Розщеплення білка С4 відбувається на фрагменти С4а та С4b. Активовані компоненти позначають рисою над літерою, інактивовані – літерою «і» (іС3b). Регуляторні білки позначають аббревіатурами, які утворюються з перших літер назв їхньої функціональної активності. Наприклад, білок, який прискорює дисоціацію С3-конвертази, позначається аббревіатурою DAF (*decayaccelerating factor*, фактор прискорення дисоціації).

Роль білків системи комплексу

Система комплексу являє собою складний каскад білків сироватки крові та клітинних мембран, який відіграє ключову роль у функціонуванні як вродженого, так і адаптивного імунітету. Загалом система налічує приблизно 30 різних білків, які забезпечують виконання численних захисних та регуляторних функцій організму.

Однією з найважливіших біологічних функцій білків комплексу є забезпечення прямого лізису патогенів. При активації термінальних компонентів каскаду (С5b-С9) відбувається формування мембраноатакуючого комплексу (МАК), який створює трансмембранні пори в оболонці мікроорганізмів (рис. 6). Утворення цих пор порушує осмотичний баланс та призводить до загибелі патогену. Цей механізм особливо ефективний проти грамнегативних бактерій та деяких вірусів, що мають ліпідну оболонку.

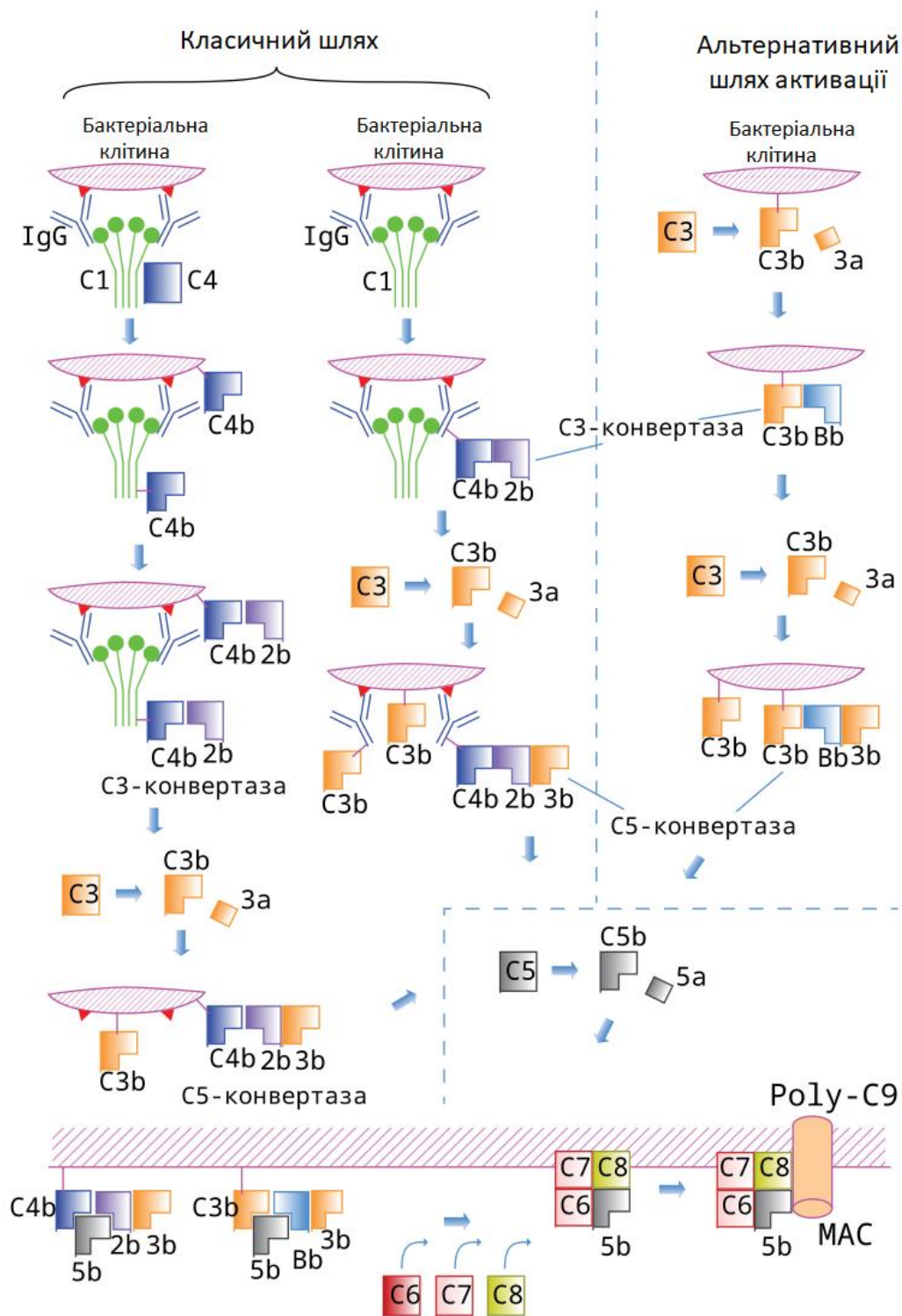


Рис. 6. Схема активації системи комплементу [3]

Важливою функцією системи комплементу є **опсонізація** – процес, під час якого патогени покриваються фрагментами комплементу (переважно

C3b та iC3b), що робить їх «видимими» для фагоцитів. Нейтрофіли та макрофаги мають спеціальні рецептори до цих фрагментів (CR1, CR3, CR4), завдяки чому розпізнають та поглинають опсонізовані мікроорганізми. Опсонізуюча дія комплекменту суттєво підвищує ефективність фагоцитозу та сприяє елімінації імунних комплексів і апоптотичних клітин. Білки системи комплекменту відіграють важливу роль у процесах хемотаксису та активації лейкоцитів.

Анафілатоксини (C3a, C4a і особливо C5a), які утворюються при розщепленні відповідних компонентів, є потужними *хемоатрактантами* для нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів. Вони приваблюють ці клітини до місця інфекції, стимулюють їх дегрануляцію, продукцію активних форм кисню та секрецію прозапальних цитокінів. Крім того, анафілатоксини підвищують експресію адгезивних молекул на ендотелії судин, посилюючи міграцію лейкоцитів до вогнища запалення.

Не менш важливою є імунорегуляторна функція білків комплекменту. Вони модулюють продукцію антитіл В-лімфоцитами, посилюють презентацію антигену дендритними клітинами та макрофагами, впливають на диференціацію Т-лімфоцитів та їх ефektorні функції. Зокрема, компоненти комплекменту взаємодіють з рецепторами CR1 і CR2 на В-клітинах, що значно знижує поріг їх активації. Система комплекменту також бере участь у регуляції функції Т-регуляторних клітин через C3a та C5a компоненти.

Система комплекменту відіграє ключову роль у кліренсі імунних комплексів з кровотоку. Білки C1q, C3b та C4b зв'язуються з імунними комплексами, запобігаючи їх відкладенню в тканинах та сприяючи їх транспортуванню до клітин ретикулоендотеліальної системи для

подальшої елімінації. Цей механізм надзвичайно важливий для профілактики імунокомплексних захворювань.

Окрему увагу слід приділити ролі системи комплементу в елімінації апоптичних клітин. Білок C1q розпізнає фосфатидилсерин та інші маркери на поверхні апоптозних клітин, і запускає їх опсонізацію. Це забезпечує швидкий та ефективний фагоцитоз «відпрацьованих» клітин без розвитку запальної реакції, тим самим запобігаючи формуванню аутоімунних реакцій.

Білки комплементу є ключовими медіаторами запалення. Анафілатоксини C3a та C5a стимулюють дегрануляцію тучних клітин з вивільненням гістаміну та інших медіаторів, що призводить до підвищення проникності судин та скорочення гладеньких м'язів. Вони також індукують експресію прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6 та TNF- α , що підсилює й підтримує запальну реакцію.

У контексті противірусного захисту система комплементу здійснює нейтралізацію вірусних частинок шляхом їх опсонізації, забезпечує лізис оболонкових вірусів мембраноатакуючим комплексом та стимулює противірусні механізми NK-клітин. Ці процеси є важливою складовою раннього захисту організму до формування адаптивної імунної відповіді.

Варто відзначити участь білків комплементу в процесах тканинної регенерації та ремоделювання. Вони стимулюють проліферацію клітин, беруть участь у відновленні тканин після пошкодження та впливають на нейрогенез і синаптичну пластичність в центральній нервовій системі. Сучасні дослідження вказують на важливу роль системи комплементу в регуляції синаптичного прунінгу під час розвитку мозку.

Нарешті, білки комплементу беруть участь у підтриманні гомеостазу мікробіому, регулюючи склад кишкової мікрофлори та захищаючи організм від транслокації коменсальних бактерій через епітеліальний бар'єр.

Дисрегуляція системи комплементу асоціюється з численними патологічними станами. До них належать аутоімунні захворювання (системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит), інфекційні хвороби, запальні розлади (сепсис, респіраторний дистрес-синдром), нейродегенеративні захворювання (хвороба Альцгеймера) та відторгнення трансплантатів, що підкреслює фундаментальну біологічну роль цієї системи у підтриманні здоров'я організму.

У лабораторній діагностиці система комплементу активно використовується в різних методах імуноаналізу для виявлення антигенів, антитіл або визначення стану імунної системи. Одним із класичних методів діагностики інфекційних та аутоімунних захворювань є реакція зв'язування комплементу. Принцип цього методу ґрунтується на взаємодії специфічного антитіла з антигеном у присутності комплементу. Якщо антитіло зв'язується з антигеном, комплемент фіксується в цій реакції та не бере участі в наступному етапі тесту. Для визначення залишкового комплементу використовують індикаторну систему — зазвичай еритроцити, сенсibilізовані антитілами. Якщо комплемент не був зв'язаний у першій реакції, він викликає лізис еритроцитів, що підтверджується візуально.

Для виявлення специфічних антитіл або для оцінки активності комплементу використовується реакція комплемент-залежного цитолізу. Принцип ґрунтується на тому, що антитіла, зв'язані з поверхнею клітин, активують комплемент. Це призводить до руйнування клітин-мішеней.

Даний підхід використовується, наприклад, у тестах на сумісність донорських органів перед трансплантацією.

Система комплементу є цінним інструментом у лабораторній діагностиці та імуноаналізі. Її використання дозволяє підвищити точність діагностики інфекційних, аутоімунних та імунодефіцитних станів.

МЕТОДИ ІМУНОХІМІЧНОГО АНАЛІЗУ

РЕАКЦІЇ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Сутність **реакції преципітації** полягає в тому, що відбувається формування та осадження видимого неозброєним оком комплексу розчинного молекулярного антигену з антитілами, яке називають **преципітатом**. Обов'язковими складниками цієї реакції є: *розчинний антиген (або гаптен) + імунна преципітуюча сироватка (преципітуючі антитіла) + середовище преципітації (фізіологічний розчин або агаровий гель)*.

Антигенами для реакції преципітації є розчинні сполуки — білки, комплекси білків із вуглеводами та ліпідами, бактеріальні екстракти, фільтрати мікробних бульйонних культур, екстракти бактерій. Антитіла для реакції преципітації зазвичай отримують шляхом імунізації кролів відповідними антигенами.

Оптимальна специфічна взаємодія антитіла з антигеном відбувається в ізотонічному розчині з рН, наближеним до нейтрального. Реакція преципітації високоспецифічна та чутлива, вона дозволяє швидко (протягом декількох секунд) виявити незначну кількість антигену, яку не можливо виявити звичайними хімічними методами. Важливою умовою осадження з розчину комплексів антиген-антитіло (Ag-At) є еквівалентне співвідношення концентрацій взаємодіючих молекул. Якщо кількість одного із компонентів буде більшою — утворюється «розчинний» комплекс й реакція не проявиться.

Оскільки антиген (можна зустріти назву «преципітоген») має ультрамікроскопічну будову та його концентрація в одиниці об'єму є вищою, ніж концентрація антитіл в такому самому об'ємі сироватки, для осадження більш легких часточок антигену з утворенням видимого преципітату необхідна більша кількість антитіл. Через це комерційні діагностичні преципітуючі сироватки мають високий титр.

Феномен преципітації пов'язаний із утворенням решітчастих структур завдяки полівалентній природі антигенів та антитіл. Marrak J.R. пояснював це тим, що коли утворюється комплекс «антиген-антитіло», до нього послідовно приєднуються інші молекули антигенів і антитіл. Як результат — формуються сіткоподібні структури, які випадають в осад.

Вираженість реакції залежить від кількісного співвідношення антигенів і антитіл. Найкраще інтенсивність реакції проявляється у випадку, коли антигени і антитіла в суміші перебувають у еквівалентному співвідношенні. Підтвердженням цього є той факт, що одновалентні гаптени не дають реакції преципітації за наявності в молекулі двох і більше епітопів, проте преципітат утворюється. Отримані в результаті розщеплення молекули антитіл (одновалентні Fab-фрагменти) не преципітують полівалентний антиген, хоч і сполучаються з ним. Двовалентні гаптени, які містять дві різні за структурою детермінантні групи, здатні утворювати преципітат лише за присутності специфічних до обох детермінантних груп антитіл. Схематично преципітат можна собі уявити наступним чином: молекули антигену є вузлами решітки, а молекули антитіл — ланцюгами, що їх зв'язують.

Реакцію преципітації проводять як у рідкому, так і твердому середовищі. Поширеними є реакції преципітації у напіврідкому гелі агару

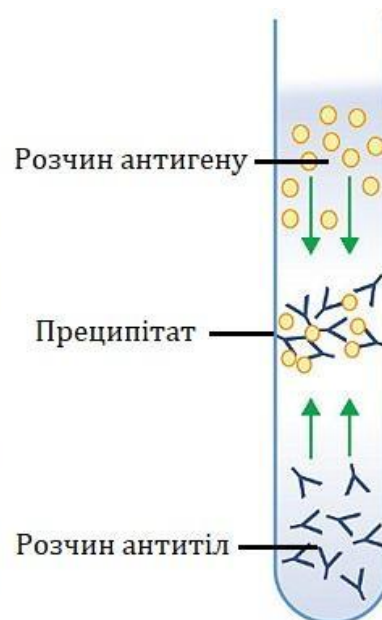
або агарози (імунодифузія за Манчині, подвійна імунодифузія за Оухтерлоні, імуноелектрофорез).

Реакція кільцепреципітації.

Обов'язковою вимогою виконання реакції преципітації в рідкому середовищі є максимальна прозорість імунореагентів. Реакція відбувається після нашарування розчину одного імунореагенту на інший. За характером утвореного преципітату (у вигляді кільця) реакція отримала назву «реакція кільцепреципітації» (рис. 7).

Постановка реакції

Вузьку пробірку з діаметром 0,5 см з нерозведеною преципітуючою сироваткою в об'ємі 0,3-0,5 мл утримують під нахилом та пастерівською піпеткою повільно, по стінці, нашаровують антиген у такому ж об'ємі. Після цього пробірку обережно (щоб не змішати рідини) ставлять вертикально, уникаючи перемішування



**Рис. 7. Приклад реакції
кільцепреципітації**

рідини. За умов правильного нашарування антигену на сироватку з'являється чітка межа між двома шарами рідини у вигляді кільця. Виконання цієї реакції обов'язково має супроводжуватися контролюми

сироватки та антигену. Результати реакції обраховують в залежності від виду антигену та антитіл (через 5-10 хв, 1-2 год або через 20-24 год). У випадку позитивної реакції, на межі між досліджуваною сироваткою та антигеном з'являється преципітат у вигляді кільця білого кольору. Якщо в якості антигену у реакції кільцепреципітації використовують прокип'ячені та профільтровані водні екстракти органів і тканин, тоді цю реакцію називають реакцією **термопреципітації** (наприклад, *реакція Асколі*, яка у ветеринарії призначена для виявлення збудника сибірської виразки у тваринній сировині).

Реакція кільцепреципітації також використовується для вивчення антигенної структури бактерій, складних білків, біологічних рідин людини і тварин, для вивчення токсинів бактерій, під час діагностики бактеріальних, вірусних та грибкових інфекційних захворювань. В якості біоматеріалу виступають екsudати з рани, фільтрати екстрактів уражених органів, спино-мозкова рідина. Для встановлення ступеня спорідненості видів мікроорганізмів визначають загальний антиген. У судовій медицині за допомогою реакції кільцепреципітації встановлюють видову приналежність білків (крові, слини, сім'яної рідини), виявляють домішки у м'ясних, рибних або хлібобулочних виробках.

Реакція преципітації в гелі

Реакція преципітації в агаровому гелі, або **метод дифузійної преципітації**, дозволяє детально визначити вміст складних водорозчинних антигенних сумішей. Для виконання цієї реакції використовується напіврідкий гель (або більш густий агар).

Компоненти, які входять до складу антигену, дифундують на зустріч відповідним антитілам з різними швидкостями. Саме тому комплекси різноманітних антигенів та відповідних антитіл розташовують у різних ділянках гелю в яких і утворюються лінії преципітації. Кожна лінія відповідає лише одному комплексу «антиген-антитіло». Реакцію преципітації зазвичай проводять за кімнатної температури.

Для кількісного визначення антигену часто виконують просту **радіальну імунодифузію за Манчіні** (рис. 8). Моноспецифічну

антисироватку (джерело антитіл) змішують із агаровим гелем, після чого суміш наносять на предметні скельця та залишають



застигати. У отриманому гелі вирізають лунки, вносять до

Рис. 8. Результат імунодифузії на предметному склі за Манчіні [4]

них розчин антигену в різноманітних концентраціях та залишають не менше ніж на 24 години (часто у холодильнику). Антиген дифундує в гель, зв'язується з антигенами та при досягненні точки еквівалентності відбувається осадження комплексів Ag-At у вигляді кільця. За стандартних умов досліду діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації досліджуваного антигену. Таким способом отримують калібрувальну криву, за допомогою якої можна кількісно визначити досліджуваний антиген.

Для кількісного визначення антитіл використовують той самий метод у зворотній послідовності: до гелю додають антиген, до лунок – антитіла. Частіше за все за допомогою цього методу виявляють білкові антигени:

кількісний вміст імуноглобулінів різних класів у сироватці крові та інших рідинах, у секретах залоз, білках крові, спино-мозковій рідині.

Реакція Оухтерлоні

Цей метод ще називають **реакцією подвійної імунодифузії**. Ця реакція дозволяє ідентифікувати антигени або антитіла на основі утворення преципітату в результаті одночасної міграції антигену та антитіл у твердому агаровому середовищі.

Для проведення реакції використовують агар або агарозу. На



Рис. 9. Реакція подвійної імунодифузії у чашці Петрі [5]

предметне скло або у чашки Петрі наливають тонкий шар теплого агару. Після застигання за допомогою штампів або скляних трубок з рівними краями вирізають лунки на однаковій відстані одна від одної (приблизно 4-10 мм) для антигену і антисироватки та заповнюють відповідними розчинами (рис. 9).

Антиген й антитіла дифундують до гелю на зустріч один одному, взаємодіючи вони утворюють преципітат у вигляді тонких опалесцюючих смуг. Оскільки дифузія реагентів з лунок до гелю відбувається одночасно та радіально, це дозволяє аналізувати одночасно декілька зразків, розмістивши навколо лунки з

антисироваткою декілька лунок з розчинами різних антигенів. Можливо навпаки — заповнення периферійно розташованих лунок антисироваткою (центральною — досліджуваним антигеном) або внесення у центральну лунку відомого антигену (до периферійних лунок вносять досліджувану сироватку в різних розведеннях).

За наявності антигенної специфічності, у певній периферійній лунці формується смуга преципітації між нею та центральною лункою. Завдяки відомій антисироватці можна ідентифікувати невідомий антиген або навпаки. Подвійну радіальну імунодифузію застосовують переважно для якісного дослідження (для визначення антигенів у різноманітних рідинах, у сироватці чи спинномозковій рідині), для оцінювання чистоти препаратів під час виділення антигену, для порівняння відомих антитіл та антигенів із невідомими, з метою оцінки стану імунізації тварин.

Оцінка результатів.

За умов оптимального співвідношення антигенів та антитіл, лінія преципітації розташовується майже посередині між лунками. У випадку кількісного переважання одного з реагентів відбувається зміщення лінії преципітації до лунки з іншим реагентом. Антиген та антитіла утворюють видимі преципітати за концентрацій білка від 5 до 50 мкг/мл. Під час оцінювання результатів імунодифузії необхідно враховувати:

- Відстань (яка відокремлює лінію преципітації від центральної та периферичної лунки);
- Інтенсивність та ширину смуг преципітації;
- Останнє розведення антисироватки (за якого ще можна побачити преципітат).

Порівняльний аналіз

Для виявлення повної або часткової ідентичності антигенів у гелі, зазвичай вирізають три лунки (які розташовані по кутам умовного трикутника). До двох з них поміщають порівнювальні розчини антигенів, до третьої — антисироватку. Можливі також три варіанти розташування ліній преципітації:

- *Лінії повністю зливаються* (свідчить про ідентичність антигенів у обох лунках)
- *Одна з ліній є довшою, та виходячи з цієї лінії утворює т. зв. «шпору».* У цьому випадку це вказує на часткову ідентичність антигенів (обидва антигени мають деякі загальні детермінанти, які при злитті з антитілами утворюють лінії преципітації, що зливаються). Проте у одного антигену все ж мають місце детермінанти, які відсутні у іншого.
- *Лінії, які перетинаються або які не перетинаються* (та не зливаються), що вказує на відсутність ідентичних антигенних детермінант та різноманітність досліджуваних антигенів.

Реакція флокуляції

Цей тип реакції являє собою випадок реакції преципітації. Вона проявляється у вигляді появи **опалесценції** або пластівців після додавання до пробірки з токсином (анатоксином) антитоксичної сироватки (з латинської «*floccus*» перекладається як грудка шерсті) (рис. 10). Зазвичай таку реакцію застосовують для визначення активності антитоксичної сироватки (кількості міжнародних одиниць МО у 1 мл сироватки).



**Рис. 10. Реакція
флокуляції (тест на
Treponema pallidum) [6]**

Сутність реакції полягає в тому, що до серійних розведень антитоксичної сироватки додають однакову кількість антигенних одиниць (АО) токсину або анатоксину. Одиниця АО — це та кількість токсину (анатоксину), яка зв'язується із однією МО антитоксичної сироватки. Первинна (ініціальна) флокуляція відбувається у пробірці, в якій антиген та антитіла перебувають у еквівалентних співвідношеннях.

Якщо концентрація компонентів у пробірці є відомою, то можна розрахувати активність антитоксичної сироватки, в якій відбулася флокуляція. Наприклад, ініціальна флокуляція відбулася в пробірці в якій було 0,04 мл сироватки та 8 антигенних одиниць токсину (анатоксину). Відповідно, 0,04 мл цієї сироватки містить 8 МО токсину (анатоксину). Відповідно, титр антитоксичної сироватки сягає 200 МО.

РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ

Назва походить від латинського слова «*agglutination*» і перекладається як «склеювання». Це одна з найперших імунологічних реакцій у мікробіологічній практиці. Вперше ця реакція була застосована Фернаном Відалем у 19 столітті для діагностики черевного тифу. Сутність цієї реакції

полягає у склеюванні корпускулярних антигенів антитілами у присутності фізіологічного розчину. Корпускулярними антигенами можуть бути бактерії, еритроцити (або інші клітини), нерозчинні часточки (з адсорбованими на них антигенами), макромолекулярні агрегати.

Візуально **реакція аглютинації** проявляється утворенням пластівців або осаду (утворений клітинами, які «склеїлися» антитілами, що мають багато антигензв'язувальних центрів). Антиген, який бере участь в аглютинації, називають **аглютиногеном**, антитіло — **аглютиніном**, утворений осад — **аглютинатом**.

У реакції аглютинації беруть участь головним чином антитіла, які належать до імуноглобулінів класів М та G. Реакція аглютинації є двостадійною. Перша стадія полягає у специфічній взаємодії активного центру антитіл з детермінантою антигену. Це може відбуватися без використання фізіологічного розчину та не супроводжується видимими змінами. Для наступної фази (утворення аглютинату) обов'язковим є наявність електролітів (наприклад, той же фізіологічний розчин), які знижують електричний заряд комплексів Ag-At та прискорюють процес їхньої аглютинації. Друга стадія завершується утворенням аглютинату. Під час утворення аглютинату має значення кількісне співвідношення антигену та антитіл (феномен оптимуму). За надлишку, як і за недостатності антитіл, аглютинація затримується.

Характер та швидкість аглютинації залежить від виду антигену й антитіл. Реакція аглютинації з О-діагностикумом (бактерії, зруйновані нагріванням та збереженням термостабільного О-антигену) відбувається у вигляді дрібнозернистої аглютинації. Реакція аглютинації з Н-діагностикумом (бактеріями, які були зруйновані формаліном та зберегли

термолабільний джгутиковий Н-антиген) — великозерниста та протікає швидше. За методичним підходом виокремлюють декілька варіантів реакції аглютинації.

Орієнтовна реакція аглютинації використовується з метою видової ідентифікації мікроба. До проби додають відому імунну аглютинуючу сироватку.

Якщо необхідно ідентифікувати збудник, то в цьому випадку застосовують діагностичні антитіла (або «аглютинуючу сироватку»). Для ідентифікації мікроорганізмів на знежирене предметне скло наносять окремо краплю відомої аглютинуючої сироватки у розведенні 1:10 або 1:20 та краплю фізіологічного розчину (виконує роль контролю). Після цього до кожної краплі додають чисту культуру досліджуваного мікроорганізму та перемішують до отримання гомогенної зависі (рис. 11).

Через 2-4 хвилини проводять облік результатів. У контрольній пробі змін не повинно бути. При позитивній реакції у краплині сироватки виникають пластівці англутинату, які добре видно на темному тлі при



Рис. 11. Аглютинація (А – позитивна реакція; Б – негативна реакція) бактерій аглютинуючою сироваткою на предметному склі [7]

похитуванні предметного скла. У випадку негативної реакції рідина залишається рівномірно каламутною. Вагомою перевагою реакції аглютинації на склі є легкість у її виконанні, результат отримується через декілька хвилин (оскільки обидва компоненти використовуються у

концентрованому вигляді). Недоліком є те, що реакція на склі має лише якісне значення.

Стандартні діагностичні аглютинуючі сироватки отримують шляхом гіперімунізації лабораторних тварин бактеріальною зависсю. Титром отриманої такої сироватки є найбільше її розведення, за якого спостерігається чітка аглютинація відповідного антигену.

Якщо у різних бактерій є однакові (подібні) групові антигени — тоді вони можуть аглютинуватися однією й тією ж діагностичною сироваткою. Це утруднює їхню ідентифікацію. У цьому випадку доцільним є використання адсорбованих аглютинаційних сироваток з яких попередньо видалені перехресно реагуючі антитіла.

Для отримання такого типу сироваток застосовують **метод Кастеляні**, який полягає у насиченні аглютинуючої сироватки спорідненими бактеріями. Вони адсорбують «непотрібні» антитіла в той час як специфічні антитіла залишаються у сироватці. В залежності від виснаження групових аглютинінів можна отримати *монорецепторні сироватки*, які мають антитіла тільки до одного рецептора-антигену.

Для швидкого визначення антитіл у сироватці крові за допомогою реакції аглютинації використовують стандартний мікробний діагностикум, який містить завись відомих мікробів або їх антигенів. Реакція аглютинації добре виявляє IgM антитіла, проте менш чутлива для виявлення IgG-антитіл.

Розгорнута реакція аглютинації застосовується для кількісного визначення антитіл у сироватці крові. Спочатку готують двократне розведення досліджуваної сироватки крові фізіологічним розчином у пропорції від 1:50 до 1:1600. В якості антигену в цій реакції використовують діагностикуми — зависі відомих (як правило інактивованих) бактерій. До отриманих двократних розведень сироваток вносять по 1-2 краплинам зависі бактерій. Пробірки струшують та поміщають до термостату на 2 години за температури 37 °С.

Реакція відбувається з утворенням дрібних пластівців, які не помітні неозброєним оком. Через це отримані результати оцінюють із використанням спеціального приладу який має назву аглютиноскоп (рис. 12). Облік проводять тільки за умови що контрольна сироватка залишилася прозорою, контроль антигену — каламутним.



Рис. 12. Аглютиноскоп [8]

Інтенсивність аглютинації оцінюють за системою «чотири плюси»: повна аглютинація позначається як «++++», часткова – «+++» або «++», сумнівний результат «+». Титром антитіл у досліджуваній сироватці вважається останнє розведення за якого спостерігається аглютинація «++».

Реакція прямої аглютинації (з грец. «*haima*» — кров, лат. «*agglutination*» — склеювання) називають феномен склеювання еритроцитів. Оскільки *антитіла (аглютиніни)* безпосередньо аглютинують *корпускулярні антигени (аглютиногени)*, цю реакцію називають прямою. Реакцію прямої гемаглютинації використовують для визначення групової приналежності крові до системи АВ0 та резус-фактора.

Для визначення груп крові за допомогою *прямої гемаглютинації* необхідні стандартні *ізогемаглютинуючі сироватки* крові донорів. Проводять реакцію на склі або лунках планшету. Реакція аглютинації вважається позитивною у випадку утворення грудочок з еритроцитів чи пелюсток протягом наступних 5 хвилин. Негативна реакція — краплина залишається рівномірно зафарбованою у червоний колір (рис. 13).

Анти - А	Анти - В	Анти - АВ	
			О (I)
			А (II)
			В (III)
			АВ (IV)

Рис. 13. Аглютинація еритроцитів внаслідок додавання моноклональних антитіл [9]

Якщо сироватки усіх трьох груп дають позитивну реакцію, це вказує на приналежність групи крові до АВ(IV). Для виключення неспецифічної реакції аглютинації проводять додаткове контрольне дослідження зі стандартною сироваткою групи АВ(IV), яка не містить аглютинінів.

Застосовують також пробу на сумісність крові, коли краплини крові донора та реципієнта у співвідношенні 1:10 змішують та оцінюють

аглотинацію. Сучасний метод визначення груп крові та резус-фактору полягає у використанні мишачих моноклональних антитіл (*анти-А, анти-В та анти-D*), отриманих за допомогою гібридомної технології.

На планшет вносять по одній великій краплині (0,1 мл) реагентів анти-А та анти-В. Поряд поміщають по невеличкій краплині (0,01—0,03 мл) досліджуваної крові. Краплини перемішують окремими скляними паличками та спостерігають за розвитком аглотинації протягом 3 хвилин. Визначення резус-фактора виконується аналогічно. Якщо відбулася аглотинація з реагентом анти-Д це вказує на резус-позитивну групу крові.

Подібний з прямою гемаглютинацією механізм лежить в основі *вірусної гемаглютинації*. Значна частина вірусів здатна спонтанно аглютинувати еритроцити певних видів ссавців та птахів, їхнє додавання до суспензії еритроцитів призводить до утворення агрегатів, грудочок.

Наприклад, вірус грипу здатен аглютинувати еритроцити курей, мурчаків, людини. Аденовіруси здатні аглютинувати еритроцити щурів та мишей. Віруси, які мають властивості до гемаглютинації, містять на своїй поверхні гемаглютиніни, за допомогою яких відбувається склеювання еритроцитів. За хімічною природою гемаглютиніни є *гліко-* або *ліпопротеїдами*.

Гемаглютинація, яка спричинена вірусами, не належить до імунологічних реакцій, оскільки в цьому випадку немає системи «антиген-антитіло». За допомогою цієї реакції легко виявити присутність вірусу, здатного до гемаглютинації, проте неможливо його ідентифікувати. Віруси ідентифікують за допомогою *серологічної реакції гальмування гемаглютинації*.

Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) — серологічна реакція, основою якої є здатність антитіл зупиняти аглютинацію еритроцитів вірусами гемаглютинуючих видів. Ця реакція базується на здатності антитіл зв'язувати різноманітні віруси та нейтралізувати їх, тим самим позбавляючи можливості аглютинувати еритроцити (рис. 14). Якщо попередньо з'єднати вірус зі специфічною *вірус-нейтралізуючою імунною сироваткою* та після цього додати еритроцити — такий інактивований вірус втрачає здатність викликати гемаглютинацію. Саме через це реакція отримала назву реакції гальмування гемаглютинації.

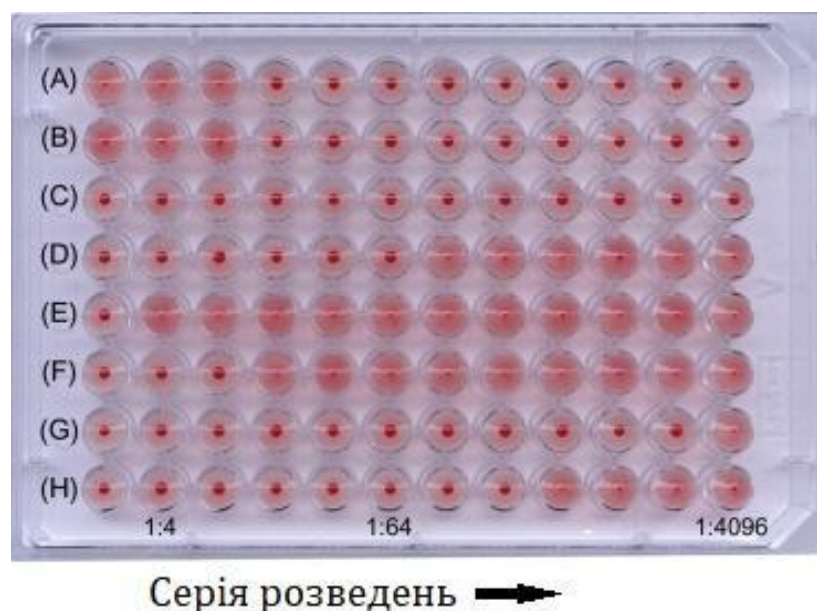


Рис. 14. Тест гальмування гемаглютинації для виявлення антитіл, специфічних до вірусу грипу [10]

Вона може бути використана для остаточної ідентифікації невідомого гемаглютинуючого вірусу (із використанням специфічної діагностичної сироватки), для визначення титру невідомих антитіл у сироватці (за допомогою вірусних антигенів-діагностикумів).

РГГА використовують для діагностики багатьох вірусних захворювань, збудники яких здатні аглютинувати еритроцити різноманітних тварин. Таким чином діагностують вірус грипу, краснухи, кліщового енцефаліту.

Для проведення РГГА використовують попередньо відомі імунні противірусні сироватки, які розводять у фізіологічному розчині (розведення відбувається кожного разу у два рази) й вносять до лунок. До кожного їх розведення додають одну й ту саму кількість вірус-вмісної рідини. Контролем слугує завись вірусу у фізіологічному розчині.

Планшети із сумішшю сироваток та вірусу поміщають до термостату (на 30 хвилин) або залишають за кімнатної температури на 2 години і після цього до кожної проби вносять еритроцити. Через 30 хвилин визначають *титр* віруснейтралізуючої сироватки (її максимальне розведення) яке призводить до затримки аглютинації еритроцитів.

Типування вірусу проводять за допомогою типоспецифічних сироваток. Результат реакції вважається позитивним за відсутності гемаглютинації. У випадку позитивного результату, еритроцити осідають на дно у вигляді рівного шару клітин зі складчастим або зазубреним краєм (у вигляді перевернутої парасолі). За негативного результату — вони розташовуються у центрі дна у вигляді гудзика або кільця.

Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА або РПГА)

Ця реакція передбачає попередню обробку еритроцитів антигеном (або антитілами). Такі еритроцити здатні аглютинуватися відповідно імунною сироваткою (або антигеном).

Це дозволяє, на відміну від класичної реакції аглютинації, використовувати не лише корпускулярні, а й розчинні антигени. На сьогодні найбільш часто використовують еритроцити донорів або тварин. Еритроцити, на яких адсорбований антиген, мають назву сенсibilізованих даним антигеном. Імунна реакція в цьому випадку має назву непрямой (або пасивної) гемаглютинації, оскільки ці еритроцити приймають пасивну участь.

Після сорбції розчинних мікробних антигенів на еритроцитах (як на носіях) отримують т. зв. антигенні діагностикуми. Антигенні діагностикуми застосовують для виявлення антитіл. Якщо на еритроцитах адсорбовані антитіла відомої імунної сироватки — їх називають *антитільним діагностиком*. Антитільні діагностикуми використовують для виявлення антигенів у досліджуваному матеріалі.

Реакція непрямой гемаглютинації відрізняється від реакції аглютинації більшою чутливістю та специфічністю. Цю реакцію використовують для:

- виявлення полісахаридів, білків, екстрактів бактерій та інших високодисперсних речовин, рикетсій та вірусів, комплекси яких з аглютинінами у звичайних реакціях аглютинації виявити неможливо;
- для виявлення у сироватках антитіл до високодисперсних речовин та дрібних мікроорганізмів.

У випадку позитивного результату еритроцити осідають на дно у вигляді рівного шару клітин зі складчастим або зазубреним краєм (т. зв. «перевернута парасоля»). За негативного результату еритроцити розташовуються на дні у вигляді гудзика або кільця.

Реакція непрямой гемаглютинації застосовують для серологічної діагностики інфекцій, спричинених бактеріями, рикетсіями, найпростішими. Також ця реакція використовується для виявлення гормону хоріонічного гонадотропіну в сечі для підтвердження вагітності, для виявлення підвищеної чутливості до лікарських препаратів, гормонів тощо.

Наприклад, збудник ботулізму *Clostridium botulinum* продукує токсини семи типів. Усі типи токсинів відрізняються за антигенними властивостями і їх можна диференціювати за допомогою реакцій із типоспецифічними сироватками. З цією метою можна поставити реакцію непрямой гемаглютинації з сироваткою пацієнта (в якій передбачається наявність токсину), та еритроцитами, «навантаженими» антитілами антитоксичних протиботулінічних сироваток. Контролем слугує сироватка здорової людини.

Латекс-аглютинація

Цей тип реакції є одним із видів аглютинації, за якої в якості носія антигену або антитіла використовуються штучні латексні часточки замість еритроцитів. *Латекс-аглютинація*, як і інші серологічні реакції, проводиться для виявлення невідомого антигену у досліджуваному матеріалі, а також для виявлення антитіл до збудника у досліджуваній сироватці.

Для проведення реакції використовують сенсibilізовані часточки полістиролового латексу діаметром 0,5-1,2 мкм, які у присутності гомологічного імунореагенту (антигену або антитіла) склеюються. Реакція відбувається достатньо швидко, протягом 2-7 хвилин.

Для приготування антигенного латексного діагностикуму розчинні дрібнодисперсні антигени бактеріальної клітини білкової або полісахаридної природи адсорбують на поверхні зафарбованих часточок інертного монодисперсного латексу (рис. 15).



**Рис. 15. Латекс-аглотинація
на пластиковій картці [11]**

Навантажені бактеріальним антигеном латексні часточки склеюються під дією імунної сироватки, яка містить антитіла проти цього антигену, з подальшим утворенням характерного осаду — тонкої плівки з нерівними краями (та сама

«перевернута парасоля»). Таку модифікацію реакції латекс-аглотинації застосовують для виявлення антитіл до вірусу грипу, краснухи, кору. Навантажені антитілами часточки латексу широко застосовуються для виявлення антигенів вірусів та бактерій. Метод чутливий та нескладний у виконанні.

Реакція коаглютинації

Для цієї реакції використовують антигенний діагностикум, який отримують шляхом адсорбції антитіл на білку А клітин стафілококів. Для постановки реакції коаглютинації використовують штам *Cowan* золотавого стафілококу (рис. 16). У клітинній стінці цих бактерій міститься білок А, який має значну спорідненість до Fc-фрагменту людського та кролячого

IgG. Саме тому молекули IgG після адсорбції на клітинах стафілококів (які містять білок А) розташовані таким чином, що назовні виступають Fab-

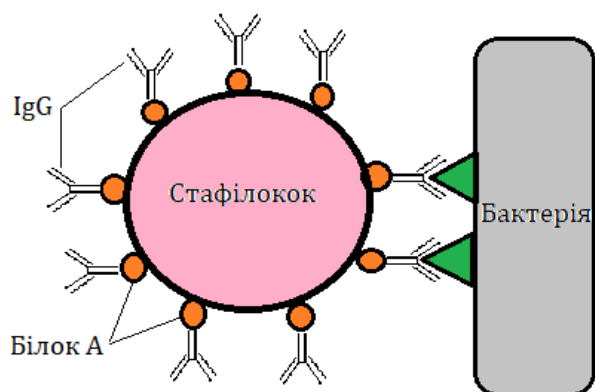


Рис. 16. Схематичне зображення складових реакції коагутинації

фрагменти (активні центри антитіл), які потім взаємодіють з антигенними детермінантами відповідних мікроорганізмів.

Як результат коагутинації утворюються пластівці, що складаються зі стафілококів, антитіл діагностичної сироватки та досліджуваного мікроба.

Пряма та непряма антиімунглобулінова реакція Кумбса

Для виявлення неповних антитіл рекомендовано використовувати *антиглобуліновий тест — пробу Кумбса*, названу на честь англійського імунолога Робіна Кумбса. У пробі Кумбса використовують антиімунглобулінову сироватку, яку отримують шляхом імунізації кроля людськими імуноглобулінами. Така сироватка містить бівалентні (повні) антитіла до людського імуноглобуліну. Тож, цей тип реакції застосовують для виявлення «неповних» (не аглютинуючих) антитіл, які утворюються під час резус-конфлікту, аутоімунних захворюваннях, алергічних станах, деяких інфекціях. *Неповними (або блокуючими)* називають антитіла, у яких функціонує лише один активний центр (тобто, вони одновалентні). Другий антиген-зв'язуючий центр у таких імуноглобулінів екранований різноманітними структурами або володіють низькою *авідністю*.

Неповні антитіла можуть зв'язувати епітопи антигену, проте не здатні агрегувати цей антиген (тобто, функціонально вони неповноцінні). Разом з тим, зв'язуючи епітопи антигену, неповні антитіла перешкоджають контактові з ними повних антитіл. Через це їх називають *блокуючими антитілами*.

Пряма реакція Кумбса

Антиглобуліновий тест проводять для виявлення неповних антитіл, які прикріпилися до поверхні еритроцитів. Досліджувану кров або виділені з неї еритроцити змішують з антиімунглобуліновою сироваткою (рис. 17).

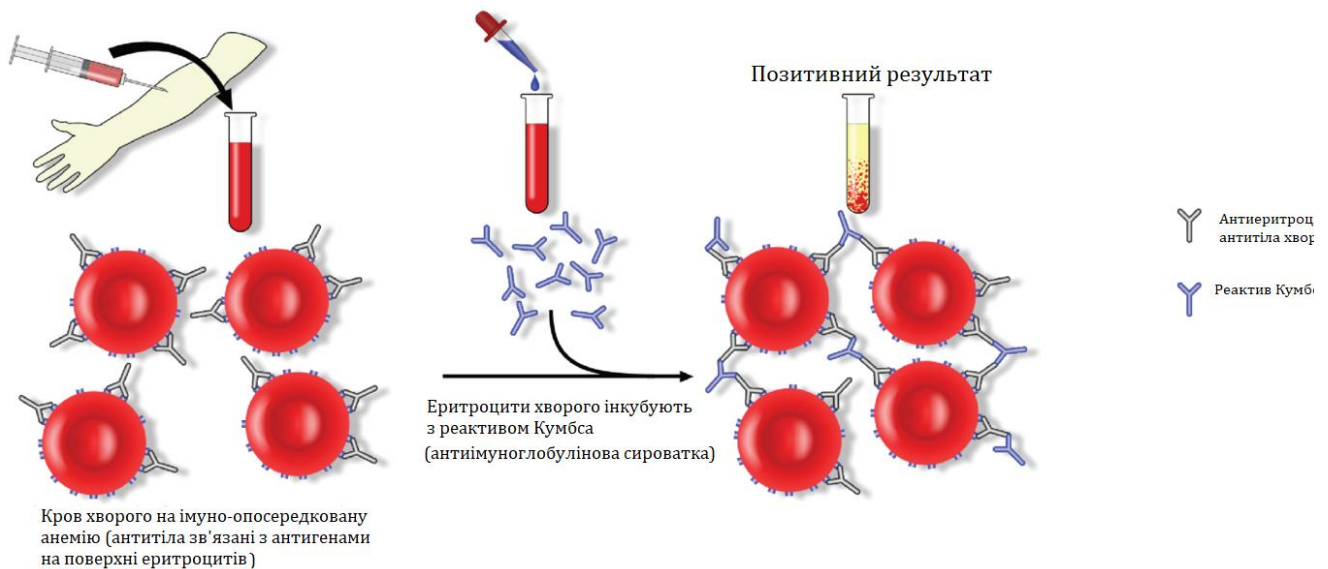


Рис. 17. Схема проведення прямої реакції Кумбса [12]

При цьому еритроцити аглютинують. Позитивна реакція Кумбса слугує основною діагностичною ознакою для підтвердження діагнозу набутої аутоімунної або медикаментозної гемолітичної анемії та гемолітичної хвороби новонароджених. У здорової людини в організмі відсутні антитіла до еритроцитів, тож нормою вважається негативна реакція Кумбса.

Непряма реакція Кумбса

Непряма реакція Кумбса застосовується для виявлення антиеритроцитних антитіл, які вільно циркулюють у сироватці крові (рис. 18).

Реакцію проводять у два етапи:

1. Спочатку до сироватки крові додають «відмиті» еритроцити донора першої групи крові (0(I)) людини. Суміш інкубують за температури 37 °С протягом 30 хвилин. За цей період відбувається адсорбція неповних антитіл із сироватки крові на нормальних еритроцитах. Надалі, еритроцити відмивають (окрім еритроцитів можна використовувати бактеріальні клітини, рикетсії).

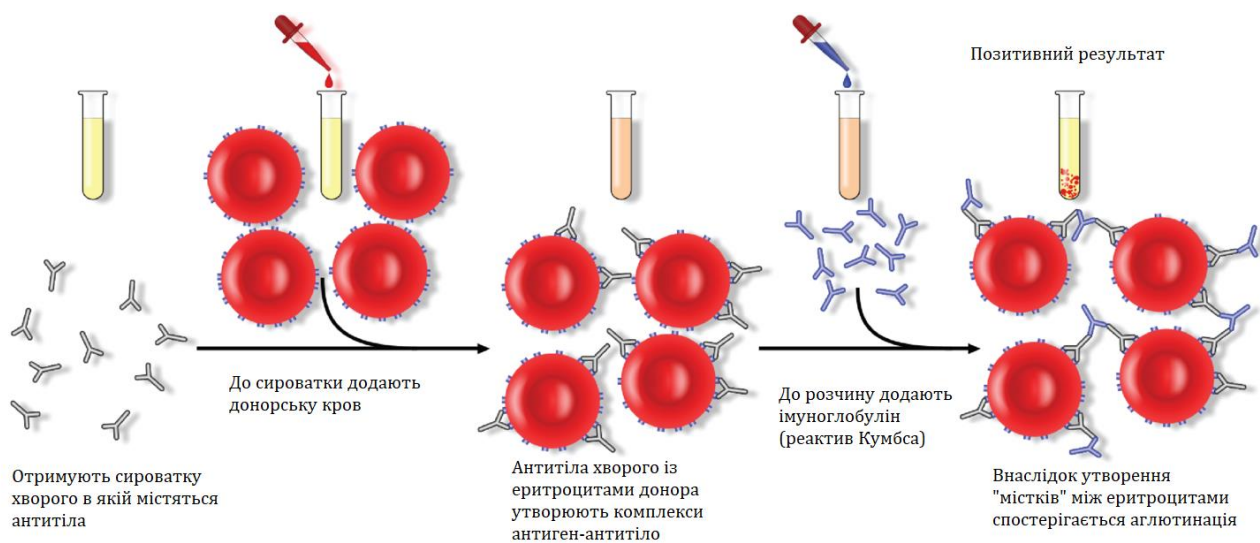


Рис. 18. Схема проведення непрямой реакції Кумбса [13]

2. Сенсibilізовані еритроцити змішують з антиімуноглобуліновою сироваткою, молекула імуноглобуліну з'єднує дві молекули неповних антитіл (фіксовані на різних еритроцитах) та настає реакція аглютинації

еритроцитів яка спостерігається вже через 10 хвилин. За допомогою цієї реакції у сироватці можна виявити неповні антитіла.

Непряма реакція Кумбса використовується під час переливання крові для виявлення сумісності донора та реципієнта. Проба на сумісність допомагає попередити будь-яку реакцію у донора. Завдяки непрямій реакції Кумбса вдається діагностувати наявність антитіл до резус-фактора у крові жінок під час вагітності.

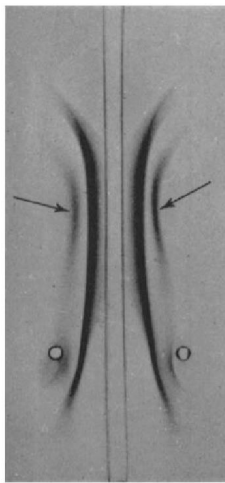
ІМУНОЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Імуноелектрофорез — це метод лабораторної діагностики, який дозволяє виявляти та ідентифікувати різноманітні білки в біологічних рідинах. Проведення імуноелектрофорезу базується на тому, що різні білки мають різний електричний заряд та розмір. Під дією електричного поля білки мігрують у гелі з різною швидкістю. По завершенні фореу вносять специфічні до досліджуваних білків антитіла. В місцях зустрічі антигену та антитіла утворюються преципітати, які можна візуалізувати.

Імуноелектрофорез застосовують у клінічній діагностиці (для підтвердження мієломи, макроглобулінемії, захворювань печінки та нирок), імунологічних дослідженнях (вивчення імунної відповіді організму на різні антигени), біотехнології (контроль якості білкових препаратів та розробки нових імунологічних методів).

Залежно від мети дослідження та типу білків, існують різні модифікації цього методу. Схематично ця процедура полягає в наступному:

спочатку проводять електрофоретичне розділення білкових антигенів у забуференому гелі агару. Після вимкнення джерела постійного струму, вздовж напрямку руху білків у електричному полі в гелі вирізають канавку, до якої вносять *преципітуючу імунну сироватку*. При цьому антиген та антисироватка дифундують на зустріч один одному й на місці їхньої взаємодії виникають дугоподібні лінії преципітації (рис. 19). Форма та розташування вказують на склад досліджуваної суміші антигенів.



А



Б

Рис. 19. Імуноелектрофореграма сироватки крові проведена для визначення субгрупи гамма-глобуліну (А) та загальний вигляд камери з блоком живлення та трафаретами (Б) [14]

Попередньо в гелі вирізають канавку до якої вносять антисироватку, стрілочками показано дугу преципітації антигенів з антитілами

Результат цього методу залежить як від перебігу електрофоретичного розділення, так і від етапу імунодифузії. Зокрема, на результат імунодифузії впливає специфічність й титр антисироватки, концентрація антигенів, розташування в гелі лунок для антигенів та канавок для антисироватки.

По завершенню імунодифузії, отриману імуноелектрофореграму

відразу фотографують у розсіяному світлі. Лінії преципітації можна контрастувати за допомогою барвника Amidoblack, Кумасі. Перед фарбуванням гель вимочують у сольовому розчині протягом 24-48 годин для відмивання білків, які не зв'язалися (сольовий розчин замінюють декілька разів). Після вимочування гель промивають дистильованою водою. Під час цієї процедури гель може відклеїтися від пластинки. Для попередження цього небажаного явища перед заливкою гелю на скляну пластинку попередньо наносять тонку плівку агару.

Після промивання (шар гелю накривають вологим фільтрувальним папером, розмір якого має бути більшим за гель), гель разом із папером висушують й надалі відокремлюють папір від висушеного гелю агару.

Для ідентифікації невідомого антигену електрофоретичну рухливість досліджуваного антигену порівнюють із рухливістю відомого чистого (такий тип ідентифікації був запропонований Оссерманом). Він передбачає внесення до однієї з канавок контрольного розчину відомого антигену. Антиген дифундує в напрямку канавки з антисироваткою, утворюючи лінію преципітації, яка розташована паралельно канавкам. У місці зустрічі контрольного антигену з ідентичним компонентом досліджуваної суміші антигенів відбувається викривлення лінії преципітації та перехід до дуги ідентичного антигену (рис. 20).

Альтернативним є **метод Гереманса** (або *метод розділеної канавки*). В основі цього методу — реакція двох різних антигенів із антисироваткою, яка містить антитіла до них обох. Досліджуваний антиген порівнюється з контрольним за електрофоретичною рухливістю й паралельно проводять реакцію на імунологічну ідентичність.

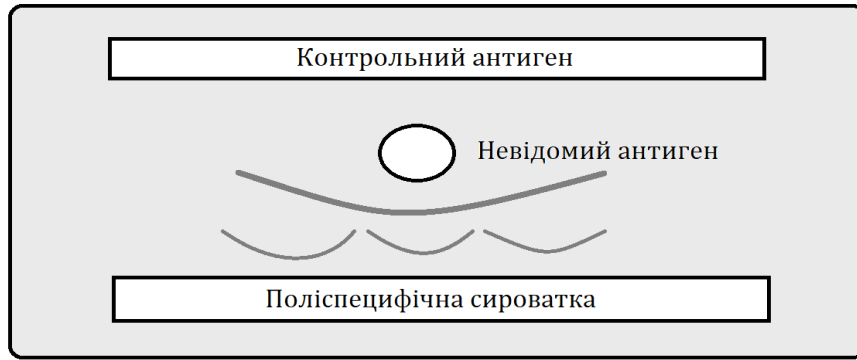


Рис. 20. Схематичне зображення результату ідентифікації за методом Оссермана

До канавки з антисироваткою поміщають перетинку з агарового гелю, розташування якої попередньо позначають. Перетинка повинна знаходитися у місці очікуваного злиття смуг преципітації досліджуваного й контрольного антигенів у випадку їхньої ідентичності. Якщо по обидві сторони перетинки будуть розташовані ідентичні або перехресно реагуючі антигени, відбудеться злиття дуг преципітації або утворення «шпори» у випадку неповної ідентичності (рис. 21).

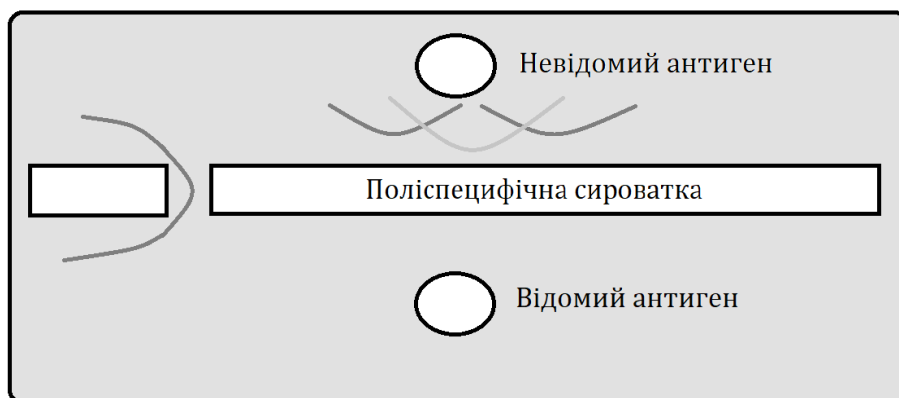


Рис. 21. Схематичне зображення результату ідентифікації антигену за методом розділеної канавки

Імуноелектрофорез є важливим інструментом для біомедичних досліджень. Він дозволяє отримати цінну інформацію про білковий склад зразків та виявити різноманітні патологічні зміни. Незважаючи на деякі обмеження, цей метод продовжує широко використовуватися в лабораторній практиці.

Імуноелектрофорез дозволяє точно визначити наявність та тип певних білків у зразку. Це особливо корисно для діагностики захворювань, пов'язаних зі змінами білкового складу, таких як мієлома, макроглобулінемія та інші. Імуноелектрофорез допомагає оцінити ступінь очищення білкових препаратів, виявляючи наявність домішок. За допомогою імуноелектрофорезу можна отримати інформацію про розмір, заряд та інші фізико-хімічні властивості білків. Деякі білкові варіанти, пов'язані з генетичними мутаціями, можуть бути виявлені за допомогою цього методу.

Перевагами цього методу досліджень є:

- Висока специфічність (дозволяє виявляти дуже малі кількості білків).
- Візуалізація результатів (утворення преципітатів дозволяє легко інтерпретувати результати).
- Відносна простота виконання, й методика не потребує складного обладнання.

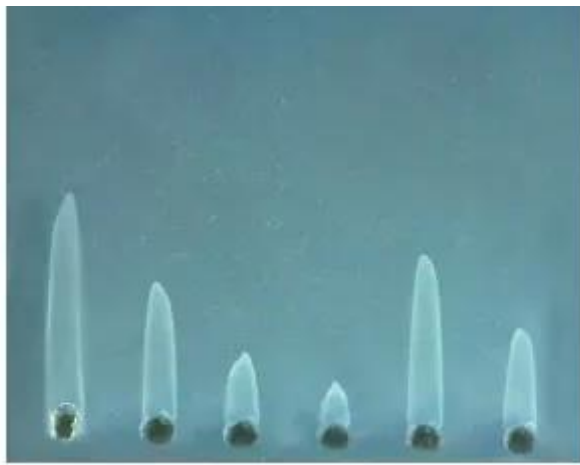
Обмеження методу полягають у відносній трудомісткості й необхідності значного часу для отримання результатів, інтерпретація результатів може бути суб'єктивною і вимагає певного досвіду.

Ракетний імуноелектрофорез

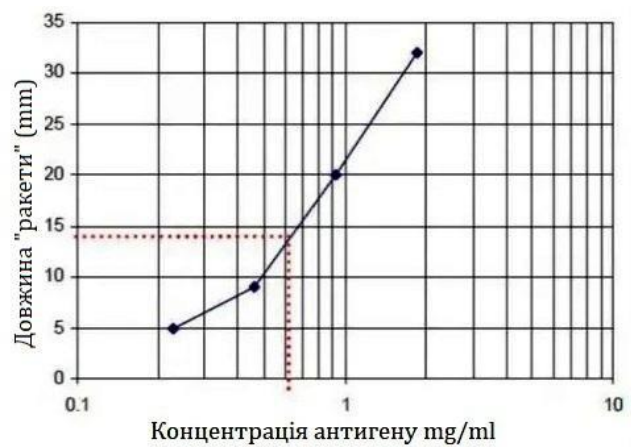
Метод ракетного імуноелектрофорезу (також називають *електроімунним аналізом, електроімунодифузією*) був запропонований у 1966 році К. Лореллом і поєднує імунодифузію за Манчіні та електрофорез. Імуноелектрофорез за Лорелом зазвичай використовують для кількісного визначення вмісту білку в біологічних рідинах. У порівнянні з імунодифузією за Манчіні, цей метод є значно швидшим. Загальна схема ракетного імуноелектрофорезу є такою: на горизонтальній поверхні заливають шар агарозного гелю, який містить моноспецифічну антисироватку. У застиглому гелі вирізають лунки та заповнюють їх досліджуваним антигеном. Антиген під дією електричного поля мігрує в гелі, який містить антитіла. рН гелю підбирають таким чином, щоб антитіла в ньому не переміщувалися та набули негативний сумарний заряд. Частіше за все використовують *вероналовий* або *барбіталовий* буфери із рН 8,6.

За умови надлишку антитіл, спочатку утворюються розчинні комплекси Ag-At. Під час електрофорезу відбувається збагачення антитілами, й коли співвідношення Ag-At досягає точки еквівалентності, нерозчинні комплекси осаджуються у формі піків схожих за обрисами на ракету. Ракетний імуноелектрофорез проводять і у зворотному порядку, коли необхідно визначити концентрацію антитіл. В цьому випадку важливо підібрати гель та рН для іммобілізації антигену, щоб не порушити його структуру та не виникало перешкод для взаємодій Ag-At. За оптимальних умов проведення аналізу формуються вузькі, з гострими кінцями преципітати. Точні вимірювання показують, що площа утворених преципітатів пропорційна концентрації антигену. Для вимірювання

довжини зони преципітації можна проводити вимірювання від середини лунки до вершини піку (рис. 22).



А



Б

Рис. 22. Загальний вигляд преципітатів, які утворюються під час ракетного імуноелектрофорезу (А) та кореляційна крива залежності концентрації й довжини «ракети» (Б) [15]

Кількісне визначення досліджуваних антигенів проводять за допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовують серію стандартних антигенів з відомою концентрацією. При цьому на вісі абсцис відкладають концентрацію антигену в лунці, ординат — довжину «ракети». Ця залежність не є лінійною, проте отримується плавна калібрувальна крива.

Облік результатів можна проводити відразу по завершенні електрофорезу на вологих препаратах. Якщо преципітати не чіткі, гель багатократно промивають сольовим розчином для елюації непреципітованих білків. Після промивання гель поміщають у дистильовану воду на 15 хвилин, потім — під прес (на 10-15 хвилин) та висушують гарячим повітрям. Висохлі пластинки гелю можна

зафарбовувати звичайними барвниками для білків, або більш специфічними.

Електросинерез (зустрічний електрофорез, електро-імуноосмофорез)

Принцип цього типу імуноелектрофорезу полягає у тому, що антиген й антитіло одночасно рухаються в гелі на зустріч один одному під дією постійного електричного струму. У результаті їхньої специфічної взаємодії утворюється лінія преципітату в товщі носія. На відміну від методу подвійної імунодифузії за Оухтерлоні, контакт антигену з антитілами відбувається не внаслідок вільної дифузії, а під впливом постійного електричного струму. Необхідною умовою для цього виду електрофорезу є наявність *моноспецифічної преципітуючої сироватки* (рис. 23).

Зустрічний електрофорез застосовують для виявлення та ідентифікації преципітуючих систем «антиген-антитіло» за умови, що антиген та антитіла мають електрофоретичну рухливість. Білки являють собою *амфоліти*: через відмінності у амінокислотному складі вони можуть мігрувати у лужному середовищі з різними швидкостями, та у різних напрямках (до аноду чи катоду). Ця властивість дає можливість їм рухатися на зустріч один одному у шарі гелю або на ацетат-целюлозній плівці. Преципітація спостерігається між стартовими лунками обох компонентів протягом 30-180 хвилин в залежності від напруги, яка подається джерелом живлення.

Зустрічний імуноелектрофорез найчастіше застосовують для виявлення та ідентифікації антитіл до *Aspergillus*, при бронхо-легеневому

аспергильозі, антигенів вірусного гепатиту В, антитіл до *Neisseria meningitides*, антитіл до кДНК при системному червоному вовчакові.

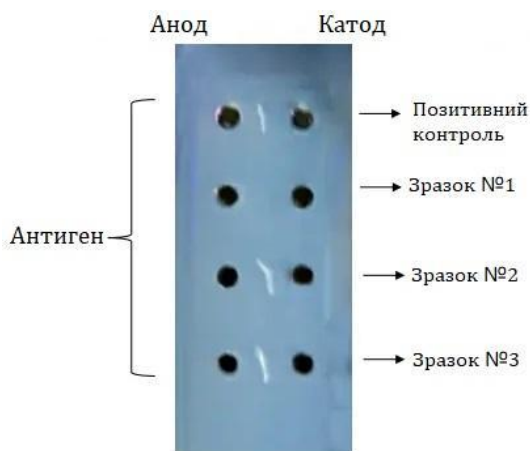


Рис. 23. Позитивна реакція у позитивному контролі, зразках №2 та 3 (смуги преципітації) після проведення ракетного імуноелектрофорезу [16]

Чутливість цього методу у декілька разів більша за метод імунодифузії (проте, при визначенні антитіл чутливість методу знижується). Переважна більшість преципітуючих антитіл належить до імуноглобулінів класу G, які володіють лиш слабким негативним зарядом при pH 8-9. Через це електроосмотичний потік зміщує IgG до катоду.

Електроендоосмос — це

електрокінетичне явище, при якому рідина рухається в напрямку катоду відносно нерухомої твердої фази, що призводить до зміщення всіх компонентів зразка та розмиття зон преципітації. Це явище значно зменшується, якщо замість агару використовувати агарозу. Якщо підібрати співвідношення агару та агарози, оптимізувати буферні розчини або увести добавки до тих же буферних розчинів, можна регулювати швидкість ендосмосу, покращити чіткість електрофореграми.

У випадку розташування поруч декількох лунок з антигеном, можна їх порівнювати між собою подібно до того, як при застосуванні методу подвійної імунодифузії. Видимі лінії преципітації утворюються протягом 1-2 годин. Надлишок реагентів видаляють, продовжуючи електрофорез після

утворення преципітатів. При цьому немає потреби відмивати гель перед фарбуванням, що дозволяє протягом 3-4 годин отримати повну картину зафарбованих смуг преципітації.

Перехресний (двомірний) імуноелектрофорез

Цей тип імуноелектрофорезу, у порівнянні з іншими імуноелектрофоретичними методами, має більшу роздільну здатність та використовується у медичній біохімії, клітинній біології, генетиці, біології розвитку.

Під час проведення перехресного імуноелектрофорезу, складну суміш антигенів попередньо (за допомогою електрофорезу) розділяють в одному напрямку, потім — в перпендикулярному шарі, який містить антитіла.

Класичний перехресний імуноелектрофорез має три ключові етапи. На першому етапі досліджувану суміш антигенів розділяють за допомогою електрофорезу в гелі агарози. Наступний етап — смугу гелю з антигенними фракціями відрізають та переносять на другу пластинку, розташовуючи з боку катоду. Вільну площу другої пластинки заливають гелем агарози, який містить поліспецифічну антисироватку. На третьому етапі, після застигання гелю, проводять електрофоретичне розділення у напрямку, перпендикулярному напрямкові першого розділення. Антитіла, які містяться в гелі, утворюють з досліджуваними білками преципітати у вигляді піків, площа яких прямо пропорційна вмісту антигенів у гелі. Усі ці етапи можна проводити на одній скляній пластинці: після форецу у першому напрямку на пластинці залишають лиш одну смужку гелю з антигенними фракціями.

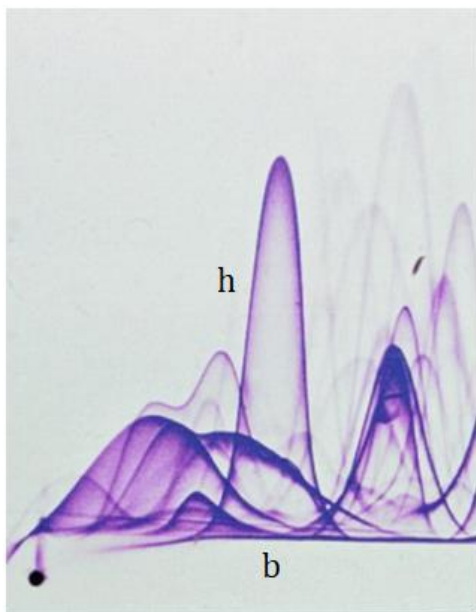


Рис. 24. Перехресний імуоелектрофорез двох мікролітрів сироватки людини [17]

Увесь інший гель видаляють, а на його місце заливають розчин агарози з антитілами та проводять другий електрофорез.

Перехресний імуоелектрофорез дозволяє оцінити якісний та кількісний склад складної суміші антигенів. На двомірних імуоелектрофореграмах антигени ідентифікують за електрофоретичною рухливістю та піку преципітації (рис. 24). Інколи цих даних недостатньо для остаточної ідентифікації антигенів. У цих випадках проводять додатковий аналіз з використанням контрольного

відомого антигену. Його додають у досліджувану суміш антигенів та за наявності у ній ідентичних антигенів, висота відповідного піку преципітації буде збільшуватися у порівнянні з висотою піку на вихідній імунограмі антигенної суміші.

Для **кількісного визначення** білків є декілька способів. Після вимірювання піків (позначено як h) та довжини його основи (b), площу піків розраховують як $S = 1/2h * b$ (див. рис. 24). Цей розрахунок застосовують лише для аналізу симетричних піків преципітації.

Якщо при перехресному імуоелектрофорезі сформувалися різко асиметричні піки, тоді їхню площу необхідно визначити, зважуючи відповідні паперові копії. Збільшене зображення імуоелектрофореграми

проектують на папір, необхідний об'єкт обводять олівцем. Після цього діаграму вирізають, зважують та порівнюють з масою діаграми стандартної суміші.

Звичайно, що існують графічні редактори для проведення цієї процедури. Результати виражають у відсотках від норми, або у абсолютних величинах. Проте швидше оцінювати пік за його висотою.

РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ

Реакція нейтралізації — це імунологічна реакція, заснована на здатності антитіл зв'язувати різноманітні мікроорганізми або їхні метаболіти (ферменти чи токсини). Після зв'язування з антитілами збудники (або токсини) втрачають свої біологічні властивості — нейтралізуються. Зазвичай ці реакції застосовують для виявлення вірусів та різноманітних токсинів.

Реакція нейтралізації дозволяє ідентифікувати невідомий виділений вірус; визначати титр віруснейтралізуючих антитіл; ідентифікувати екзотоксин, який продукує невідомий збудник; визначити активність лікувальних антитоксичних сироваток; виявити антитіла до ферментів бактерій (антистрептолізини, антистафілолізини, антистрептокінази);

Під час ідентифікації збудника використовують індикаторну систему: культуру клітин, курячі ембріони, лабораторних тварин, а також *діагностичну віруснейтралізуючу сироватку*.

Стандартну діагностичну сироватку змішують у пробірці з біоматеріалом, який містить досліджуваний вірус. Суміш витримують у термостаті певний проміжок часу. Після культивування, цією сумішшю заражають культуру клітин, курячий ембріон або лабораторну тварину. Через певний проміжок часу проводять облік результату нейтралізації. Якщо реакція позитивна — антитіла нейтралізують вірус й індикаторні об'єкти продовжують нормально існувати. Одночасно контрольні об'єкти гинуть або, внаслідок цитопатичної дії вірусу, виявляються характерні зміни. У такому разі констатуємо, що це той самий вірус, проти якого використали стандартну сироватку.

Серодіагностика вірусних захворювань

Це спосіб діагностики вірусних патогенів за наявністю у крові пацієнтів високих титрів вірус-специфічних антитіл. Під час серодіагностики вірусних інфекцій за допомогою реакції нейтралізації у сироватці крові пацієнтів виявляють антитіла, які нейтралізують відомий вірус. Для цього необхідно отримати досліджувану сироватку, культуру клітин із відомим вірусом, індикаторний об'єкт (рис. 25).

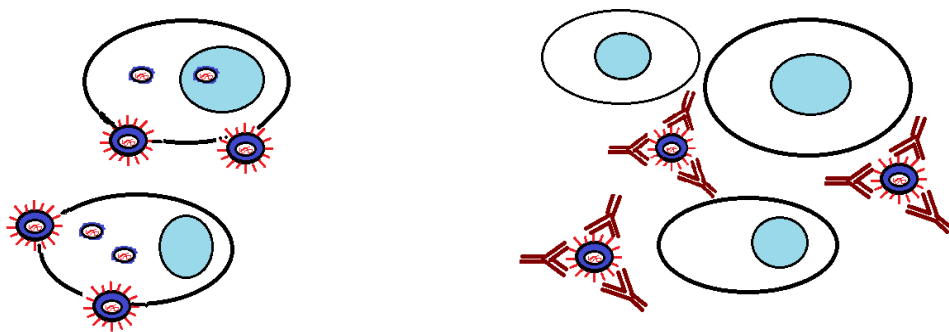


Рис. 25. Реакція нейтралізації вірусів у культурі клітин. Зліва – цитопатичний ефект (як наслідок розмноження вірусів). З правого боку — вірус був гнйтралізований антитілами, цитопатичний ефект відсутній

Під час проведення цієї реакції враховують те, що противірусні антитіла продукуються повільно, реакцію нейтралізації проводять у динаміці із парними сироватками. Одну із цих сироваток беруть у розпал захворювання, іншу — через 2-3 тижні. За наявності наростання титру антитіл у останній сироватці (понад 4 рази) говорять про підтверджене інфікування даним вірусом.

Ідентифікація токсинів

При деяких інфекційних захворюваннях, збудники яких продукують екзотоксини, використовують реакцію нейтралізації токсину антитоксином.

Реакція нейтралізації токсинів дозволяє ідентифікувати бактеріальні екзотоксини за їх видовою або типовою належністю. Для проведення реакції нейтралізації токсину антитоксином досліджуваний матеріал (у якому очікують наявності токсину) змішують із відповідною антитоксичною сироваткою та, після інкубації в термостаті, уводять білим мишам або мурчакам. Контрольним тваринам обов'язково уводять тільки досліджуваний матеріал. Якщо антитоксична сироватка нейтралізує токсин — піддослідні тварини залишаються живими. Тварини із контрольної групи гинуть від дії уведеного токсину. Ця реакція застосовується для виявлення токсинів збудників ботулізму, правця, гангрени (рис. 26).

Реакція нейтралізації токсину антитоксином має величезне практичне значення як метод визначення активності антитоксичних лікувальних сироваток. У цій реакції антигеном є справжній *екзотоксин*.

Для цієї мети часто використовується реакція нейтралізації за механізмом флокуляції.

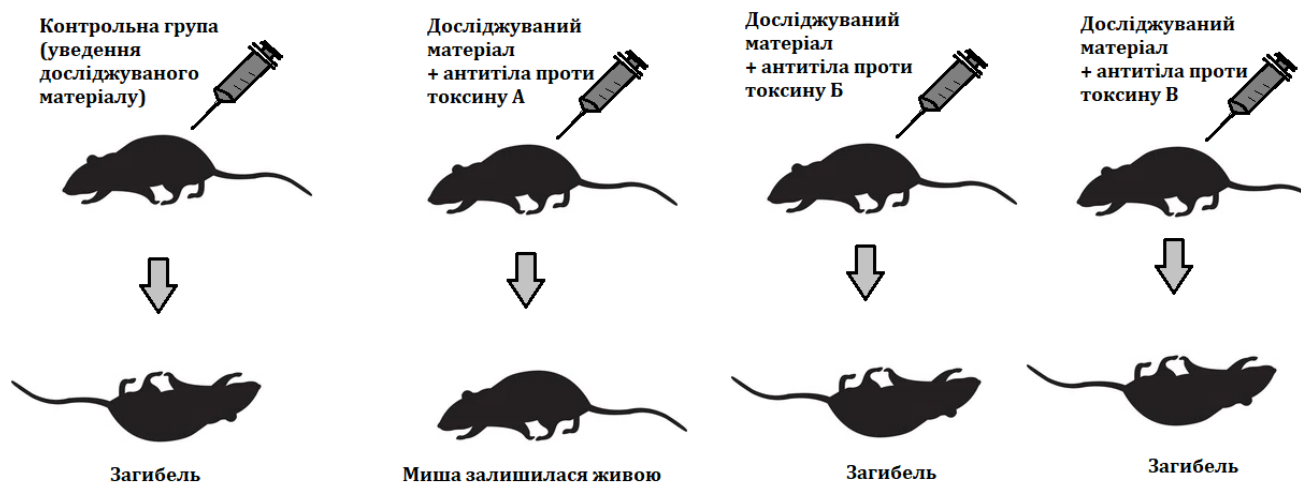


Рис. 26. Реакція нейтралізації токсину *in vivo*

Як результат взаємодії токсину (або анатоксину з антитоксичною сироваткою) випадають пластівці *флокулянту*. Найбільш інтенсивна флокуляція відбувається у пробірці, в якій антиген та антитіла містяться у еквівалентних співвідношеннях (тобто, кількісний вміст токсину відповідає кількості міжнародних одиниць сироватки). Перевагами реакцій нейтралізації є їхня універсальність та висока специфічність. Вагомим недоліком цієї реакції є значна трудомісткість, суворе дотримання стерильності матеріалів, велика вартість утримання лабораторних тварин і культури клітин, відносно тривалий час проведення дослідження.

РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

Починаючи із 1901 року Ж. Борде та О. Жангу першими почали використовувати **реакції зв'язування комплекменту** з різноманітними за природою комплексами антиген-антитіло.

Особливість цієї реакції полягає в тому, що природа антигену (корпускулярний чи розчинний), який приймає в ній участь, не має значення. Це відбувається через те, що *білки системи комплекменту зв'язуються із Fc-фрагментом будь-якого антитіла* (як IgM, так і IgG) (рис. 27).

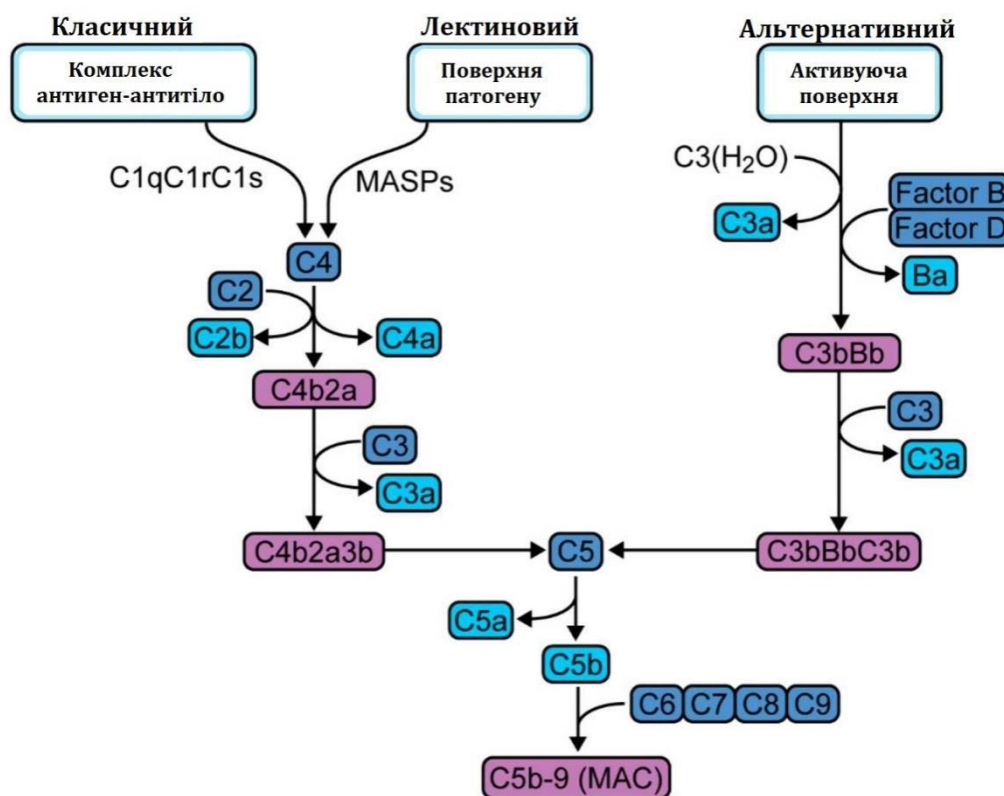


Рис. 27. Шляхи активації комплекменту [18]

IgM й IgG у складі імунного комплексу набувають здатності зв'язувати C1q-субкомпонент першого компоненту комплементу, що спричиняє послідовну активацію інших білків системи «класичним шляхом». Наслідки активації системи комплементу зумовлені природою антигену. Збирання мембраноатакуючого комплексу (C5b — C9) обумовлює гемоліз та лізис деяких грамнегативних бактерій (рис. 28).

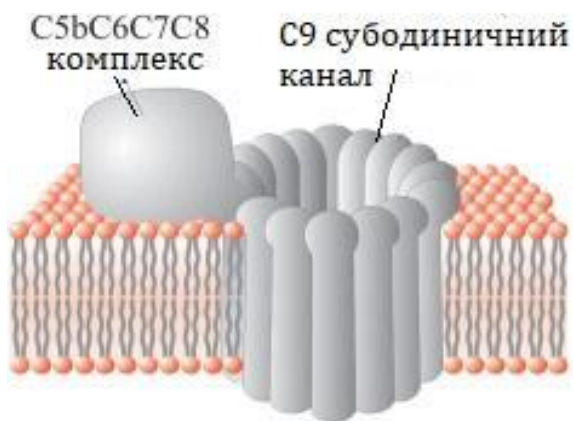


Рис. 28. Мембраноатакуючий комплекс комплементу [19]

Якщо в імунному комплексі антиген представлений розчинними сполуками, а також грампозитивними бактеріями, то такий комплекс не спричиняє видимих наслідків. Після зв'язування з імунним комплексом білки комплементу вже не здатні спричинити лізис сенсibilізованих еритроцитів. У зв'язку із тим, що зв'язування комплементу візуально не проявляється, Ж. Борде та О. Жангу

запропонували використовувати в якості індикатора гемолітичну систему, яка складається із еритроцитів барана та гемолітичної сироватки. Якщо утворення імунного комплексу не відбувається — білки комплементу адсорбуються на іншій системі, спричиняючи гемоліз еритроцитів, що видно неозброєним оком.

Реакція зв'язування комплементу вважається складною серологічною реакцією. У цій реакції беруть участь білки системи комплементу та дві системи антиген-антитіло. Для проведення цієї реакції необхідним є п'ять складових (таблиця 2).

**Складові реакційної суміші для проведення
реакції зв'язування комплементу**

Перша система (діагностична)	Друга система (індикаторна)
антиген (лізат, екстракт, завись)	антиген (еритроцити барана)
антитіла (досліджувана сироватка)	антитіло (гемолізін до еритроцитів барана)
комплемент	

Спочатку сироватку пацієнта змішують з відомим антигеном і комплементом. Якщо в сироватці є антитіла до антигену, утворюється комплекс «антиген-антитіло», комплемент з ним зв'язується.

Після інкубації додається суміш баранячих еритроцитів і гемолітичної сироватки. Гемолітична сироватка містить антитіла проти баранячих еритроцитів.

Якщо комплемент зв'язався з імунними комплексами на першому етапі, його не вистачить для реакції з еритроцитами, і гемоліз не відбувається (негативний результат).

Якщо антитіл немає, комплемент вільний і спричиняє гемоліз еритроцитів (позитивний результат).

Інтерпретація результатів здійснюється наступним чином (рис. 29):

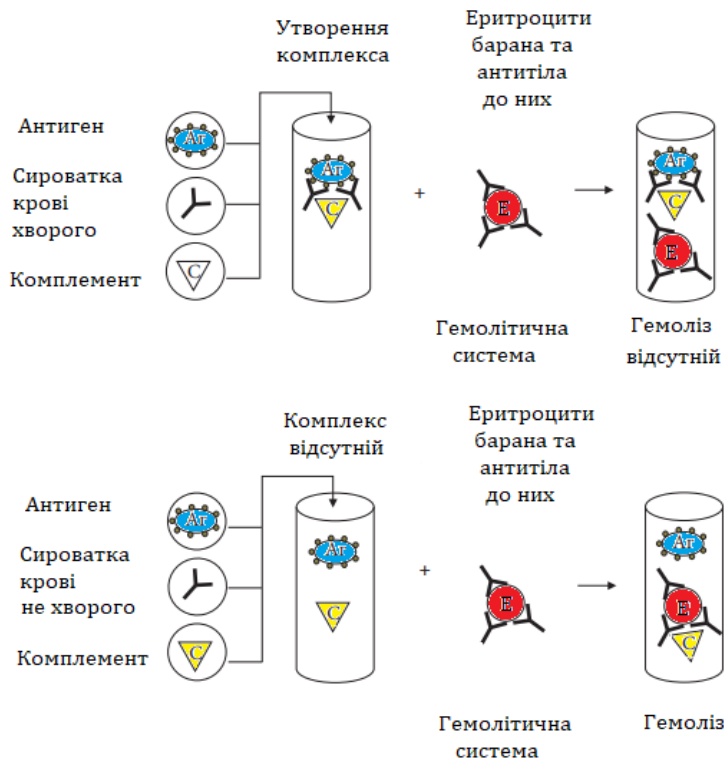


Рис. 29. Схема реакції зв'язування комплементу (зверху використано сироватку пацієнта з інфекційним захворюванням)

обумовлюють лізис клітин, називають *лізинами*; якщо вони зв'язуються з еритроцитами — *гемолізинами*. Гемолізینی здатні проявляти свою лікуючу дію на еритроцити тільки за наявності комплементу.

Для контролю необхідно одночасно проводити реакції за однакових умов з нормальною та позитивною сироватками. Антигеном для постановки реакції можуть бути культури різноманітних інактивованих мікробів, мікробні лізати, компоненти бактерій, екстракти з патологічно змінених та нормальних органів і тканин.

- гемоліз відсутній: реакція позитивна (антитіла присутні в сироватці).
- гемоліз наявний: реакція негативна (антитіл немає).

Цей метод застосовують для діагностики інфекційних захворювань, таких як сифіліс, токсоплазмоз, або для перевірки на наявність специфічних антитіл.

Специфічні антитіла, які

Отже, для постановки реакції зв'язування комплементу необхідно мати такі компоненти:

1. Сироватка, яку досліджують, інактивована при 56 °С протягом 30 хв на водяній бані.
2. Антиген, який самостійно не викликає гемоліз (завись бактерій або екстракт з них).
3. Комплемент у робочій концентрації, визначеній титруванням.
4. Гемолітична сироватка в дозі, відповідна потроєному титрові.
5. 3% завись баранячих еритроцитів.
6. Фізіологічний розчин.

Облік результатів проводять за методом чотирьох плюсів (таблиця 3).

Таблиця 3.

Облік результатів реакції зв'язування комплементу

Позначення	Опис
++++	Повністю (100 %) відбулося зв'язування антигену антитілами та утворення комплексів «антиген + антитіло + комплемент». Повна затримка гемолізу: після центрифугування у пробірці залишається осад з еритроцитів, супернатант прозорий, без кольору.
+++	75% зв'язування антигену антитілами. Певна частина комплементу залишилася у вільному вигляді та інактивується гемолітичною системою. Спостерігається виражена зупинка гемолізу: після центрифугування, на дні пробірки видно осад з еритроцитів, супернатант має злегка жовте забарвлення через лізис еритроцитів.

++	50% зв'язування антигену антитілами. Половина комплементу перебуває у вільному стані та спричиняє гемоліз майже половини еритроцитів індикаторної системи. Фіксується часткова затримка гемолізу (після центрифугування на дні пробірки спостерігається осад еритроцитів, супернатант інтенсивно забарвлений у червоно-помаранчевий колір.
+	Сумнівний результат. Надто слабка затримка гемолізу: після центрифугування на дні пробірки видно незначний осад еритроцитів, супернатант зафарбований так само, як і при негативній реакції зв'язування комплементу.
-	Негативний результат реакції. Відбувається повний гемоліз. Після центрифугування на дні пробірки осад відсутній, вміст пробірки являє собою прозорий червоно-помаранчевий розчин (т. зв. «лакова кров»).

Реакція зв'язування комплементу має високу чутливість, що дозволяє зафіксувати утворення імунного комплексу в тих випадках, коли видимі прояви реакції «антиген-антитіло» (преципітація, аглютинація або флокуляція) відсутні. У цій реакції можуть бути використані як розчинні, так і не розчинні антигени. Завдяки високій чутливості (у 100-200 разів перевищує чутливість реакції преципітації) цей метод використовують для аналізу системи із низьким вмістом антигенів та антитіл. Цю реакцію застосовують переважно для діагностики інфекційних захворювань.

Реакція радіального гемолізу

Ще одним варіантом реакції зв'язування комплементу є реакція радіального гемолізу. Її проводять у гелі агару, в якому містяться баранячі еритроцити та комплемент. У застиглому шарі гелю роблять лунки та вносять до них гемолітичну сироватку (антитіла проти баранячих еритроцитів). Як результат радіальної дифузії антитіл, навколо лунок утворюються зони гемолізу. При цьому радіус зони гемолізу прямо пропорційний титру сироватки (рис. 30). Таким чином можна визначити

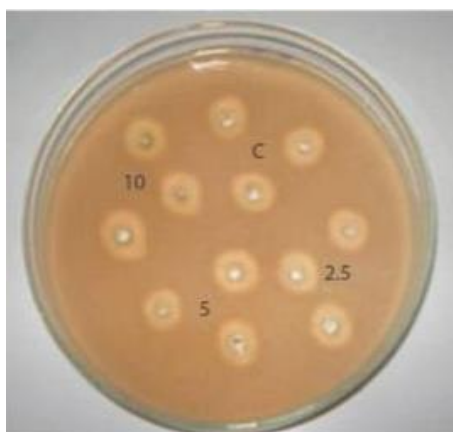


Рис. 30. Приклад реакції радіального гемолізу спричиненого антитілами [20]

активність гемолітичної сироватки. Для визначення активності комплементу за допомогою реакції радіального гемолізу в лунки гелю, який містить баранячі еритроцити (попередньо сенсibilізовані антитілами), додають досліджувану та нормальну сироватки у різних розведеннях. Навколо лунки, яка містить активний комплемент, утворюється зона гемолізу, діаметр якої пропорційний кількості комплементу в досліджуваній сироватці.

Цей метод дозволяє визначити загальну активність компонентів класичного шляху активації комплементу. Проте, якщо у сироватці виявляється дефіцит комплементу, реакція радіального гемолізу не дозволяє з'ясувати відсутність якого компонента обумовила дефіцит. На сьогодні, ця реакція використовується рідко, переважно у серодіагностиці для виявлення антитіл проти збудників

вірусних інфекцій. При цьому, до гелю вносять комплемент та баранячі еритроцити з адсорбованими відповідними антигенами (наприклад, глікопротеїновий гемаглютиніни вірусу грипу, кліщового енцефаліту і т. д.).

До лунок вносять досліджувану сироватку крові. Антигемаглютинінові антитіла сироватки крові, дифундуючи в гель, взаємодіють із вірусними антигенами на еритроцитах. Після цього, до комплексу «антиген + антитіло» приєднується комплемент, що завершується активацією системи комплементу та гемолізом. Реакція радіального гемолізу в гелі застосовується для діагностики вірусних інфекцій завдяки простоті виконання та відсутності чутливості до сироваткових інгібіторів.

Реакція «імуного прилипання»

Це специфічна імунологічна реакція, яка настає в результаті утворення комплексу «антиген + антитіло» та його взаємодії з рецепторами тромбоцитів й еритроцитів, проявляється утворенням аглютинатів.

Реакція «імуного прилипання» заснована на активації системи комплементу корпускулярними антигенами, які оброблені імуною сироваткою. Якщо до антигену (наприклад, вірусу, бактерії) додати відповідну імуною сироватку та комплемент, то спочатку утворюється комплекс «антиген + антитіло». До утвореного комплексу потім приєднується та активується комплемент. Як результат формується активований компонент комплементу C3b, який приєднується до корпускулярного антигену у складі імуного комплексу.

Еритроцити, тромбоцити та інші клітини крові мають на поверхні рецептори до C3b. При змішуванні цих клітин з імуними комплексами,

завдяки компоненту комплементу C3b, відбувається взаємодія комплексу «антиген + антитіло + комплемент» з індикаторними клітинами. Це супроводжується їх аглютинацією. Результат реакції оцінюють мікроскопічно шляхом підрахунку відсоткового вмісту еритроцитів, які приєдналися до корпускулярного антигену, який було сенсibilізовано антитілами й комплементом. Також, визначають характеру осаду еритроцитів, як у випадку реакції пасивної аглютинації. Реакція імунного прилипання застосовується для визначення антигенних властивостей бактерій, вірусів, лейкоцитів; для визначення активності різноманітних антитіл та антигенів *in vitro*, комплементу; для визначення антигенів головного комплексу гістосумісності.

Реакція імунного прилипання використовувалася раніше в серологічній діагностиці для виявлення антитіл до різних збудників інфекційних захворювань. Наприклад, її застосовували для діагностики рикетсіозів (зокрема, реакція Вейля-Фелікса, за якої використовували бактерії *Proteus*, які мають антигенну спорідненість з рикетсіями) та деяких бактеріальних інфекцій.

Однак, з розвитком більш чутливих та специфічних методів імунодіагностики, таких як **імуноферментний аналіз (ІФА)** та **полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)**, реакція «імунного прилипання» втратила своє широке практичне застосування в рутинній діагностиці.

РЕАКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ МІТОК

Радіоімунний аналіз

Радіоімунний аналіз (RIA) вперше провели Р. Ялоу та С. Берсон для виявлення ендогенного інсуліну у плазмі крові людини. Цей метод дозволяє кількісно визначати у біологічних рідинах вміст гормонів, ферментів, лікарських засобів. Основою методу є конкурентне зв'язування досліджуваних сполук зі специфічними, міченими радіонуклідами антитілами.

Чутливість RIA надзвичайно висока. Можливо виявити концентрації речовин до 14 моль/л. Ця чутливість є важливою під час вимірювань концентрацій пептидних гормонів, наркотичних засобів, лікарських препаратів, ферментів, бактеріальних та вірусних антигенів. Специфічність радіоімунного аналізу визначається специфічністю антитіл. Найчастіше в якості радіоактивної мітки використовують ізотопи йоду (^{125}I) та тритію (^3H). Мічені тритієм сполуки достатньо стійкі, оскільки період напіврозпаду ізотопу сягає 12 років. Проте, під час роботи з міченим тритієм, необхідно проводити додаткову підготовку зразків перед вимірюванням β -випромінювання *рідинним сцинтиляційним лічильником*. Через низьку активність таких сполук необхідно збільшувати час реєстрації для проведення цього аналізу.

Використання ізотопів йоду дозволяє отримати сполуки з високою питомою радіоактивністю. Разом з тим, у порівнянні із β -випромінюванням, реєстрацію γ -випромінювання проводити легше. Включення I^{125} у сполуки з низькою молекулярною масою спричиняє зміни їхньої молекулярної

структури, що значно впливає на імуногенність цієї сполуки. Для вимірювання випромінювання радіоактивної мітки використовують *радіометри*. Підрахунок радіоактивних імпульсів у контрольних та досліджуваних зразках відбувається протягом певного проміжку часу (зазвичай 1 хв). Під час аналізу результатів реакції необхідно враховувати наявність радіоактивного фону, що також може вплинути на кінцевий результат. Підвищення фону можуть бути спричинені забрудненням контейнеру, некоректним налаштуванням приладу або навіть джерелом випромінювання поблизу детектора. В залежності від техніки проведення існує кілька основних способів радіоімунного аналізу: *рідинний та твердофазний*.

Рідинний конкурентний РІА

В основі методу лежить феномен конкуренції досліджуваного антигену з відомою кількістю мічених антигенів за обмежену кількість специфічних до антигену антитіл. Чим більше у досліджуваній рідині міститься досліджуваного антигену, тим менше мічених антигенів зв'язується з антитілами, відповідно їх більше залишиться в розчині.

Головні компоненти тест-системи для РІА:

1. Антиген, мічений та немічений радіоізотопом антигени.
2. Антитіла до досліджуваного антигену.
3. Стандартні контрольні зразки.
4. Система відокремлення вільного антигену від утвореного імунного комплексу.

Методика проведення конкурентного РІА проводиться у 4 етапи.

1. До розчину антитіл додають мічений антиген та пробу, які містять невідому кількість певного антигену. Концентрацію антитіл у реакційній

суміші підбирають таким чином, щоб число місць зв'язування було набагато менше загальної кількості антигенів. Концентрація міченого антигену повинна перевищувати максимально можливу концентрацію досліджуваного антигену у пробі. Чіткого універсального співвідношення немає, тому що воно залежить від афінності антитіл, валентності антигенів, типу імунологічної реакції, цілей досліджу. Зазвичай користуються співвідношенням від 1:10 до 1:1000, залежно від мети реакції.

2. Реакційну суміш інкубують за певної температури. Мічений та немічений антигени конкурентно зв'язується з антитілами, при цьому утворюються імунні комплекси з цим антигеном. Таким чином, наприкінці інкубації, у реакційній суміші присутні мічені та немічені імунні комплекси, а також вільні мічені та немічені антигени. Кількість мічених імунних комплексів зворотно пропорційна кількості неміченого антигену в пробі.

3. Для того, щоб оцінити кількість мічених імунних комплексів, їх необхідно відділити від вільного міченого антигену. Найбільш поширеними є декілька способів розділення:

- до реакційної суміші додають сполуку, яка підвищує її щільність (поліетиленгліколь);
- до реакційної суміші додають сполуку з великою молекулярною масою, яка специфічно зв'язується з антитілами у складі імунних комплексів (з цією метою використовують вторинні антитіла або стафілококовий білок А).

В обох випадках імунні комплекси (які мають більшу молекулярну масу, ніж вільні антигени), осаджують центрифугуванням та після цього вимірюють радіоактивність осаду. При цьому, концентрацію антигену в пробі визначають за калібрувальним графіком (будують із використанням

калібрувальних розчинів з відомими концентраціями неміченого антигену).

Твердофазний РІА

Цей тип аналізу передбачає іммобілізацію одного з імунореагентів на твердому носії. В якості твердої фази використовуються полістиролові кульки або пробірки.

Неконкурентний твердофазний РІА передбачає, що до зв'язаних антитіл додають досліджуваний антиген. Під час інкубації на сорбенті утворюються комплекси антиген-антитіло. Сорбент відмивають від вільних компонентів та додають мічені радіоізотопом антитіла, які зв'язуються з вільними епітопами антигену у складі комплексу. Величина радіоактивності пропорційна концентрації досліджуваного антигену.

Конкурентний твердофазний РІА

Принцип цього методу полягає у конкуренції антигенів (досліджуваного та міченого) за приєднання до адсорбованих на сорбенті антитіл. Спочатку, до реакції уводять досліджуваний антиген. Відбувається утворення комплексів антиген-антитіло на поверхні сорбенту. Сорбент промивають, після чого додають мічений антиген. Чим вищим є вміст досліджуваного антигену, тим менше міченого імунореагенту зв'яжеться з поверхнею сорбенту. Концентрацію міченого антигену визначають шляхом вимірювання реакційної суміші за допомогою радіометру. Величина радіоактивності реакції зворотно пропорційна концентрації антигену у досліджуваний пробі.

Іммунорадіометричний аналіз (ІРА)

Це високочутливий і специфічний метод лабораторної діагностики, який використовується для кількісного визначення різноманітних речовин у біологічних рідинах, таких як кров, сеча, спинномозкова рідина тощо. Цей метод базується на взаємодії антигену (речовини, яку ми хочемо визначити) з антитілом, міченим радіоактивною ізотопною міткою.

Яскравим прикладом цього аналізу є *радіоалергосорбентний тест*, розроблений для виявлення IgE у сироватці крові. Для цього алерген сорбується на пористому матеріалі (папір, полімерні мембрани, полімерні мікрокапсули, целюлозні губкоподібні кульки, целюлозні або магнітні мікросфери). Після цього додається сироватка крові пацієнта з подальшим інкубуванням протягом 3 годин, відмивання та внесення міченої радіоактивним ізотопом антиглобулінової сироватки (анти-IgE). По завершенню відмивання незв'язаних реагентів, радіоактивність обліковується за допомогою лічильника.

Спочатку цей тест мав дуже низьку чутливість, через що мав обмежене використання. На сьогодні використовують аналіз третього покоління із застосуванням моноклональних антитіл проти IgE, які посилюють чутливість і специфічність результатів.

Наприклад, радіоімунний аналіз вважається найбільш інформативним для оцінки функціонального стану щитоподібної залози. За його допомогою можна визначити рівень тиреоїдних гормонів у крові. Існує величезна кількість комерційних *імуносорбентів*, за допомогою яких можна визначати у сироватці крові рівні тиреотропного гормону, трийодтироніну, тироксину, тиреотропін-релізінг-гормону, тиреоліберину й тиреокальцитоніну.

Радіоімунний аналіз дозволяє діагностувати злоякісні новоутворення на ранніх стадіях, виявляє онкомаркери. Цей тип аналізу можна використовувати у діагностиці захворювань серцево-судинної системи, для встановлення концентрації імуноглобулінів, ферментів. Разом із перевагами цього методу є недоліки, зокрема, обмежений період життя радіоактивної мітки й застосування спеціальних заходів безпеки.

Радіоімунний аналіз залишається одним з найбільш чутливих і специфічних методів визначення різних речовин, проте його застосування обмежено через ряд недоліків. Сучасні альтернативні методи імунохімічного аналізу дозволяють подолати ці обмеження і забезпечують більш безпечно, швидке та ефективно проведення досліджень.

Флуоресцентний імунний аналіз

Цей тип реакції (ще називають *методом Кунса*) полягає в тому, що антигени тканин, мікробні клітини, оброблені імунними сироватками (які містять антитіла, кон'юговані з *флуорофорами*) під дією ультрафіолетового випромінювання флуоресцують. Існують різновиди цього виду аналізу: *прямий, непрямий* та з *комплементом*. Під час проведення флуоресцентного імунного аналізу необхідно після кожної операції проводити промивання для видалення незв'язаних компонентів.

Прямий метод полягає у виявленні антигену за допомогою міченої флуорохромом імунної сироватки. Досліджуваним матеріалом (*антигеном*) у цьому випадку можуть бути гриби, культури бактерій, зрізи тканин, біоматеріал від хворих, інфіковані культури клітин. Наступним компонентом є специфічна імунна сироватка з антитілами (кон'югат, тобто

кон'юговані із флуоресцентним барвником антитіла) до досліджуваного антигену, фізіологічний розчин.

На фіксований препарат наносять кон'югат й інкубують певний проміжок часу. Надалі препарат відмивають від незв'язаного кон'югату, висушують на повітрі, наносять імерсійну олію (яка не має власної флуоресценції) та досліджують під люмінесцентним мікроскопом.

На тій ділянці, на якій локалізуються комплекси Ag-At, спостерігається флуоресценція. Після обробки такою сироваткою, краї бактерій у мазку світяться зеленим кольором. Частіше за все, прямий метод флуоресцентного імунного аналізу використовують для ідентифікації невідомого антигену. Недоліком цього методу є необхідність мати окремі набори для діагностики кожного виду досліджуваного збудника інфекції.

Непрямий метод флуоресцентного імунного аналізу полягає у виявленні комплексу Ag-At з використанням мічених флуорохромом антитіл — вторинних протиантитіл.

Спочатку на фіксовані мазки із мікробів наносять немічену специфічну сироватку. За наявності відповідного антигену, антитіла прикріплюються до нього.

Наступний етап — на препарат наносять кон'юговану із флуорохромом антисироватку (мічені вторинні антитіла). Ці вторинні антитіла взаємодіють із Fc-фрагментами первинних антитіл (які для них і є антигенами). Як результат, утворюється комплекс бактерій, антибактеріальних антитіл та вторинних антитіл із флуорохромом. Цей комплекс візуалізується за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

У порівнянні із прямим методом, непрямий є більш чутливим, оскільки з кожною молекулою первинних антитіл зв'язується декілька

молекул вторинних антитіл, зв'язаних із флуоресцентною міткою. З метою посилення флуоресценції, в якості вторинних антитіл використовують неповноцінні антитіла (кон'юговані Fab-фрагменти із флуоресцентною міткою) (рис. 31). Це обумовлено тим, що Fab-фрагменти в порівнянні із повноцінними антитілами, меншого розміру та легше зв'язуються з антигенним епітопом. Цей підхід дозволяє в декілька разів збільшити кількість молекул флуорохрому.

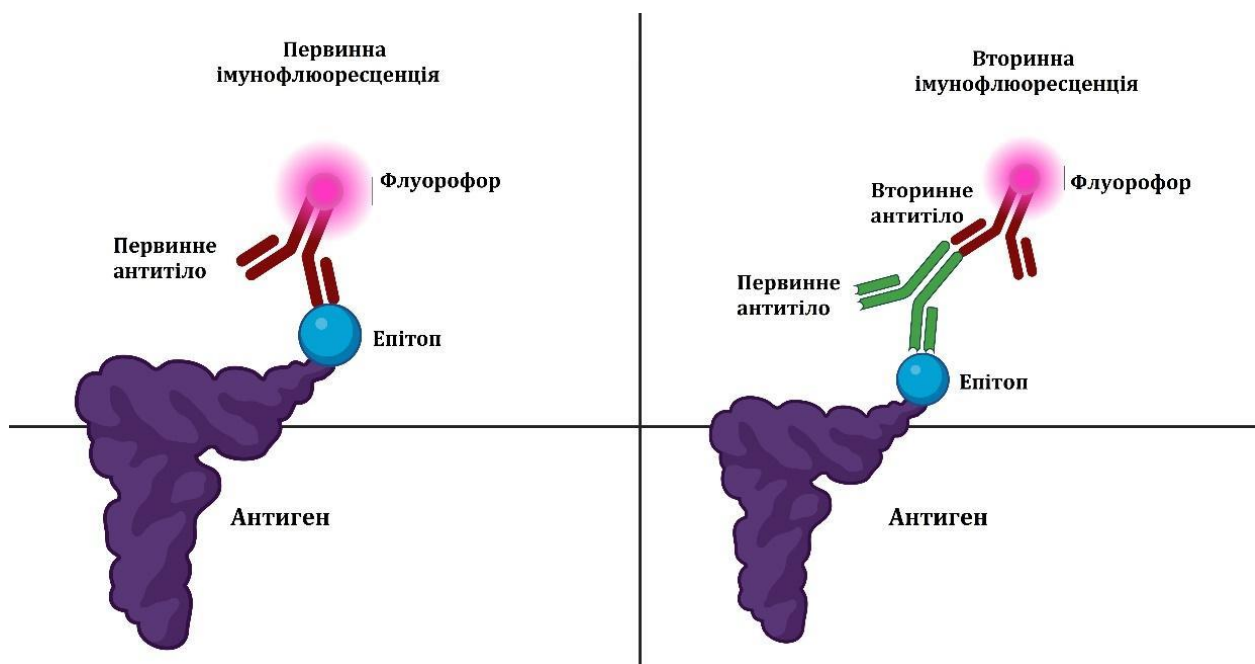


Рис. 31. Схематичне зображення реакції імунофлуоресценції [21]

Використання моноклональних антитіл дозволяє значно покращити специфічність реакції. За допомогою непрямого методу флуоресцентного аналізу можна виявляти антитіла у сироватці крові, антигени в культурі клітин, зрізах тканин. Непрямим методом також визначають титр досліджуваних антитіл. Крім того, за допомогою цього методу можна виявляти антигени різних вірусів.

Флуоресцентний імунний аналіз із додаванням комплементу

Ще однією модифікацією флуоресцентного імунного аналізу є додавання комплементу. Принцип методу полягає в тому, що на фіксований препарат наносять інактивовану *нефлуоресцентну* специфічну сироватку та комплемент, витримують деякий час і промивають. Для виявлення комплексу «антиген-антитіло-комплемент» на препарат наносять флуоресцентну антикомплементарну сироватку. По завершенню реакції та висушування, препарат досліджують за допомогою люмінесцентного мікроскопа з використанням нефлуоресцуючої імерсійної олії.

Цей тип дослідження належить до експрес-методів діагностики, оскільки дозволяє отримати результат протягом декількох годин. В основному, флуоресцентний імунний аналіз використовують для діагностики вірусних захворювань тварин.

Поляризаційний флуоресцентний імуноаналіз (ПФІА)

Даний тип імуноаналізу належить до гомогенних методів та заснований на явищі поляризації флуоресценції. Це обумовлено одночасним проходженням у розчині процесів поглинання і випромінювання світла молекулами флуорохрому та їхнім обертанням. Під час опромінення реакційної суміші поляризованим світлом, ступінь поляризації залежить від того, чи перебуває флуорофор у вільному стані (значна швидкість обертання молекули, знижена залишкова поляризація), або у комплексі з антитілом (знижена швидкість обертання великого комплексу, значна поляризація), що дозволяє вимірювати концентрацію досліджуваної сполуки у пробі.

Метод ПФІА має високу чутливість та специфічність, добре відтворюється, для нього відсутня рутинна пробопідготовка. Мічений флуоресцентним барвником антиген називають *трейсером*. Флуоресцентні мітки ковалентно зв'язуються з антигеном. У якості мітки зазвичай використовують флуоресцеїн, який поглинає блакитне світло та флуоресцює зеленим кольором.

Збільшення поляризації флуоресценції трейсера відбувається при його зв'язуванні з антитілами. Час життя молекули у збудженому стані лише декілька наносекунд, проте його достатньо для повороту молекули на певний кут. Ступінь поляризації пропорційна куту повороту молекул за період між збудженням та випромінюванням (рис. 32, 33).

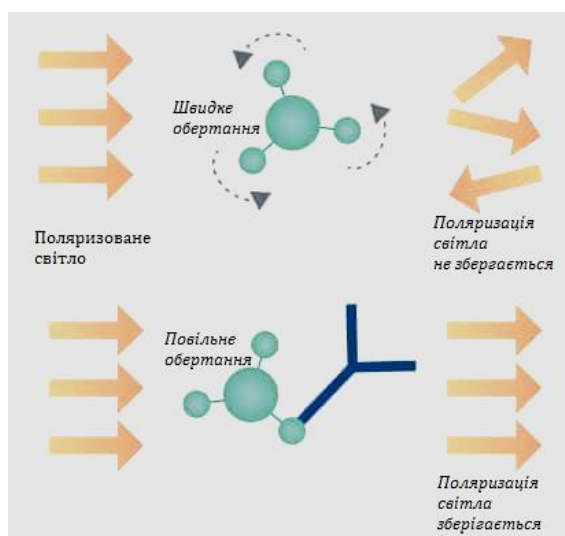


Рис. 32. Принцип поляризаційного флуоресцентного імуноаналізу [22]



Рис. 33. Загальний вигляд флуоресцентного мультимодального рідера [23]

Час, необхідний для повороту молекули на певний кут, є періодом *поворотної релаксації*. Період поворотної релаксації молекули у розчині залежить від її розміру. Для невеликих молекул, таких як флуоресцеїн, цей період триває 1 наносекунду. Для великих молекул (наприклад, імуноглобуліни) цей період триває 100 наносекунд. Поляризація флуоресценції низькомолекулярного трейсера у розчині наближена до нуля. Взаємодія трейсера зі специфічним антитілом та утворення імунного комплексу великого розміру призводять до високих значень поляризації флуоресценції.

За відсутності досліджуваного антигену в досліджуваній пробі, ступінь поляризації флуоресценції буде максимальною, оскільки усі центри зв'язування специфічних антитіл заняті лише молекулами трейсера. За наявності досліджуваного антигену, який конкурує за активні центри антитіл, ступінь поляризації зменшується, оскільки частина антигензв'язуючих центрів антитіл виявляється зв'язаною з антигеном без флуоресцентної мітки. Відповідно, за фіксованої концентрації антитіл та трейсера, ступінь поляризації флуоресценції буде зворотно пропорційна концентрації досліджуваної речовини у пробі.

Проведення реакції ПФІА не є складним та полягає у додаванні *аліквоти досліджуваної сполуки* та трейсера до розчину антитіл з подальшим інкубуванням протягом декількох хвилин та вимірюванні поляризації флуоресценції.

Вимірювання ступеню поляризації флуоресценції виконують на приладі, який повинен мати два поляризатори та високочутливий детектор.

Цей метод дозволяє використовувати як моноклональні, так і поліклональні антитіла. В залежності від специфічності антитіл можна проводити визначення як однієї сполуки, так і групи сполук. Чутливість цього методу дещо поступається чутливості імуноферментного аналізу. Проте його використовують для виявлення низькомолекулярних сполук, таких як лікарські й наркотичні засоби, гормони, отрутохімікати.

Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз (ІФА, англ. ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay) — це високочутливий лабораторний метод виявлення та кількісного визначення антигенів, або антитіл, у біологічних рідинах, заснований на специфічній взаємодії антиген-антитіло і використанні ферментної мітки для візуалізації результату.

Метод базується на специфічному зв'язуванні антитіла з відповідним антигеном. Антитіла (або антигени) іммобілізуються на поверхні твердого носія (зазвичай — лунки полістиролової мікроплашки). До зв'язаної молекули додається кон'югат з ферментом (це може бути пероксидаза хрину або лужна фосфатаза), який каталізує реакцію з субстратом, що призводить до утворення кольорового продукту (рис. 34).

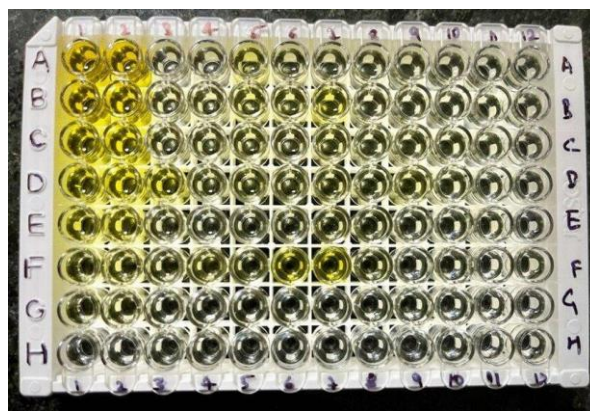


Рис. 34. Плашка що використовується для проведення ІФА [24]

Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації досліджуваної речовини. ІФА має кілька основних типів зі своїми особливостями.

Прямий ІФА передбачає використання антитіла, міченого ферментом, яке безпосередньо зв'язується з антигеном, іммобілізованим на поверхні твердої фази. Цей підхід є найпростішим за конструкцією, однак часто менш чутливий через відсутність етапу підсилення сигналу.

Непрямий ІФА включає два етапи: спочатку антиген фіксується на поверхні, потім додається немічене первинне антитіло, а далі — мічене ферментом вторинне антитіло, яке специфічно розпізнає первинне (рис. 35).

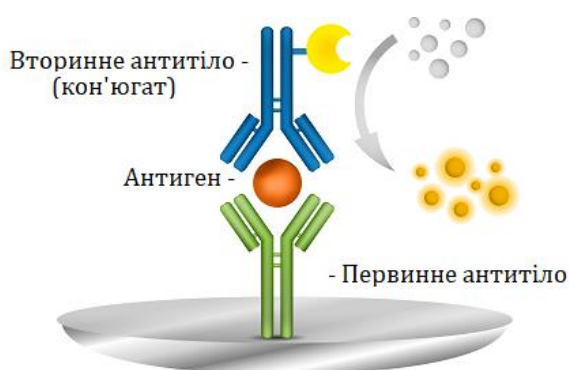


Рис. 35. Забарвлений комплекс первинне At-Ag- кон'югат [25]

Такий підхід дозволяє підвищити чутливість аналізу та забезпечити гнучкість у виборі реагентів. *Сандвіч-ІФА* базується на використанні двох антитіл, специфічних до різних епітопів одного й того ж антигену.

Перше антитіло (що захоплює) фіксується на твердій фазі й зв'язує антиген з досліджуваного зразка. Після цього додається друге антитіло, мічене ферментом, яке також зв'язується з антигеном, утворюючи так звану «сандвіч»-структуру. Цей метод дуже чутливий та специфічний, особливо при визначенні білкових маркерів.

Конкурентний ІФА відрізняється від попередніх тим, що між досліджуваним антигеном і міченим аналогом відбувається конкуренція за

зв'язування з фіксованими антитілами. Інтенсивність сигналу у цьому випадку обернено пропорційна концентрації антигену в зразку. Цей тип аналізу часто використовується для виявлення низькомолекулярних сполук, таких як гормони, токсини або лікарські засоби.

Вестерн-блот

Western blot — метод, який має велику кількість переваг та дозволяє вирішувати найрізноманітніші питання в біології. Вестерн-блот є золотим стандартом для виявлення та дослідження білків. У більшості випадків його застосовують для ідентифікації конкретного білку у складній суміші, оскільки метод дозволяє визначити молекулярну масу досліджуваного білку. Також він відомий як «білковий імуноблот», оскільки для специфічного виявлення білку використовуються специфічні антитіла. Сам метод був запропонований Harry Towbin зі Швейцарії у 1979 році. Назва «western» з'явилася дещо пізніше у 1981 році завдяки W. Neal Burnette за аналогією до «Southern-blot» (метод вивчення ДНК, названий на честь розробника — британського вченого Edwin Southern). Існує ще нозерн-блотинг (northern blot) для визначення РНК та істерн-блот (eastern blot) для характеристики посттрансляційних модифікацій білків.

Методика проведення вестерн-блотингу складається з двох етапів: розділення білків за розміром, перенесення на тверду підкладку та ідентифікація цільового білка (рис. 36).

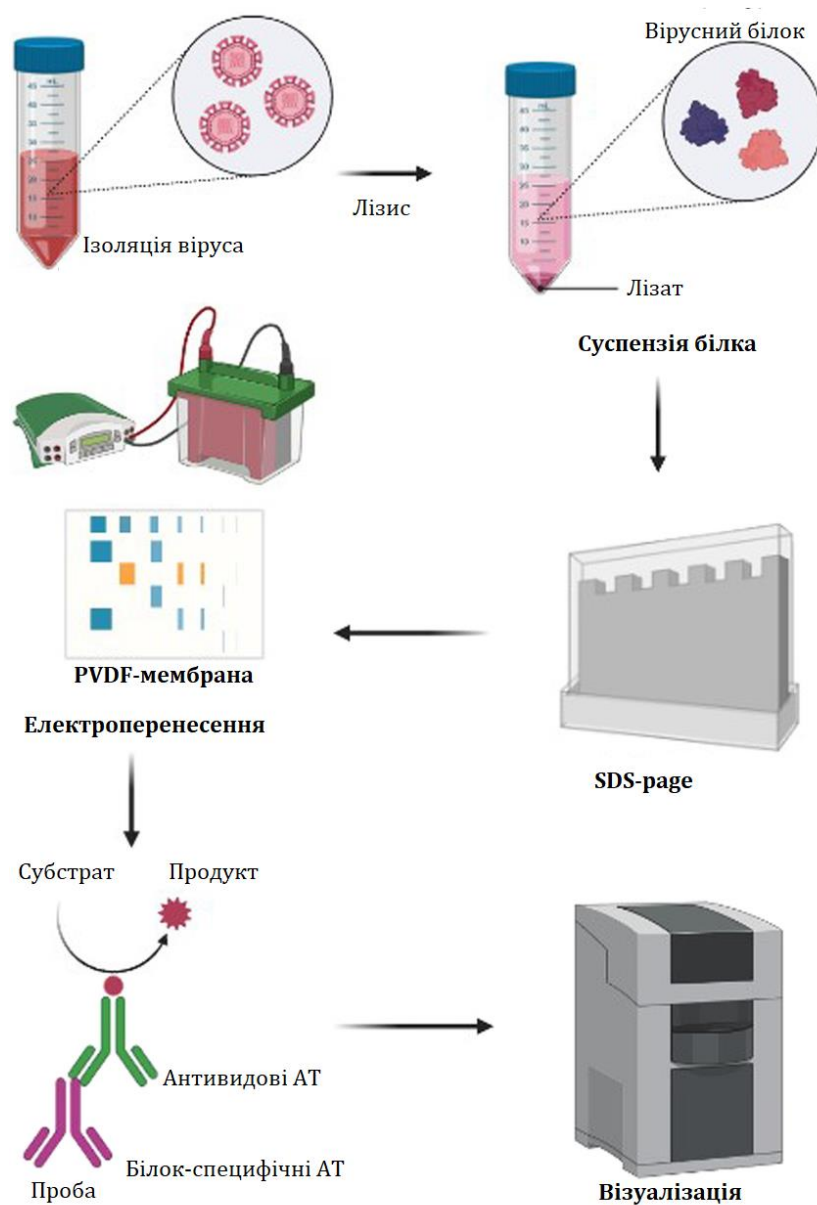


Рис. 36. Принцип визначення специфічного вірусного білку методом вестерн-блот [26]

На початку, білки у складі досліджуваного зразку розділяють за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі. На цьому етапі, під впливом електричного поля, білки переміщуються в гелі й розділяються по розміру та заряду. Якщо на цьому етапі гель зафарбувати, білки будуть візуалізуватися у вигляді набору смужок.

Надалі білки переносяться на тверду підкладку (зазвичай на мембрану з нітроцелюлози або полівінілідендифториду) під впливом електричного поля. Якраз цей процес називається **блотингом**. Під час цієї процедури гель та мембрану поміщають у пристрій для перенесення між двома аркушами фільтрувального паперу. При цьому білки на мембрані зберігають своє відносне положення, смуги розташовані так само, як і у гелі. Для контролю успішності перенесення, білки зафарбовують такими барвниками як кумасі R-250 або Понсо S.

Для попередження неспецифічного зв'язування первинних та вторинних антитіл проводять блокування мембрани. У більшості випадків для цього використовують знежирене сухе молоко або розчин бичачого сироваткового альбуміну. Виробники комерційних наборів пропонують для цієї мети використовувати різноманітні буфери.

Наприкінці мембрану інкубують з первинними антитілами, які є специфічними по відношенню до досліджуваного білку. Після цього додають мічені вторинні антитіла, які є специфічними до первинних антитіл, що дозволяє опосередковано візуалізувати досліджуваний білок. Зазвичай, вторинні антитіла ковалентно з'єднані з ферментами (наприклад, пероксидаза хрому, лужна фосфатаза), які утворюють зафарбований осад під час взаємодії з хромогенним субстратом. На мембрані можна побачити кольорову смугу у тому місці, де первинне антитіло зв'язалося з білком і, відповідно, визначити молекулярну масу цього білку.

Основна перевага методу — чутливість та специфічність. За допомогою цього методу можна виявити невелику кількість білку, що робить його придатним для ідентифікації незначних змін експресії.

Поєднання гель-електрофорезу та специфічних взаємодій антиген-антитіло допомагає виявити досліджувані білки у складних сумішах. Він дає можливість отримувати напівкількісні та кількісні дані про рівні експресії білків шляхом порівняння інтенсивності сигналу з контролем та стандартами. Окрім цього, метод достатньо універсальний та може бути використаний для вирішення найрізноманітніших завдань. Ще однією перевагою цього методу є те, що вестерн-блоти можна зберігати та повторно досліджувати.

Обмеження методу полягає у трудомісткості його проведення. Увесь процес займає до декількох діб, вимагає точного та ретельного виконання кожного кроку, при цьому незначні похибки або зміни у протоколах можуть суттєво вплинути на результат.

Ще одним вагомим недоліком є висока вартість методу, оскільки він вимагає використання дороговартісних антитіл та спеціалізоване обладнання. Також вестерн-блоти можуть давати хибнопозитивні чи хибнонегативні результати через неспецифічне зв'язування антитіл, або неповне перенесення білків. Інтерпретація результатів багато в чому залежить від досвіду та суб'єктивності дослідника.

Оскільки метод є універсальним, його застосовують як для фундаментальних досліджень, так і для діагностики різноманітних захворювань.

Сфери застосування методу вестерн-блот:

- *Ідентифікація білку.* Проводиться завдяки електрофоретичному розділенню та застосуванню специфічних антитіл.
- *Оцінка розміру білкової молекули.* Можна провести порівняння характеру міграції та положення білкових смуг на мембрані з відомими маркерами молекулярної маси.
- *Оцінка кількості білку у зразку.* Проводиться шляхом порівняння інтенсивності або щільності білкових смуг.
- *Виявлення різноманітних форм білку.* Для цього порівнюють смуги білка зі зразку хворої людини зі смугами зразка здорової людини.
- *Вивчення РНК-білкових, ДНК-білкових та білок-білкових взаємодій або посттрансляційних змін* (метилування, глікозилювання, фосфорилювання, сумоїлювання, убіквітування)
- *Діагностика онкологічних, аутоімунних та неврологічних захворювань.* Завдяки цьому методі виявляють такі маркери, як гіперекспресія білку PPN1 (рак гортані), білок GSTO1 (рак стравоходу) та переносник ліків ABCG2 під час хвороби Альцгеймера.
- *Діагностика інфекційних захворювань.* Цей метод використовується для серодіагностики туберкульозного менінгіту та нейроцистицеркозу, в якості тестів на ВІЛ, гепатиту В, хвороби Лайма та інші. Зокрема він дозволяє діагностувати пріонні захворювання (хворобу Кройцфельда-Якоба), губчасту енцефалопатію великої рогатої худоби.

Помилки та проблеми, які виникають при проведенні Вестерн-блот аналізу наведено у таблиці 4.

Таблиця 4.

Типові помилки під час проведення Вестерн-блоту

Проблема	Можлива причина	Можливі варіанти виправлення
Відсутність смуг	Не відбулося перенесення	Перевірити, чи мембрана належним чином змочена буфером або метанолом. Перевірити, щоб між мембраною та гелем був контакт.
	Було взято невідповідні вторинні антитіла	Перевірити відповідність антитіл.
	Закінчився термін придатності антитіл або вони зіпсувались	Виконувати рекомендації щодо умов зберігання та уникати циклів заморожування-відтаювання.
	Відбулося забруднення азидом натрію	Переконавшись що буферні розчини не містять азид натрію, оскільки він пригнічує сигнал пероксидази хрому.
«Слабкі» смуги	Низьке зв'язування білків з антитілами	Звести кількість промивань до мінімуму. Зменшити концентрацію NaCl у буфері для блотингу та розчину антитіл
	Взято недостатню кількість антитіл, або їхня афінність до досліджуваного білку надто низька	Збільшити концентрацію антитіл у 2-4 рази.
	Взято надто мало білку	Збільшити кількість білку
	Зіпсувався кон'югат	Змішати фермент та субстрат у пробірці. Якщо колір не розвинувся – зробити «свіжі» реагенти або придбати нові.

З'явилися зайві смуги	Відбулося неспецифічне зв'язування первинних антитіл	Зменшити концентрацію первинних антитіл та кількість загального білку, який розташовується у гелі. Використовувати моноспецифічні антитіла.
	Відбулося неспецифічне зв'язування вторинного антитіла	Провести контроль тільки із вторинним антитілом. Якщо з'являться смуги – обрати альтернативне вторинне антитіло.
	Відбулося неспецифічне зв'язування первинних або вторинних антитіл	Додати 0,1–0,5% Tween 20 до розчину антитіл та збільшити його концентрацію у буфері для промивання. Збільшити кількість промивань. Збільшити концентрацію NaCl у буфері для блотингу.
	Досліджуваний білок деградував	Звести до мінімуму цикли замороження/відтаювання зразка. Додати інгібітори протеази у зразок перед зберіганням. Зробити свіжі зразки
	Можливо знайдено щось нове	Якщо зайві смуги розташовані вище досліджуваного білка – це можуть бути модифікації, пов'язані із фосфорилуванням або ацетилюванням (маса білка збільшується незначно) або з убіквітинуванням чи сумоїлуванням (маса протеїну збільшується приблизно на 20 КДа)
Значний фон	Відбулося неспецифічне	Підібрати оптимальну концентрацію молока та NaCl у

	зв'язування первинних антитіл	розчині первинного антитіла. Зменшити концентрацію антитіл.
	Молоко може містити антиген-мішень або ендогенний біотин. Антитіла розпізнали молочний протеїн.	Провести заміну молока, при блокуванні вільних ділянок на мембрані, на 3%-й бичачий сироватковий альбумін (BSA).
	Недостатня кількість промивань	Збільшити кількість промивань або концентрацію Tween 20 у промивному буфері.
З'явилися нерівні плями	Забруднення реагентів твердими часточками або бактеріями	Необхідно приготувати свіжі реактиви.
	Під час інкубації або промивання була недостатня кількість розчину	Перевірити чи мембрана повністю занурена у розчин.
	На мембрану під час перенесення потрапили бульбашки повітря	Обережно прибрати бульбашки повітря, особливо під час переносу.
	Перемішування під час інкубації було нерівномірним	Використовувати гойдалку або шейкер.
	Забруднене обладнання	Помити блок електрофорезу.
	Відбулася агрегація пероксидази хрому	Відфільтрувати кон'югат та видалити агрегати.
	Занадто тривала витримка	Зменшити час витримки.

Імунохроматографічний аналіз

Цей метод заснований на принципі *тонкошарової хроматографії*. Імунохроматографічний аналіз являє собою якісний скринінговий метод, який дозволяє протягом декількох хвилин виявити наявність певних речовин у біологічних рідинах відразу після взяття зразку. Він широко застосовується для швидкої діагностики різних захворювань, зокрема інфекційних (грип, COVID-19, ВІЛ), а також для виявлення гормонів, наркотичних речовин, алергенів тощо. Метод простий у використанні, не потребує спеціалізованого лабораторного обладнання, а результат можна отримати за лічені хвилини. Часто виробники вказують на пакуванні цих тестів «Експрес-тест» або «Експрес аналіз».

Принцип дії імунохроматографічного аналізу базується на тому, що зразок (сеча, сироватка крові, слина тощо) наноситься на спеціальну мембрану (найчастіше з нітроцелюлози). На початку тест-смужки знаходиться *кон'югат* — антитіла, мічені кольоровими частинками (золотом, латексом чи ферментами). За наявності у зразку специфічного антигену, він зв'язується з міченими антитілами, утворюючи комплекс. Завдяки капілярному притоку рідини, утворений комплекс далі рухається по мембрані.

По досягненню комплексом тестової зони (на якій містяться інші специфічні антитіла), відбувається захоплення комплексу й утворення кольорової лінії. Поява цієї лінії свідчить про наявність досліджуваного аналізу в зразку. Далі рух продовжується до контрольної зони, де завжди має з'являтися друга лінія — вона підтверджує, що тест пройшов

правильно. У випадку, якщо контрольна лінія не з'явилася, тест вважається недійсним, незалежно від наявності чи відсутності тестової лінії.

Завдяки своїй простоті, імунохроматографічний аналіз активно використовується не лише в лабораторіях, але й у польових умовах, клініках швидкої допомоги та вдома. При цьому точність тесту значною мірою залежить від якості реагентів та дотримання інструкцій щодо забору і нанесення зразку.

Приклад процедури тестування на наявність вірусного антигену.

Імунохроматографічне дослідження на COVID-19 є методом швидкого виявлення антигенів вірусу SARS-CoV-2 у зразках з верхніх дихальних шляхів, зазвичай із носоглотки або носа. Такий тест базується на принципі взаємодії антигену вірусу з міченими антитілами на твердому носії, що дозволяє отримати результат протягом 10–20 хвилин без використання лабораторного обладнання (рис. 37).

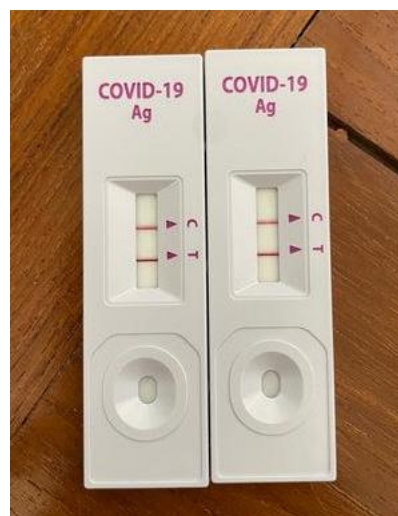


Рис. 37. Касети експрес-тесту для роздільного виявлення антигенів SARS-CoV-19 (позитивний праворуч) [27]

Застосування методу дає змогу в перші дні після зараження оперативно виявляти осіб, які є носіями вірусу, коли концентрація вірусного антигену в слизових найвища.

Проведення тесту починається з підготовки компонентів. Всі елементи набору (*тест-касета, буфер, екстракційна пробірка та стерильний тампон*) мають бути кімнатної температури. Забір зразка

виконується за допомогою стерильного тампона, який вводиться у носоглотку на глибину кількох сантиметрів, де здійснюється кілька обертальних рухів для збору слизу. Зібраний зразок одразу поміщається у пробірку з буферним розчином, в якій тампон обертають протягом 10–15 секунд для повного вилучення матеріалу. Після цього його виймають, притискаючи до стінки пробірки. Пробірку закривають спеціальним ковпачком-крапельницею.

Далі, на чисту горизонтальну поверхню поміщають тест-касету та додають у відведену лунку кілька крапель екстрагованого зразка. Протягом 15 хвилин відбувається міграція рідини мембраною, і, у разі наявності антигену вірусу, в зразку формується кольорова тестова лінія поряд з контрольною. Наявність двох чітких ліній — контрольної та тестової — свідчить про позитивний результат, тобто наявність антигену SARS-CoV-2. Якщо присутня лише контрольна лінія, тест вважається негативним. Відсутність контрольної лінії, незалежно від наявності тестової, означає, що результат недійсний і тест необхідно повторити.

Після завершення тестування всі використані матеріали повинні бути утилізовані як потенційно інфіковані біологічні відходи згідно з діючими санітарними нормами. Також важливо провести гігієнічну обробку рук. Варто пам'ятати, що хоча експрес-тести мають високу специфічність, вони менш чутливі за ПЛР-дослідження, особливо у випадках із низьким вірусним навантаженням. Тому негативний результат не виключає інфекції повністю, і при наявності симптомів або контакту з хворими доцільно повторити тестування або звернутися до медичного закладу для проведення лабораторного аналізу.

Імуносенсиори

Цей вид пристроїв є різновидом біосенсорів. **Біосенсором** називають аналітичний пристрій, який поєднує елементи біологічного розпізнавання та перетворювач. Останній відповідає за кількісне визначення, з високою точністю та специфічністю, компонентів суміші чи розчину. **Імуносенсор** є аналітичним пристроєм, який призначений для детекції біологічних речовин. Речовини, які виявляє імуносенсор, називають **аналітами**. Відповідно, сигнал, який генерує імуносенсор, пропорційний концентрації аналіту в зразку.

Біосенсор складається з двох компонентів — з елемента біологічного розпізнавання (біорецептор) та перетворювача (трансдюсер) (рис. 38).

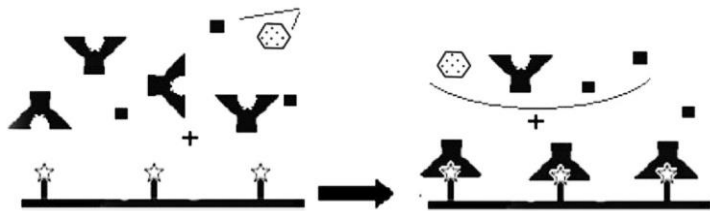


Рис. 38. Схема прямого визначення антитіла [28]

Біорецептор повинен селективно реагувати з певним аналітом. Біорецептори можуть бути представлені ферментами, антитілами, нуклеїновими кислотами

та, навіть, цілими клітинами. Біорецептор має забезпечувати точну взаємодію з аналітом.

Біосенсиори, які використовують у якості біорецептора антитіла (моно- або поліклональні), називають **імуносенсиорами**. Імуносенсиори володіють високою специфічністю до антигенів. Події зв'язування антигену та антитіла призводять до фізико-хімічних змін у індикаторних речовинах

(флюорохроми, ферменти чи радіоізотопи), що генерують сигнал. Антитіла мають високу константу зв'язування і зв'язок, який утворюється, є майже незворотнім. Біосенсиори на основі антитіл іноді називають **афінними біосенсиорами** (рис. 39).

Перетворювач (трансдюсер) потрібен для трансформації біологічного сигналу (відбувається взаємодія “біорецептор-аналіт”) у вимірюваний сигнал. В основі перетворення лежать електрохімічні, оптичні, п'єзоелектричні, термічні явища. Відповідно, перетворювачі бувають термо-, електрохімічні, оптичні, п'єзоелектричні, механічні, електронні. Електрохімічні перетворювачі трансформують біологічну реакцію в електричні сигнали. Амперметричні — вимірюють зміну сили струму, потенціалометричні — зміни потенціалів при окисно-відновних реакціях. Оптичні перетворювачі використовують флуоресценцію, люмінесценцію.

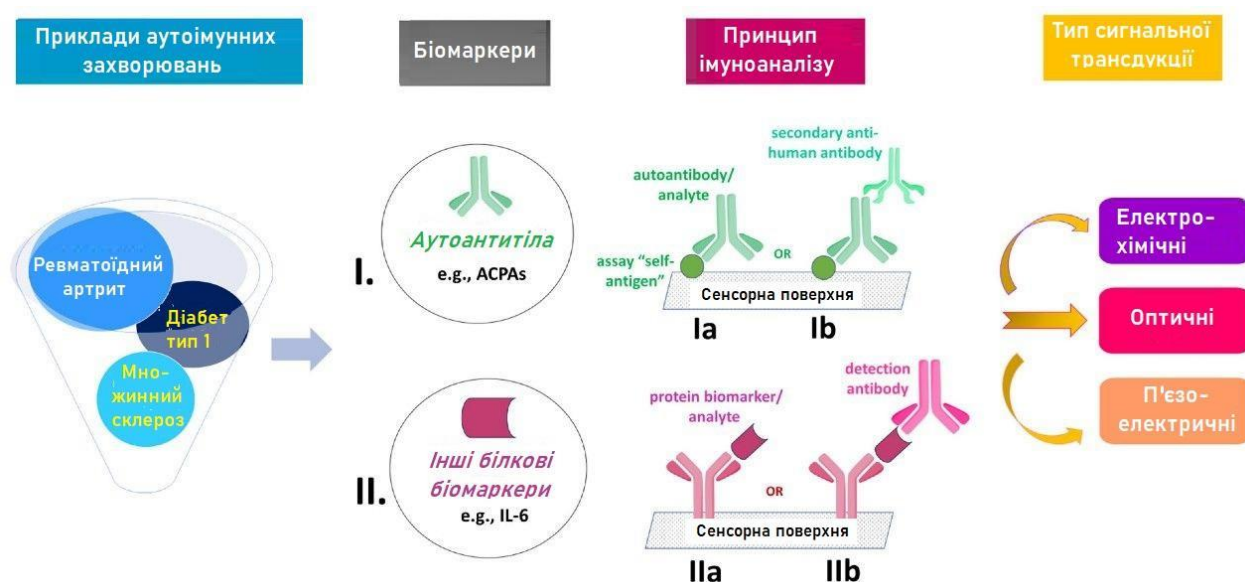


Рис. 39. Основні принципи роботи імуносенсорів [29]

П'єзоелектричні перетворювачі вимірюють зміну маси на поверхні датчика, можуть забезпечувати моніторинг в реальному часі. Термоперетворювачі детектують зміни температури внаслідок біохімічних реакцій у досліджуваному середовищі (наприклад, вивчення кінетики ферментів). Чутливість перетворювача визначає селективність та специфічність сенсора.

Імуносенсиори, як правило, використовують певні методи реєстрації сигналу. Для перетворення сигналу комплексу “антиген-антитіло” застосовують мітки у вигляді ферментів чи флюорохромів.

Для того, щоб біосенсор функціонував, біорецептор прикріплюють на поверхні сенсора. Як правило, використовують речовини, що мають властивість адсорбувати на своїй поверхні — полілізин, аміноксилан, епоксилан, нітроцелюлоза. На біологічний елемент також можуть додатково наносити полімерні покриття. Антитіла можна іммобілізувати практично на всіх типах трансдьюсерів. Окрім того, полімери, що формують тривимірні сітки (гідрогель або акрилатний гель), здатні хімічно чи фізично зв'язувати біорецептор (рис. 40).

У якості чутливого шару імуносенсору використовують антитіла чи антигени. Саме вони забезпечують високоспецифічну реакцію зв'язування з молекулами-аналітами. Дуже чутливими є імуносенсиори на основі моноклональних антитіл, оскільки вони є гомогенними імуноглобулінами.

Електрохімічний імуносенсор також працює завдяки реакції “антиген-антитіло”. Цей тип імуносенсорів належить до найбільшого класу електрохімічних методів, використовується для аналізу білкового складу та ідентифікації окремих білків. При використанні п'єзоелектричного перетворювача, через імуносенсор пропускається досліджувана суміш. При

цьому аналіти специфічно зв'язуються з іммобілізованими антитілами на поверхні електрода та утворюють імунокомплекси.

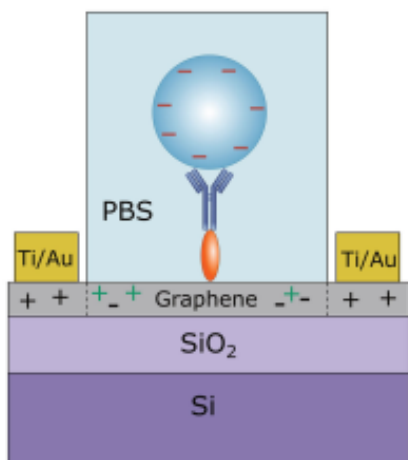


Рис. 40. Іммобілізація біорецептора на шарі графену [30]

Через утворення імунного комплексу відбувається збільшення маси електрода, що призводить до зміни резонансної частоти сенсора, яка є пропорційною концентрації аналіту. Аналіз суміші таким способом виконують як у статичному, так і в проточному режимах.

Імуносенсиори мають ряд обмежень. Для виявлення певної речовини потрібно власні специфічні антитіла. Утворення комплексу антиген-антитіло дуже залежить від умов, в яких відбувається аналіз. Наприклад, температура суміші, її рН. Стійкість комплексу антиген-антитіло залежить від впливу реагентів (наприклад, органічних розчинників). Окрім того, антитіла мають значну молекулярну масу та стабільні у відносно вузькому діапазоні зовнішніх чинників.

При конструюванні біорецептора імуносенсору, для подолання недоліків, використовують лише рекомбінантні зв'язувальні фрагменти (Fab, Fv, scFv) або домени антитіл (VH, VHH). Також, одним з підходів посилення стабільності білкової молекули антитіла, є штучне створення родин антигензв'язуючих білків до різноманітних білків. Антигензв'язуючі білки складаються із менш ніж 100 амінокислотних залишків, є більш стабільними, ніж звичайні антитіла.

Антитіло може бути отримано практично до будь-якої відомої речовини. Імуносенсиори широко використовують у медичній діагностиці, пошуку біомаркерів патологій, аналізу параметрів навколишнього середовища, аналізу безпечності харчових продуктів. Імуносенсиори можна використовувати для серологічної діагностики, виявлення циркулюючих антитіл після перенесеного інфекційного захворювання.

Антитіла володіють унікальними властивостями комплементарного зв'язування з антигенами (у даному випадку — цільовою молекулою) у складних розчинах, якими є біологічні рідини (кров, слина, лімфа, сироватка, сеча, тощо)(рис. 41, 42).

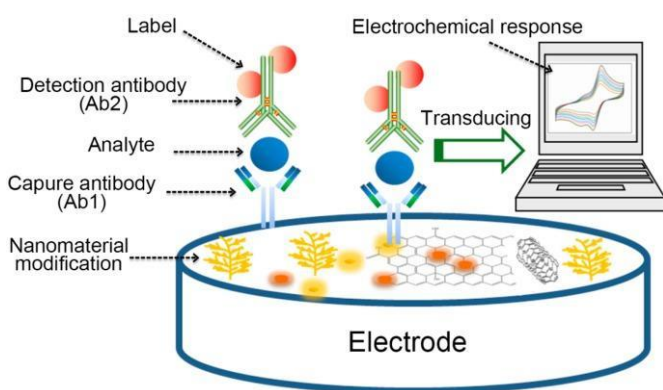


Рис. 41. Принцип роботи електрохімічного імуносенсору [31]

що мають оптичний перетворювач, на який нанесено антитіла для виявлення патогенів та харчових токсинів

Таким імуносенсором можна виявляти водорозчинні вітаміни, залишки ліків (сульфаніламід, бета-агоніст). Прикладом імуносенсору може слугувати сенсор із біорецепторним покриттям на основі вторинних антитіл до IgE. Такий імуносенсор дозволяє визначати сумарний IgE у

До найпоширеніших імуносенсори належать ферментні, флуорисцентні, волокно-оптичні, п'єзоелектричні, мікрохвильові біосенсиори. Найпоширенішими є імунофлуоресцентний та імуноферментні методи. В харчовій промисловості часто використовують імуносенсиори,

стаціонарних умовах. Можна нанести додатковий шар, що дозволить виявити імуноглобуліни до певного алергену.

На сьогодні розроблено імуносенсиори для визначення антитіл до ДНК, які з'являються при певних аутоіммунних хворобах. Зокрема, вже відомо імуносенсиори для діагностики системного червоного вовчака, ревматоїдного артрити, гломерулонефриту, системної склеродермії.

Проте, більшість імуносенсорів для застосування в лабораторній діагностиці перебувають на стадії розробки та випробовувань.

Наразі широке застосування знайшли імуносенсиори для мікробіологічної діагностики. Перевагами імуносенсорів є те, що вони здатні швидко виявити патоген, тоді як традиційні мікробіологічні методи дозволяють виявити збудника за кілька днів. Вже у лабораторній діагностиці використовуються імуносенсиори імуносенсиори для виявлення гепатиту, герпесу, ВІЛ.

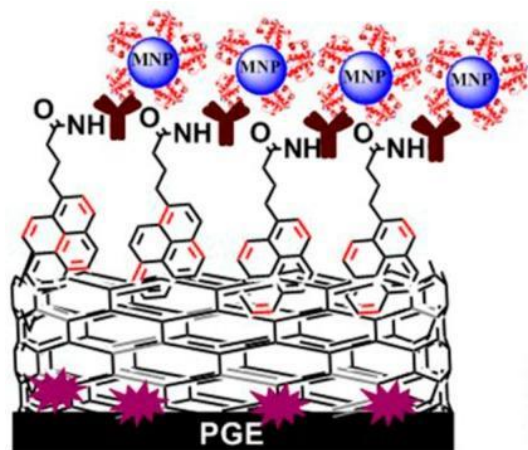


Рис. 42. Конструкція імуносенсору для визначення інсуліну в сироватці крові з використанням графітових електродів [32]

Імуногістохімічні дослідження

Імуногістохімія — це аналітичний метод визначення хімічних речовин у клітинах та тканинах, заснований на реакції “антиген-антитіло”, застосовується для візуалізації специфічних білків. Для виявлення

специфічних речовин використовують антитіла, які зв'язані з флуорохромами або ферментами (рис. 43).

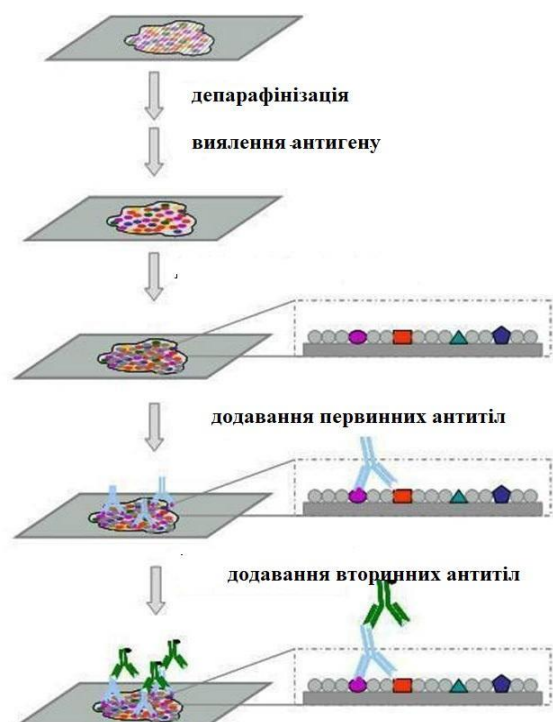


Рис. 43. Схема проведення імуногістохімічної реакції [33]

Після проведення реакції, при наявності певної хімічної речовини, в місці її локалізації буде виявлятися або люмінесценція (у випадку, коли антитіла кон'юговані з флуорохромами) або ферменти (у випадку, коли антитіла зв'язані з ферментами). Для електронної мікроскопії використовують антитіла, мічені електронно-щільними речовинами (наприклад, колоїдне золото).

Це дозволяє вивчити особливості субклітинної організації, які неможливо ідентифікувати за допомогою світлової мікроскопії. Можливість виявлення кінцевих продуктів численних реакцій робить імуногістохімію популярним методом дослідження.

Імунопероксидазний метод

У якості мітки використовують фермент пероксидазу хрону (рис. 44). Цей метод дозволяє виявляти маркери пухлинних клітин, прогнозувати протипухлинну терапію. Наприклад, виявлення в пухлинних клітинах

епідермального фактору росту може вказувати на чутливість до хіміотерапії трастузумабом/герцептином.

Імунофлуоресценція

Метод імунофлуоресценції — це лабораторний метод візуалізації, який базується на здатності флуоресцентних міток, приєднаних до антитіл, світитися під дією ультрафіолетового або іншого збуджуючого світла. Цей метод дозволяє виявляти певні антигени у клітинах або тканинах за допомогою специфічної взаємодії антиген-антитіло. У разі наявності цільового антигену в зразку, мічені антитіла

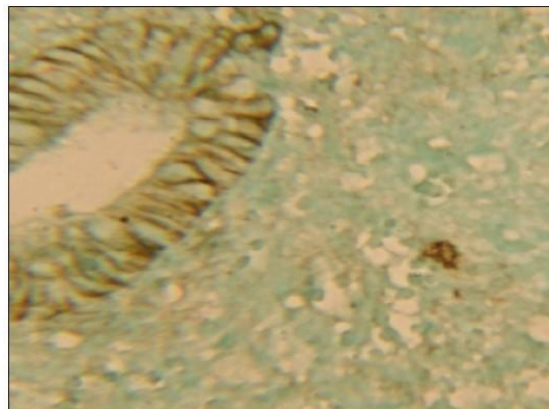


Рис. 44. Виявлення експресії маркерів плазмоцидів CD-138 у стромі ендометрія пероксидазним методом, забарвлення метиленовим зеленим [34]

зв'язуються з ним і дозволяють спостерігати його локалізацію за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

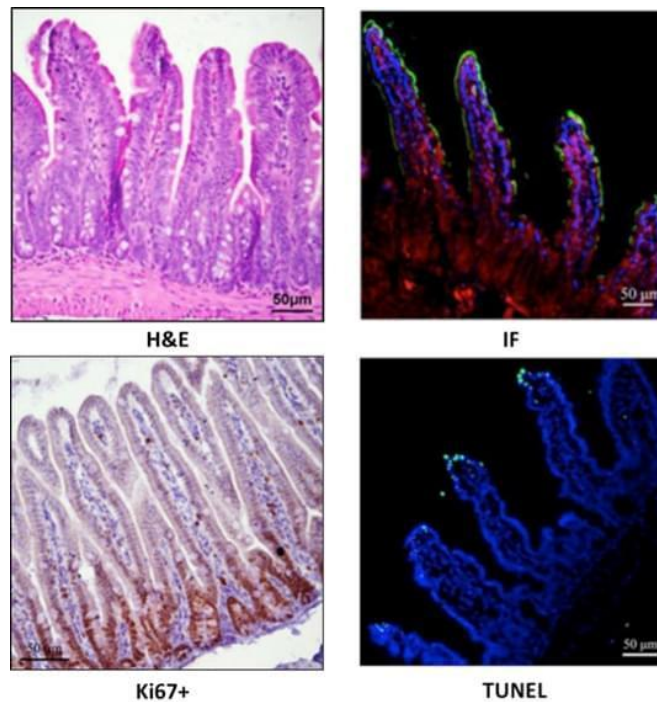
Цей метод дуже популярний, оскільки він є високоспецифічним та дозволяє виявляти в зрізах конкретні білки та глікопротеїни. Його використовують для діагностики хвороб шляхом пошуку маркерних білків, що з'являються при певних патологічних станах. В якості мітки використовуються флуорохроми, кон'юговані з вторинними антитілами (рис. 45).

Існує два основних типи імунофлуоресценції: **пряма** і **непряма**. У прямому варіанті використовується одне антитіло, яке безпосередньо

мічене флуорохромом (наприклад, флуоресцеїном або родаміном) і зв'язується з антигеном. Непряма імунофлуоресценція передбачає використання двох антитіл: первинне антитіло специфічно зв'язується з антигеном, вторинне (мічене) розпізнає первинне і забезпечує підсилення сигналу. Саме непряма методика частіше використовується в практиці через її вищу чутливість.

Для проведення дослідження готують мазки або зрізи тканин, які фіксують, обробляють та інкубують з антитілами. Для усунення незв'язаних антитіл, зразки промивають й аналізують за допомогою флуоресцентного мікроскопа. У місцях зв'язування антигену з антитілом видно світіння певного кольору, що відповідає обраному флуорохрому.

Рис. 45. Виявлення антитіл проти білка Ki-67, маркеру проліферуючих клітин. H&E – оглядовий метод забарвлення гематоксиліном та еозином; IF, TUNEL- імунофлуоресцентне



**виявлення антитіл до Ki-67, Ki67+ - імунопероксидазне
виявлення антитіл до Ki-67 [35]**

Це світіння дозволяє не лише підтвердити наявність цільового антигену, але й оцінити його розташування в клітині або тканині. Частіше використовують наступні флуорохроми: флуоресцеїн – зелена флуоресценція, родамін, техаський червоний – червона флуоресценція, фікоеритрин – оранжева флуоресценція.

Імунофлуоресценція широко використовується в діагностиці вірусних, бактеріальних та аутоімунних захворювань. У наукових дослідженнях цей метод доцільний для вивчення клітинної будови, білкової експресії та внутрішньоклітинної взаємодії. Метод вимагає спеціального обладнання, точного дотримання протоколів та належної інтерпретації результатів, однак його висока чутливість, специфічність і можливість отримання просторової інформації роблять його незамінним інструментом сучасної імунології.

Література

Бесчасний С. П., Гасюк О. М. Імунологія : навч. посіб. – Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. – 196 с.

Клінічна імунологія та алергологія / за ред. О. М. Біловола, П. Г. Кравчуна, В. Д. Бабаджана, Л. В. Кузнецової. – Харків : Вид-во «Гриф», 2011. – 620 с.

Господарський І. Я., Федоров Ю. В., Бойко Я. Є. [та ін.] Клінічна імунологія та алергологія для практичних лікарів : підручник / за ред. В. В. Чопяк. – Львів : ЛНМУ ім. Данила Галицького, 2016. – 822 с.

Клінічна та лабораторна імунологія : національний підручник / за ред. Л. В. Кузнецової, В. Д. Бабаджана, В. М. Фролова. – Київ : ООО «Полиграф плюс», 2012. – 922 с.

Лаповець Л. Є., Акімова В. М., Лебедь Г. Б. [та ін.] Лабораторна імунологія : навч. посіб. – Львів : Видавець Марченко Т. В., 2024. – 318 с.

Мікробіологія з основами імунології : підручник для студ. мед. ЗВО, фармацевтів та провізорів : 2-ге вид., перероб. і доп. / за ред. В. В. Данилейченка, Й. М. Федечка ; рекомендовано вченою радою Львів. НМУ. – Київ, 2019. – 376 с.

Соколенко В. Л., Соколенко С. В. Прикладна імунологія : навчально-метод. посіб. – Черкаси : Вид. від. ЧНУ ім. Б. Хмельницького, 2011. – 60 с.

Шкуропат А. В. Основи лабораторної практики : метод. рек. для студентів денної та заочної форм навчання спеціальності 091 Біологія. – Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2020. – 36 с.

Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. : 2-ге вид. – Вінниця : Нова книга, 2011. – 952 с.

Широбоков В. П., Климнюк С. І., Ситник І. О., [та ін.] Практична мікробіологія : навч. посіб. – Вінниця : Нова книга, 2018. – 576 с.

Cossarizza A., Chang H. D., Radbruch A., et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). Eur J Immunol. 2019;49(10):1457–1973. doi:10.1002/eji.201970107.

Meftahi G. H., Bahari Z., Zarei Mahmoudabadi A., Iman M., Jangravi Z. Applications of western blot technique: from bench to bedside. Biochem Mol Biol Educ. 2021;49(4):509–517. doi:10.1002/bmb.21516.

Список ілюстрацій

- [1] York, Ian A. et al. (2019). Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. 39(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20171505>
- [2] Magendira mani vinayagam. Antigen Antibody Interaction. <http://www.sbs.utexas.edu/sanders/bio347/lectures/2006/lecture%208%202006.htm>
- [3] Khan, M.M. (2016). Overview of the Immune Response. In: Immunopharmacology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30273-7_1
- [4] Metody vyšetření imunity. <https://docplayer.cz/47807208-Metody-vysetreni-imunity.html>
- [5] Yadav, P.K., Sharma, S. (2024). Application of Forensic Techniques to Blood Analysis. In: Advancements in Body Fluid Analysis in Forensics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-65804-4_2
- [6] Poornima V., Venkatasubramani R., Sreevidya V., Pavan Chandrasekar, Study on properties of bio-bricks, Materials Today: Proceedings, Volume 49, Part 5, 2022, Pages 2103-2109, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.315>.
- [7] Serological diagnosis. <https://veteriankey.com/serological-diagnosis/>
- [8] ES-705 – Agglutinoscope. <https://esse3-medical.com/en/little-accessories-lab/ES-705-agglutinoscope>
- [9] Wardrop, K. J. (2022). Clinical blood typing and crossmatching. Schalm's veterinary hematology, 964-968.
- [10] James MacLachlan N., Edward J. Dubovi. Chapter 5 - Laboratory Diagnosis of Viral Infections, Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition), Academic Press, 2017, P. 105-129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00005-2>.
- [11] Latex Agglutination Test Kits Market: Exploring the Projected USD 1,029.83 Million Industry Size by 2032. <https://www.openpr.com/news/3447143/latex-agglutination-test-kits-market-exploring-the-projected>
- [12] Systemic Approach to Anemia. <https://myhematology.com/red-blood-cells/systemic-approach-to-anemia/>
- [13] Indirect Antiglobulin (Coombs) Test (IAT). <https://myhematology.com/lab-protocols/indirect-antiglobulin-coombs-test-iat/>
- [14.A] Yount, William & Kunkel, Henry & Litwin, Stephen. (1967). Studies of the Vi(γ 2c) subgroup of γ -globulin. The Journal of experimental medicine. 125. 177-90. [10.1084/jem.125.2.380](https://doi.org/10.1084/jem.125.2.380). https://www.researchgate.net/publication/19003131_Studies_of_the_Vig2_c_subgroup_of_g-globulin

- [14.B] Immuno Electrophoresis Systems.
<https://www.indiamart.com/proddetail/immuno-electrophoresis-systems-13110103112.html>
- [15.A] Rocket Immuno-electrophoresis – Definition, Principle, Procedure, Result, Application.
<https://biologynotesonline.com/rocket-immuno-electrophoresis/>
- [15.B] Soal dan Pembahasan Mekanika Tanah: Analisa Butiran.
<https://overcoolboyz.blogspot.com/2016/05/soal-dan-pembahasan-mekanika-tanah.html>
- [16] Biology notes online. <https://biologynotesonline.com/counter-current-immuno-electrophoresis/>
- [17] Westermeier, R. (2019). Immunelektrophorese, zweidimensionale nach Clarke und Freeman. In: Gressner, A.M., Arndt, T. (eds) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_1524
- [18] Ng, Nicole & Powell, Charles. (2021). Targeting the Complement Cascade in the Pathophysiology of COVID-19 Disease. Journal of Clinical Medicine. 10. 2188. <https://doi.org/10.3390/jcm10102188>.
https://www.researchgate.net/publication/351724955_Targeting_the_Complement_Cascade_in_the_Pathophysiology_of_COVID-19_Disease
- [19] Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Chapter 30 - Molecular Basis of Immunity, Editor(s): Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Medical Biochemistry, Academic Press, 2017, Pages 745-780, ISBN 9780128035504, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00030-6>.
- [20] Neivys García Delgado, Ana Iris Frías Vázquez, Hiran Cabrera Sánchez, Roberto Menéndez Soto del Valle, Yusvel Sierra Gómez, Ana María Suárez Alfonso. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract from red seaweed *Dichotomaria obtusata*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 49, n. 1, jan./mar., 2013. <https://www.scielo.br/j/bjps/a/r7FmJctW87wppmkGrXhtbVM/?format=pdf&lang=en>
- [21] Immunofluorescence Assay – Principle, Protocol, Types, Uses.
<https://biologynotesonline.com/immunofluorescence-assay/>
- [22] Fluorescence Polarization (FP).
<https://www.moleculardevices.com/technology/fluorescence-polarization>
- [23] Microplate Readers.
<https://www.mandel.ca/catalog/lifesci/lifescimicroplateread>
- [24] Srikanth, Muppana & Arumugaswamy, Prasanna Ramana & Rathore, Yashwant Singh & Chumber, Sunil & Yadav, Rajkumar & Maitra, Souvik & Bhattacharjee, Hemanga & Aggarwal, Sandeep & Asuri, Krishna & Kataria, Kamal & Ranjan, Piyush & Singh, Devender & Singh, Ankita & Khan, M. & Das,

- Sumit Kumar Das. (2024). Comparison of inflammatory markers in low-pressure pneumoperitoneum with deep neuromuscular block versus standard pressure pneumoperitoneum among patients undergoing laparoscopic cholecystectomy for gallstone disease: a randomized control trial. *Surgical Endoscopy*. 38. 1-9. 10.1007/s00464-024-11026-z. https://www.researchgate.net/publication/382078966_Comparison_of_inflammatory_markers_in_low-pressure_pneumoperitoneum_with_deep_neuromuscular_block_versus_standard_pressure_pneumoperitoneum_among_patients_undergoing_laparoscopic_cholecystectomy_for_g
- [25] Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>
- [26] Harsh, & Tripathi, Pratima. (2023). Medical viruses: diagnostic techniques. *Virology Journal*. 20. 10.1186/s12985-023-02108-w. https://www.researchgate.net/publication/372285664_Medical_viruses_diagnostic_techniques
- [27] COVID Endemic Journey Day 1. <https://bespokebread.sg/blogs/news/covid-endemic-journey>
- [28] Марценюк В. П., Мочульська О. М., Боярчук О. Р., Павлишин Г. А., Сверстюк А. С., Завіднюк Ю. В., Бондарчук В. І. Перспективи розробки і застосування біосенсорів та імуносенсорів із діагностичною метою у клінічній медицині. *Вісник наукових досліджень*. 2019. № 1. С.15-22. <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/visnyk-nauk-dos/article/download/9998/9686/38253>
- [29] Karachaliou, C.-E., & Livaniou, E. (2023). Immunosensors for Autoimmune-Disease-Related Biomarkers: A Literature Review. *Sensors*, 23(15), 6770. <https://doi.org/10.3390/s23156770>
- [30] Tsang, Deana & Lieberthal, Tyler & Watts, Clare & Dunlop, Iain & Ramadan, Sami & del Rio Hernandez, Armando & Klein, Norbert. (2019). Chemically Functionalised Graphene FET Biosensor for the Label-free Sensing of Exosomes. *Scientific Reports*. 9. 10.1038/s41598-019-50412-9. https://www.researchgate.net/publication/336079824_Chemically_Functionalised_Graphene_FET_Biosensor_for_the_Label-free_Sensing_of_Exosomes
- [31] Rabisa Zia, Ayesha Taj, Sumaira Younis, Syeda Zunaira Bukhari, Faiza Latif, Yusra Feroz, Kaneez Fatima, Midrarullah, Asma Imran, Sadia Z. Bajwa, 12 - Application of nanosensors for pesticide detection, Editor(s): Adil Denizli, Tuan Anh Nguyen, Susai Rajendran, Ghulam Yasin, Ashok Kumar Nadda, In *Micro and Nano Technologies, Nanosensors for Smart Agriculture*, Elsevier, 2022, Pages 259-302, ISBN 9780128245545, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824554-5.00006-9>.

- [32] Zare, Y., Soleymani, J., Rahimi, M. *et al.* Trends in advanced materials for the fabrication of insulin electrochemical immunosensors. *Chem. Pap.* 76, 7263–7274 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02416-5>
- [33] ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΡΟΕΔΡΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΤΡΟΣ Π. ΣΦΗΚΑΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗ- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ. https://docplayer.gr/73615385-Ethniko-kai-kapodistriako-panepistimio-athinon-iatriki-sholi-proedros-kathigitis-petros-p-sfikakis-kliniki-ergastirio-pathofysiologias.html#google_vignette
- [34] Корнацька А.Г., Вовк І.Б., Ревенько О.О. (2019) Морфофункціональні та імуногістохімічні особливості лейоміоматозних вузлів та ендометрія у жінок із лейоміомою матки. Тематичний номер «Гінекологія, Акушерство, Репродуктологія» № 2 (34), червень 2019 р. <https://health-ua.com/article/44041-morfofunkcionaln-ta-munogstohmchn-osoblivost-lejomomatoznh-vuzlv-ta-endome>
- [35] Immunohistochemistry (IHC), Immunofluorescence (IF) Service <https://www.creative-bioarray.com/Services/Immunohistochemistry-IHC.htm>

Бесчасний Сергій Павлович
Гасюк Олена Миколаївна
Шкуропат Анастасія Вікторівна

Імунологічні методи дослідження
в біології та медицині

Навчальний посібник
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності Е1 «Біологія та біохімія»