

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

**Методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Імунобіотехнологія: методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / [уклад. Малишева Х. В.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2025. 226 с.

Рецензент – Мирослава Грицина, доцент, завідувач кафедри фармації та біології, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, к.б.н.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології, протокол № 25 від 3.03.2025 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ІМУНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	8
НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ	10
ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ	11
ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ	13
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Техніка безпеки праці в імунологічній лабораторії. Правила роботи в лабораторії з живими об'єктами та біологічним матеріалом	13
Теоретичні відомості	13
Практична частина.....	20
Контрольні запитання.....	21
ЧАСТИНА 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ.....	21
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Органи та клітини імунної системи	22
Теоретичні відомості	22
Практична частина.....	31
Контрольні запитання.....	32
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Будова та функції імуноглобулінів	33
Теоретичні відомості	33
Практична частина.....	38
Контрольні запитання.....	40
ЧАСТИНА 2. КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ АНТИТІЛ.....	40
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Гібридомна технологія: етапи отримання та виділення моноклональних антитіл.....	41
Теоретичні відомості	41
Практична частина.....	50
Контрольні питання.....	53
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Одержання рекомбінантних моноклональних антитіл методом дисплею.....	53
Теоретичні відомості	54
Практична частина.....	64
Контрольні питання.....	66
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Одержання моноклональних антитіл за допомогою трансгенних тварин.....	67
Теоретичні відомості	67
Практична частина.....	74
Контрольні питання.....	76
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Одержання моноклональних антитіл за допомогою технології одиничних В-клітин	76
Теоретичні відомості	77

Практична частина.....	82
Контрольні питання.....	84
ЧАСТИНА 3. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ НА ОСНОВІ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ	
.....	84
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Серологічні реакції. Реакції преципітації, нейтралізації та зв'язування комплементу.....	85
Теоретичні відомості	85
Практична частина.....	93
Контрольні питання.....	97
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Серологічні реакції. Реакція аглютинації.....	98
Теоретичні відомості	98
Практична частина.....	102
Контрольні питання.....	106
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Імуноферментний аналіз (ІФА).....	106
Теоретичні відомості	106
Практична частина.....	115
Контрольні питання.....	117
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Методи ELISpot і FluoroSpot.....	117
Теоретичні відомості	117
Практична частина.....	123
Контрольні питання.....	125
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Імунохроматографічний аналіз (ІХА)	126
Теоретичні відомості	126
Практична частина.....	135
Контрольні питання.....	136
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Імунофлюоресценція (ІФ)	137
Теоретичні відомості	137
Практична частина.....	141
Контрольні питання.....	143
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Імуногістохімія (ІГХ)	143
Теоретичні відомості	143
Практична частина.....	149
Контрольні питання.....	151
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Імуноцитохімія (ІЦХ)	152
Теоретичні відомості	152
Практична частина.....	158
Контрольні питання.....	160
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №16. Імунопреципітація хроматину (англ. Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	161

Теоретичні відомості	161
Практична частина.....	166
Контрольні питання	168
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №17. Вестерн-блот аналіз	169
Теоретичні відомості	169
Практична частина.....	175
Контрольні питання	177
ЧАСТИНА 4. ОТРИМАННЯ ТРАДИЦІЙНИХ ВАКЦИН	178
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №18. Бактеріальні вакцини для профілактики інфекційних захворювань	178
Теоретичні відомості	178
Практична частина.....	187
Контрольні питання	188
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №19. Вірусні вакцини для профілактики інфекційних захворювань	189
Теоретичні відомості	189
Практична частина.....	195
Контрольні питання	197
ЧАСТИНА 5. РОЗРОБКА НОВІТНІХ ВАКЦИН	197
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №20. Вакцини третього покоління	198
Теоретичні відомості	198
Практична частина.....	203
Контрольні питання	205
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №21. Вакцини четвертого покоління	205
Теоретичні відомості	205
Практична частина.....	209
Контрольні питання	211
ЧАСТИНА 6. ІМУНОТЕРАПІЯ.....	211
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №22. Використання антитіл для лікування онкологічних захворювань	212
Теоретичні відомості	212
Практична частина.....	220
Контрольні питання	221
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	222
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	223
ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ	225

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Імунобіотехнологія» є важливою складовою підготовки майбутніх фахівців у галузі біотехнологій та біоінженерії, забезпечуючи здобувачів вищої освіти необхідними теоретичними знаннями та практичними навичками для роботи у сфері дослідження та застосування імунологічних методів. Вона охоплює фундаментальні аспекти будови і функцій імунної системи, сучасні підходи до отримання моноклональних антитіл, імунологічні методи діагностики та розробку імунобіологічних препаратів.

Метою дисципліни «Імунобіотехнологія» є формування у студентів розуміння ключових імунологічних процесів, набуття навичок застосування сучасних методів імунобіотехнології та аналізу отриманих результатів. Особлива увага приділяється методам отримання терапевтичних антитіл, технологіям імуноферментного аналізу (ІФА), реакціям аглютинації та преципітації, а також новітнім методам діагностики та терапії, таким як ELISpot, імуофлуоресценція, імуногістохімія та ChIP.

Завдання дисципліни включають:

- вивчення структурно-функціональної організації імунної системи, її органів та клітин, а також механізмів специфічної імунної відповіді;
- ознайомлення з методами імунізації, отриманням моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології, фагового дисплею, трансгенних тварин та технологій одиничних В-клітин;
- засвоєння методів імуноаналізу (ІФА, ІХА, реакція аглютинації, преципітації, Вестерн-блот), які широко застосовуються у біотехнології, медицині та фармацевтиці;
- дослідження принципів розробки вакцин та імунотерапевтичних препаратів, що використовуються для профілактики та лікування інфекційних і онкологічних захворювань;
- формування практичних навичок роботи в імунологічній лабораторії, включаючи техніку безпеки, правила роботи з живими об'єктами та біологічними матеріалами.

У результаті вивчення дисципліни здобувачі вищої освіти повинні набути вмінь:

- аналізувати взаємодію антитіл з антигенами, будову та функції імуноглобулінів, механізми утворення імунних комплексів;
- використовувати сучасні методи отримання терапевтичних антитіл, зокрема гібридомну технологію, фаговий дисплей та інші підходи біоінженерії;
- виконувати імунологічні методи ідентифікації антигенів, аналізу імунних реакцій та їх застосування у медичній діагностиці;
- працювати з імунобіологічними препаратами, оцінювати їхню ефективність та можливості використання в терапії.

Ці методичні вказівки спрямовані на допомогу здобувачам у проведенні лабораторних робіт, що дозволяють закріпити теоретичні знання на практиці. Лабораторні завдання охоплюють вивчення морфологічних особливостей органів і клітин імунної системи, аналіз імуноглобулінів, методи отримання та виділення антитіл, а також застосування імуноаналітичних підходів у біотехнологічних і медичних дослідженнях.

Вивчення дисципліни «Імунобіотехнологія» сприятиме формуванню висококваліфікованих спеціалістів, здатних працювати у сфері біотехнології, фармацевтики, діагностичної медицини та розробки імунобіологічних препаратів для профілактики і лікування захворювань.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ІМУНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Сучасна імунологічна лабораторія є високотехнологічним науковим середовищем, призначеним для проведення фундаментальних і прикладних досліджень, пов'язаних із вивченням функцій імунної системи, взаємодії антигенів та антитіл, імунобіологічних препаратів, а також створенням та тестуванням імунотерапевтичних засобів. У межах дисципліни «Імунобіотехнологія» здобувачі вищої освіти виконують практичні роботи з використанням біологічного матеріалу, сироваток, білків, живих клітин, лабораторних тварин, культур мікроорганізмів та сучасних аналітичних методів (ELISA, ELISpot, FluoroSpot, ІГХ, РІФ, ChIP тощо).

Особливістю такої лабораторії є наявність широкого спектра обладнання (мікроскопи, центрифуги, інкубатори, ламінарні бокси, термоциклери, спектрофотометри, мікропланшетні рідери тощо) та використання складних біологічних і хімічних реагентів, що вимагає чіткого дотримання санітарно-гігієнічних норм, правил біологічної безпеки, асептики та стерильності.

Одним із ключових чинників, що впливають на достовірність результатів досліджень, залишається людський фактор. Навіть незначні порушення протоколів або недотримання умов проведення експерименту можуть призвести до некоректних або хибнопозитивних/хибнонегативних результатів. Крім того, одна й та сама методика, виконана в різних лабораторіях без дотримання уніфікованих стандартів, може дати різні результати, що свідчить про важливість чіткої регламентації всіх етапів лабораторного процесу.

У контексті окремих лабораторних тем передбачена робота з живими об'єктами – лабораторними тваринами, ізольованими клітинами і тканинами. Незважаючи на те, що вони не є патогенними для людини, ігнорування правил поводження з біологічним матеріалом може призвести до контамінації культур, спотворення результатів або виникнення біологічних загроз.

Таким чином, дотримання техніки безпеки в імунологічній лабораторії є обов'язковим елементом професійної підготовки фахівців з біотехнології. Відповідальна поведінка, обережне поводження з обладнанням, належне знання властивостей реагентів і процедур поводження з ними, а також системне дотримання внутрішніх лабораторних інструкцій – це запорука ефективного, безпечного та етичного проведення навчальних і наукових експериментів.

Загальні вимоги до організації роботи

1. Доступ до лабораторії дозволяється лише в супроводі викладача або відповідальної особи. Самостійне перебування без дозволу заборонене.
2. Спеціальний одяг (лабораторний халат, закрите взуття) є обов'язковим. Волосся має бути зібране. Руки – вимиті перед і після занять.
3. Особисті речі, їжа, напої, мобільні пристрої та будь-які сторонні предмети в лабораторію приносити заборонено.
4. Категорично заборонено: палити, використовувати відкритий вогонь, торкатися обличчя під час експерименту, залишати робоче місце без дозволу.

5. Після закінчення заняття робоче місце має бути приведене до належного стану: дезінфекція поверхонь, утилізація біоматеріалу та реагентів, очищення інструментів, вимкнення обладнання.

Правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом

1. Робота з живими об'єктами і біологічним матеріалом (тварини, клітини, кров, сироватка) проводиться згідно з інструкціями, із застосуванням засобів індивідуального захисту (рукавички, окуляри, халати).

2. Весь біологічний матеріал вважається потенційно небезпечними. Заборонено торкатися його руками без рукавичок.

3. Після використання зразків необхідно здійснити їх знешкодження згідно з протоколом (автоклавування, дезінфекція).

4. У разі розливу або потрапляння біоматеріалу на шкіру негайно повідомити викладача, обробити місце антисептиком і промити великою кількістю води.

Правила безпеки при роботі з лабораторними тваринами

1. Усі процедури з тваринами проводяться з дотриманням принципів гуманного поводження, мінімізації стресу та болю.

2. Імунізація, ін'єкції, забір крові проводяться лише під наглядом викладача або підготовленого персоналу.

3. Важливо дотримуватись стерильності інструментів та використовувати одноразові витратні матеріали.

4. Після роботи з тваринами необхідно змінити рукавички, дезінфікувати поверхні та інструменти.

Правила безпеки при роботі з хімічними речовинами та реактивами

1. Усі реагенти мають бути позначені та зберігатися відповідно до вимог технічного паспорта безпеки.

2. Робота з легкозаймистими, токсичними, подразнюючими речовинами здійснюється у витяжній шафі з використанням засобів індивідуального захисту.

3. Забір реактивів проводиться лише піпетками з гумовою грушею або автоматичними дозаторами.

4. У разі аварійної ситуації (розлив, займання, опік, поріз) необхідно негайно повідомити викладача.

Правила безпеки при роботі з лабораторним обладнанням

1. Перед використанням приладів необхідно ознайомитися з інструкцією.

2. Забороняється запуск обладнання без перевірки його справності.

3. При виявленні несправностей прилади негайно знеструмлюються та повідомляється викладач.

4. Після завершення роботи прилади вимикаються, очищуються та дезінфікуються.

Особливості роботи при використанні сучасних імунологічних методів

1. Використання таких імунологічних методів як ELISA, ELISpot, імуноферментний аналіз (ІФА), імунохроматографічний аналіз (ІХА), імуноцитохімія (ІЦХ), імунофлюоресценція (ІФ) та імуногістохімія (ІГХ) вимагає строгого дотримання стандартних операційних протоколів, точного дозування реагентів, контролю температурних режимів інкубацій та суворого дотримання термінів інкубації і зберігання реактивів. Будь-яке відхилення від протоколу може призвести до спотворення результатів або зниження чутливості/специфічності методу.

2. Усі відходи, що містять біологічні зразки, антитіла, ферментні мітки, барвники чи інші потенційно небезпечні компоненти, підлягають обов'язковій дезактивації відповідно до чинних вимог біобезпеки (наприклад, автоклавування, обробка дезінфектантами) та правильній утилізації відповідно до категорії безпеки.

3. Перед початком використання будь-якого імунологічного методу необхідно перевірити наявність і справність усіх необхідних компонентів, зокрема:

- позитивних і негативних контролів, що забезпечують валідацію результатів;
- розхідних матеріалів (мікропланшети, піпетки, наконечники, пробірки тощо);
- відповідність термінів придатності реактивів, умов їх зберігання та зовнішній вигляд (відсутність опадів, змін кольору або інших ознак псування).

4. Всі відходи, що містять біологічні матеріали чи антитіла, підлягають дезактивації.

5. Перед початком виконання методів обов'язково перевіряється наявність позитивних і негативних контролів, розхідників та відповідність термінів придатності реактивів.

НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ

✓ При виникненні пожежі у лабораторії необхідно негайно виключити газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском або накрити вовняною ковдрою, шматком азбесту, рушником або залити тетрахлорометаном. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і перекочуючи збивати полум'я. Якщо загорілися дерев'яні предмети, полум'я гасять водою або вогнегасником.

✓ Під час роботи у хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, опіки термічні та хімічні, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.

✓ У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів. Всі працівники у лабораторії повинні бути обізнані з правилами надання першої медичної допомоги. В аптечці лабораторії необхідно мати стерильні бинти та вату, 5%-ий спиртовий розчин йоду, 2%-ий розчин гідрокарбонату натрію, мазь від опіків, лейкопластир, 2%-

ий розчин калій манганату (VII) KMnO_4 , 2%-ий розчин оцтової кислоти, 2%-ий розчин борної кислоти, етанол, піпетки для очей, скляні палички та ножиці.

✓ При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату (VII) KMnO_4 або етанолу $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, а потім наносять мазь від опіків.

✓ При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змазати маззю від опіків.

✓ При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3%-им розчином натрій гідрокарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2%-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

✓ При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди (3%-му), і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

✓ При опіках бромом ушкоджене місце необхідно швидко промити спиртом та змастити маззю від опіків.

✓ У випадку опіку фенолом ушкоджене місце розтирають гліцеролом до відновлення природного кольору шкіри, потім промивають водою і накладають пов'язку з марлі, що змочена у розчині гліцеролу.

✓ При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5%-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

✓ При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

✓ При вдиханні галогенів, галогеноводнів та оксидів Нітрогену потрібно вдихнути спирт або понюхати 5%-ий розчин амоніаку, а потім вийти на свіже повітря.

✓ При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

У всіх випадках опіків, поранень та отруєнь після надання першої допомоги необхідно звернутися до лікаря!

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Всі лабораторні роботи практикуму оформлюються в окремому робочому зошиті. Зошит здається на перевірку викладачу після кожного заняття.

При підготовці до лабораторної роботи з відповідної теми необхідно вивчити теоретичну частину, що стосується даної роботи.

Перед початком лабораторної роботи при співбесіді з викладачем здобувач зобов'язаний:

✓ представити для обговорення план роботи, який детально з виділенням окремих етапів складений у відповідності з методикою роботи і зафіксовано в робочому журналі;

✓ обґрунтувати всі розрахунки і відповідні перерахунки з урахуванням кількостей речовин і об'ємів розчинів, необхідних для напрацювання продукту, щоб можна було використовувати його в подальших методиках;

✓ пояснити хімізм процесів і написати реакції, що лежать в основі цих процесів.

У звіті з лабораторної роботи фіксуються всі записи, що стосуються проміжних і кінцевих результатів аналізу (наприклад, дані про вихід продукту до сушіння, після сушіння тощо).

При захисті лабораторної роботи здобувач викладає не тільки суть даного методу аналізу і констатує кінцевий результат експерименту, але також дає вичерпні відповіді на поставлені питання.

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Техніка безпеки праці в імунологічній лабораторії. Правила роботи в лабораторії з живими об'єктами та біологічним матеріалом

Мета: сформувати базові навички дотримання вимог техніки безпеки та біозахисту під час роботи в імунологічній лабораторії; ознайомитися з правилами поводження з живими біологічними об'єктами, включаючи лабораторних тварин та зразки біологічного матеріалу; вивчити особливості утримання тварин, методи їхньої імунізації та способи отримання крові в умовах лабораторного експерименту з дотриманням етичних норм і стандартів належної лабораторної практики (GLP).

Теоретичні відомості

1. Вимоги до роботи в імунологічній лабораторії.
2. Правила роботи в імунологічній лабораторії.
3. Робота з тваринами в імунологічній лабораторії.
4. Способи імунізації лабораторних тварин.
5. Способи отримання крові у лабораторних тварин.

Вимоги до роботи в імунологічній лабораторії

Організація роботи в імунологічній лабораторії потребує високого рівня точності, стерильності та дотримання принципів біобезпеки. Особливості імунологічних досліджень, що часто включають роботу з біологічними зразками, клітинними культурами, патогенами та лабораторними тваринами, вимагають ретельно спроектованого приміщення, належного технічного забезпечення та кваліфікованого персоналу.

1. Приміщення та планування лабораторії. Імунологічна лабораторія повинна розташовуватися в сухому, добре вентильованому приміщенні з гладкими поверхнями, які легко дезінфікувати. Підлога, стіни, стелі та меблі повинні бути виготовлені з матеріалів, стійких до вологи та агресивних хімічних речовин. Рекомендується наявність системи припливно-витяжної вентиляції з НЕРА-фільтрацією, що відповідає вимогам біобезпеки другого або третього рівня (BSL-2 або BSL-3), залежно від специфіки досліджень.

Оптимальні нормативи площі для лабораторії:

- загальна площа на одного співробітника — 12–14 м²;
- площа індивідуального робочого місця — не менше 0,9 м².

Лабораторія повинна мати:

- окреме приміщення для стерильної роботи з культурами клітин і тканин (з ламінарними боксами класу II);
- зону для виділення та посіву бактерій;
- ділянки для імунохімічних, біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень;
- приміщення для миття та зберігання посуду;

- зону утримання лабораторних тварин (віварій або кімната з ізоляторами);
- окреме приміщення для зберігання реагентів, середовищ, контрольних зразків і відходів.

2. Основне лабораторне обладнання. Імунологічна лабораторія повинна бути оснащена сучасним приладдям для підготовки, виконання і аналізу експериментів. Необхідне обладнання включає:

- *Загальнолабораторні прилади:* водяні бані, сушильні шафи, рН-метри, аналітичні ваги, центрифуги (з охолодженням), холодильники, морозильники -20°C та -80°C , термостати, автоклави.
- *Імуноаналіз:* мікропланшетні спектрофотометри (ридери для ELISA), прилади для імуноферментного аналізу, прилади для електрофорезу та вестерн-блоту.
- *Мікроскопія:* світлові мікроскопи, люмінесцентні мікроскопи, за потреби — флуоресцентні або конфокальні.
- *Ручне обладнання:* автоматичні дозатори (піпетки), гомогенізатори, аспіратори, стерильні фільтри, шейкери, CO_2 -інкубатори (для клітинних культур).

3. Лабораторний посуд та витратні матеріали. Лабораторія повинна мати запас стерильного, чистого та термостійкого посуду:

- пробірки (з кришками та без, пластикові й скляні);
- колби (мірні, плоскодонні), хімічні склянки, чашки Петрі;
- мірні циліндри, піпетки (градуйовані, Пастерівські);
- кристалізатори, ексікатори, лійки, ділильні лійки;
- флакони різної місткості, пробки (гумові, ватно-марлеві), сітки, вату, марлю, шприци.

Після використання лабораторний посуд миють спочатку у розчині миючого засобу, потім — у хромовій суміші (на 1000 мл: 50 г біхромату калію, 100 мл концентрованої H_2SO_4), ретельно промивають водою, сушать при кімнатній температурі або в сушильній шафі, зберігають у спеціальних шафах з кришками або під УФ-лампю.

4. Стерилізація та санітарно-гігієнічні вимоги. Стерилізація посуду, інструментів і середовищ проводиться в автоклаві (при 121°C протягом 20–30 хвилин) або в сухожаровій шафі (при 160 – 180°C до 2 годин). Робочі поверхні обробляються дезінфікуючими засобами (70% етанол, хлоровмісні розчини). Систематично проводиться контроль мікробної контамінації повітря, обладнання та поверхонь.

5. Культуральні середовища для роботи з імунними клітинами. Для культивування лімфоцитів та інших імунокомпетентних клітин використовують спеціалізовані середовища: Ігла, Хенкса, 199, RPMI-1640, DMEM, до яких додають:

- ембріональну телячу сироватку (10–20%);
- антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин В) — для запобігання контамінації;
- глутамін, буфери (Hepes), іноді інтерлейкіни або інші стимулятори проліферації.

Імунологічна лабораторія повинна відповідати міжнародним стандартам (GLP, ISO 15189, EN 12128), а її персонал — пройти інструктажі з біобезпеки та охорони праці. Від правильного облаштування, стерильності та точності виконання процедур залежить не лише достовірність отриманих результатів, а й безпека людей, тварин та навколишнього середовища.

Правила роботи в імунологічній лабораторії

Робота в імунологічній лабораторії передбачає дотримання суворих правил техніки безпеки, біозахисту та гігієни. Це обумовлено необхідністю запобігання контамінації зразків, інфікування персоналу та поширення потенційно небезпечних біологічних агентів у навколишнє середовище. Усі співробітники лабораторії зобов'язані дотримуватись таких правил:

1. Завжди працювати у спеціальному лабораторному одязі. Вхід до лабораторії дозволений лише в чистому лабораторному халаті, який зберігається окремо від повсякденного одягу. При роботі з інфекційними або потенційно небезпечними зразками рекомендовано також використовувати одноразові фартухи, бахіли, головні убори.

2. При роботі з біологічним матеріалом (кров, сироватка, клітини) обов'язково використовувати одноразові гумові або нітрилові рукавички. Рукавички змінюють при переході від одного зразка до іншого або в разі пошкодження. Після використання їх утилізують як біологічні відходи.

3. Прийом їжі, пиття та зберігання харчових продуктів у лабораторії суворо заборонено. Для цього мають бути спеціально відведені зони, ізольовані від зони проведення досліджень. Це правило також стосується використання мобільних телефонів, косметичних засобів, контактних лінз тощо.

4. Після завершення роботи необхідно ретельно вмити руки з милом та обробити їх антисептиком. Гігієна рук — ключовий елемент профілактики лабораторного інфікування. Обробка рук обов'язкова також перед виходом з лабораторії та після зняття ЗІЗ (засобів індивідуального захисту).

5. Увесь лабораторний посуд, інструменти та витратні матеріали, що контактували з біоматеріалом, підлягають обов'язковій дезінфекції або стерилізації. Для цього використовують:

- автоклавування (при 121°C, 20–30 хв),
- хімічну обробку дезінфікуючими засобами (наприклад, хлоровмісними або на основі четвертинних амонієвих сполук).

Використані одноразові матеріали утилізуються відповідно до категорії біовідходів.

6. Після завершення роботи необхідно продезінфікувати всі робочі поверхні. Стіл, ручки дозаторів, ламінарні бокси, кришки контейнерів обробляють 70% етанолом або іншим відповідним антисептиком. Обробка робочих поверхонь проводиться також до початку роботи, між змінами зразків і при випадковому розливі біологічного матеріалу.

Додатково рекомендується:

- Проводити регулярний інструктаж з біобезпеки персоналу та вести журнал інструктажів.

- Вести журнали обліку використаних реагентів, утилізації відходів та інцидентів.
- Забезпечити наявність аварійного набору (розчини для нейтралізації, сорбенти, пластирі, інструкції дій при надзвичайних ситуаціях).
- Використовувати захисні окуляри, маски або щитки під час маніпуляцій, пов'язаних із ризиком утворення аерозолів або розбризкування рідин.

Дотримання цих правил не лише забезпечує безпечне середовище праці, але й є запорукою якісних та достовірних результатів імунологічних досліджень, відповідно до вимог GLP та стандартів біоетики.

Робота з тваринами в імунологічній лабораторії

Для проведення імунологічних досліджень найчастіше використовують дрібних лабораторних тварин — мишей, щурів, морських свинок, кроликів, рідше — більших ссавців, таких як барани, свині, віслюки, а також птахів (курей, качок), які можуть бути джерелом отримання імунної сироватки або антитіл. Сучасні підходи передбачають також використання генетично модифікованих тваринних моделей (наприклад, трансгенних або нокаут-мишей) для вивчення імунних механізмів на молекулярному рівні.

Тварини утримуються у спеціалізованих приміщеннях — **віваріях**, які повинні відповідати вимогам біоетики, біобезпеки та стандартів **Good Laboratory Practice (GLP)**. Віварії облаштовуються окремими зонами для різних видів тварин та процедур, мають належну систему вентиляції, освітлення, контроль температури, вологості та фільтрації повітря. Підлога повинна мати нахил у бік каналізаційного стоку для зручності санітарної обробки, стіни вкривають вологостійкими, легко мийними матеріалами (наприклад, кахлем).

Вибір тварин для імунологічних експериментів є надзвичайно важливим і базується на низці критеріїв: вид, лінія, вік, стать, генетичні характеристики, фізіологічний стан та індивідуальна чутливість до антигенів. З метою зменшення варіабельності результатів та мінімізації кількості тварин, рекомендується використовувати чистолінійних (інбредних) тварин, які мають стабільний і передбачуваний імунологічний профіль. Такі тварини отримані шляхом тісного схрещування протягом ≥ 20 поколінь і є гомозиготними за більшістю локусів.

Станом на сьогодні описано понад 200 ліній мишей, близько 20 ліній щурів, 7 ліній морських свинок та декілька стабільних ліній кроликів. Найпоширенішими моделями у фундаментальних і прикладних імунологічних дослідженнях є миші ліній CBA, C57BL/6, C3H, а також щури ліній Вістар і Август. Також все частіше використовуються «humanized» моделі тварин, які містять вбудовані людські гени або імунні системи для моделювання імунної відповіді людини.

Важливо враховувати, що інбредні тварини мають знижену життєздатність, тому потребують спеціальних умов утримання, збалансованого харчування, обмеженого стресу та ретельного ветеринарного контролю. До досліджень допускаються лише клінічно здорові тварини, однорідні за вагою, віком та статтю, що забезпечує відтворюваність результатів.

Усі тварини повинні бути ідентифіковані (нумерація, мітки, чіпи). Важливо максимально уникати стресогенних факторів (шуму, різких запахів,

больових подразників), оскільки стрес суттєво впливає на стан імунної системи та спотворює результати дослідів.

У сучасній практиці робота з лабораторними тваринами підлягає **етичному регулюванню**, зокрема, відповідно до принципів **3R (Replacement, Reduction, Refinement)**, які передбачають:

- **заміну** тварин альтернативними методами, коли це можливо;
- **зменшення** кількості використаних тварин без втрати наукової цінності;
- **вдосконалення** умов утримання і методів проведення досліджень для мінімізації страждань тварин.

Усі процедури з використанням лабораторних тварин мають проводитися за погодженням з локальним комітетом з біоетики та відповідати національним і міжнародним нормативним документам у сфері експериментальної біомедицини.

Способи імунізації лабораторних тварин

Імунізація лабораторних тварин є ключовим етапом у проведенні доклінічних імунологічних досліджень. Її мета — індукувати специфічну імунну відповідь на введений антиген, що дозволяє вивчати механізми імунітету, отримувати імунні сироватки, моноклональні або поліклональні антитіла, а також створювати експериментальні моделі хвороб. Вибір методу імунізації залежить від виду тварини, типу антигену, бажаного ефекту (системна чи локальна імунна відповідь), а також практичних особливостей проведення процедури.

Найбільш поширеними способами імунізації лабораторних тварин є внутрішньошкірне, підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревне, внутрішньовенне, інтраназальне та оральне введення антигену.

Внутрішньошкірне введення (intradermal) застосовується для стимуляції місцевої імунної відповіді. Перед ін'єкцією шерсть на ділянці введення видаляють, шкіру обробляють спиртом. Тонкою голкою проколюють шкіру майже паралельно до поверхні тіла та вводять 100 мкл розчинного антигену. Завдяки густій лімфатичній мережі шкіри, антиген швидко досягає регіональних лімфатичних вузлів, індукуючи імунну відповідь.

Підшкірне введення (subcutaneous) забезпечує повільне поширення антигену, що сприяє тривалішій стимуляції імунної системи. Ін'єкцію проводять у бічну частину спини або живота, попередньо підготувавши місце так само, як і при внутрішньошкірному введенні. Шкіру збирають у складку, голку вводять біля основи, потім відхиляють убік і повільно вводять антиген. Максимальний об'єм антигену залежить від виду тварини: для мишей — до 1 мл, щурів — до 10 мл, морських свинок — до 15 мл, кроликів — до 30 мл.

Внутрішньом'язове введення (intramuscular) забезпечує поступове вивільнення антигену внаслідок поглинання його м'язовою тканиною. Ін'єкцію проводять у м'яз стегна. Місце введення обробляють спиртом. Максимальні дози: для мишей — 0,5 мл, для щурів — 3 мл, морських свинок — 5 мл, кроликів — 8 мл.

Внутрішньочеревне введення (intraperitoneal) часто використовується у мишей як один із найзручніших способів системної імунізації. Тварину фіксують

головою вниз для зменшення ризику перфорації кишечника. Голку вводять у нижній третині черевної порожнини трохи вбік від середньої лінії. Дозування: мишам — до 2 мл, щурам — до 5 мл, морським свинкам — до 10 мл, кроликам — до 30 мл.

Внутрішньовенне введення (intravenous) забезпечує негайне надходження антигену в кровотік, що викликає швидку імунну відповідь. У мишей та щурів антиген вводять у бічну вену хвоста після її прогрівання (50–55°C) для полегшення доступу. У кроликів використовують крайову вену вуха.

Інтраназальне введення (intranasal) антигену моделює природний шлях інфікування через слизові оболонки. Перед введенням тварину фіксують та, за потреби, короткочасно анестезують. Антиген у рідкій формі вводять краплями в кожную ніздрю за допомогою піпетки або шприца без голки. Об'єм розчину залежить від виду тварини: мишам — 0,03–0,05 мл, щурам — 0,05–0,1 мл, морським свинкам — 0,2–0,4 мл, кроликам — до 1 мл.

Оральне введення (per os) застосовується для стимуляції мукозального імунітету шлунково-кишкового тракту. Антиген вводять за допомогою гумового або металевого зонда, або шприца з оливоподібною головкою без голки. Цей метод особливо ефективний у дослідженнях ентеральної імунізації, при вивченні дії пробіотиків, пероральних вакцин або рекомбінантних бактерій.

У сучасних імунологічних дослідженнях активно впроваджуються новітні підходи до імунізації, зокрема:

- використання ад'ювантів нового покоління (наприклад, SAF01, MPL, QS-21), які сприяють посиленню та пролонгуванню імунної відповіді;
- застосування наночастинок, ліпосом, вірусоподібних частинок для більш ефективного доставлення антигенів;
- розробка ДНК- та мРНК-вакцин, що дозволяють індукувати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь;
- впровадження трансдермального введення антигенів за допомогою мікроголкових систем, що дозволяє зменшити стрес у тварин і підвищити ефективність процедури.

Усі методи імунізації повинні проводитися з урахуванням етичних принципів (3R) та за погодженням з локальним комітетом з біоетики. Обов'язковим є дотримання правил фіксації тварин, використання стерильного інструментарію, контроль за фізіологічним станом тварини до і після введення, а також точне документування проведених маніпуляцій. Правильно вибраний спосіб імунізації є критично важливим для отримання надійних, відтворюваних результатів та забезпечення добробуту лабораторних тварин.

Способи отримання крові у лабораторних тварин

Забір крові у лабораторних тварин є невід'ємною частиною експериментальних імунологічних досліджень, оскільки кров слугує джерелом сироватки, клітин імунної системи, а також інших біомолекул. Вибір методу кровозабору залежить від виду тварини, об'єму необхідного біоматеріалу, частоти процедур, цілей дослідження та рівня інвазивності. Важливу роль відіграє дотримання принципів біоетики та зменшення стресу у тварин.

1. Забір крові з хвоста (у мишей та щурів). Цей метод належить до мінімально інвазивних і використовується для повторного отримання невеликих об'ємів крові (до 0,2 мл). Перед забором хвіст занурюють у водяну баню при температурі 50–55°C на 1–2 хвилини для розширення судин. Потім за допомогою стерильного леза або скальпеля надрізають дистальну частину хвоста. Після процедури місце надрізу обробляють 3% розчином перекису водню або 5% розчином йоду для профілактики інфікування та зупинки кровотечі.

***Переваги:** простота, можливість багаторазового використання.*

***Обмеження:** непридатний для великого об'єму крові; можливий розвиток запалення при багаторазовому заборі.*

2. Ретроорбітальний кровозабір (у мишей та щурів). Це досить поширений метод отримання периферичної крові, що дозволяє отримати до 1 мл біоматеріалу. Процедура проводиться під наркозом. Пастерівську піпетку або мікрокапіляр вводять у медіальний кут ока через кон'юнктиву на глибину 2–4 мм у напрямку до ретроорбітального венозного синуса. Кров надходить пасивно у капіляр під дією тиску.

***Переваги:** швидке отримання великого об'єму крові.*

***Недоліки:** високий ризик травмування ока, зниження зору, біль. Метод має бути виправданим з наукової та етичної точки зору і застосовуватись лише з відповідного дозволу комітету з біоетики.*

3. Кардіоцентез (забір крові з серця). Цей метод дозволяє отримати максимальний об'єм крові (до 90% циркулюючого об'єму), зазвичай при термінальній (заклучній) процедурі. Тварину попередньо анестезують і фіксують у положенні на спині. Після дезінфекції грудної клітки визначають місце серцевого поштовху та, відступивши 2–5 мм ліворуч від грудини, вводять голку на глибину 0,5–1,0 см у напрямку до центру. Забір проводиться повільно, шприцом із гепарином або в стерильну пробірку. Після процедури, якщо тварина продовжує брати участь у дослідженні, підшкірно вводять подвійний об'єм підігрітого ізотонічного розчину натрію хлориду.

***Переваги:** отримання великої кількості крові.*

***Обмеження:** високий рівень інвазивності, допустимий лише під загальною анестезією та, як правило, в рамках термінального експерименту.*

4. Забір крові з вушної вени (у кроликів). Для отримання невеликого або середнього об'єму крові (0,5–10 мл) у кроликів використовують крайову вену вуха. Вуха попередньо зігрівають або масажують для кращого наповнення вен. Кров забирають стерильним шприцом або за допомогою вакуумної пробірки. Після процедури місце проколу обробляють антисептиком, а при необхідності — накладають тиск або охолоджуючий компрес для зупинки кровотечі.

***Переваги:** добре видима вена, відносно проста процедура.*

***Недоліки:** потребує фіксації та обережного поводження для уникнення гематом.*

Сучасні підходи та етичні аспекти. Усі процедури з отримання крові повинні проводитися у суворій відповідності до етичних принципів (3R) та вимог комітету з біоетики. Використання анестезії або аналгезії є обов'язковим у всіх випадках болісного або стресового втручання. Уникнення багаторазових інвазивних процедур, точний облік кількості відібраної крові та відновлення

об'єму за допомогою інфузій — ключові вимоги до підтримки добробуту лабораторних тварин.

Окрім традиційних методів, у сучасній практиці все частіше застосовуються неінвазивні способи моніторингу імунних параметрів (наприклад, аналіз слізної рідини, слини або мікрокрапельної крові), що дозволяє зменшити частоту та обсяг інвазивних втручань.

Практична частина

Тема. Засвоєння техніки безпеки праці в імунологічній лабораторії та ознайомлення з правилами роботи з живими об'єктами та біологічним матеріалом

Матеріали: інформаційні довідки щодо рівнів біобезпеки (BSL 1–4) та класифікації біологічних агентів; презентації або відеоматеріали з техніки безпеки в імунологічній лабораторії та правил поводження з біологічним матеріалом; таблиці з алгоритмами надягання/зняття засобів індивідуального захисту, інструкції дій при аваріях (розлив, поріз, розбиття пробірки); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описом типових лабораторних ситуацій і помилок для обговорення в малих групах); доступ до мережі Інтернет (для перегляду відеоінструкцій, нормативних актів або додаткового пошуку інформації під час заняття).

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для презентації групових напрацювань; набір маркерів для роботи в групах; листки з кейсами або прикладами критичних ситуацій у роботі з біологічними зразками (для аналізу та розробки алгоритму дій); комп'ютер і мультимедійний проектор (за потреби — для демонстрації презентацій і відеоматеріалів); зошити або блокноти для індивідуального занотовування основних правил техніки безпеки, висновків і аналізу ситуацій.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з інструкцією з техніки безпеки в імунологічній лабораторії.

1. Вивчити нормативні вимоги до роботи з патогенними біологічними агентами (відповідно до рівня BSL).

2. Засвоїти принципи використання ЗІЗ.

Завдання 2. Підготуйтеся до роботи.

1. Надягти захисний халат, рукавички, маску (за потреби — захисні окуляри/щиток).

2. Продезінфікувати робочу поверхню.

3. Перевірити наявність контейнерів для відходів, антисептиків, аварійного набору.

Завдання 3. Проведіть імітаційну роботу з біологічним матеріалом.

1. Умовно прийняти, маркувати та розмістити зразки біоматеріалу для подальшої обробки.

2. Відпрацювати техніку маніпуляцій у ламінарному боксі: відкриття пробірок, перенесення рідин, запобігання утворенню аерозолів.

3. Дотримуватись правил роботи з піпетками, шприцами, голками.

Завдання 4. Засвойте правила утилізації.

1. Розділити відходи на категорії (біологічні, гострі, загальні).
2. Помістити використані ЗІЗ та імітаційні зразки у відповідні контейнери для знезараження та подальшого знищення.

Завдання 5. Проведіть симуляцію аварійної ситуації (розлив біоматеріалу).

1. Повідомити керівника лабораторії.
2. Обмежити зону розливу, продезінфікувати поверхню згідно з інструкцією.
3. Провести утилізацію залишків і ЗІЗ, замінити рукавички.

Завдання 6. Зняття захисного одягу після завершення роботи.

1. Зняти халат, рукавички та інші елементи ЗІЗ без доторку до зовнішньої поверхні.
2. ПрODEЗІНФІКУВАТИ руки.
3. Занести відомості про виконання роботи до лабораторного журналу.

Контрольні запитання

1. Які функціональні зони повинна містити сучасна імунологічна лабораторія для забезпечення повного циклу дослідження?
2. Який алгоритм миття, дезінфекції та зберігання лабораторного посуду, що використовувався в роботі з біоматеріалом?
3. У чому полягає відмінність між стерилізацією автоклавуванням і сухожаровою обробкою? Для яких матеріалів ці методи застосовуються?
4. Які антисептики та дезінфікуючі засоби рекомендовані для обробки робочих поверхонь і устаткування в імунологічній лабораторії?
5. Які міжнародні стандарти та принципи належної лабораторної практики (GLP) регулюють організацію роботи в імунологічних лабораторіях?
6. У чому полягає відмінність між внутрішньошкірним та підшкірним введенням антигену щодо швидкості формування імунної відповіді?
7. Які анатомічні ділянки найчастіше використовуються для внутрішньом'язової ін'єкції у мишей, щурів та кроликів?
8. Чому внутрішньочеревне введення вважається зручним методом системної імунізації у дрібних лабораторних тварин?
9. Які переваги має внутрішньовенне введення антигену, і в яких ситуаціях його застосування є доцільним?
10. Для чого використовують інтраназальний спосіб імунізації, і які типи імунної відповіді він стимулює?
11. Які етичні принципи необхідно враховувати при виборі методу імунізації, і яку роль у цьому процесі відіграє локальний комітет з біоетики?

ЧАСТИНА 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

Вивчення структурно-функціональної організації імунної системи є ключовим етапом у розумінні механізмів імунного захисту організму. Імунна система складається з центральних і периферичних органів, а також

спеціалізованих клітин, які забезпечують захист від патогенів, підтримують гомеостаз та здійснюють імунну пам'ять.

Лабораторні дослідження, присвячені структурі та функціям імунної системи, дозволяють здобувачам вищої освіти вивчити морфологічні особливості імунних органів, зокрема селезінки, тимуса та лімфатичних вузлів, а також ознайомитися з основними типами клітин, які беруть участь у формуванні імунної відповіді. Аналіз мазків периферичної крові дає можливість ідентифікувати різні види лейкоцитів та зрозуміти їхню функціональну роль у захисті організму.

Окрему увагу приділено будові та функціям імуноглобулінів – антитіл, що є ключовими молекулами гуморального імунітету. Практичне застосування методу радіальної дифузії в гелі (метод Манчіні) дозволяє визначити рівень імуноглобулінів у сироватці крові та оцінити стан імунної системи.

Засвоєння цих тем забезпечує здобувачам глибоке розуміння основних механізмів функціонування імунної системи, що є необхідним для подальшого застосування знань у сфері біотехнології, імунології та медицини.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Органи та клітини імунної системи

Мета: ознайомитися з будовою та функціональною організацією центральних і периферичних органів імунної системи людини; дослідити морфологічну структуру селезінки миші під час мікроскопування гістологічного препарату; провести ідентифікацію основних типів клітин імунної системи в мазку периферичної крові людини; сформулювати уявлення про взаємодію імунокомпетентних клітин і органів у реалізації імунної відповіді.

Теоретичні відомості

1. Центральні і периферичні органи імунної системи.
2. Загальна характеристика клітин імунної системи.
3. Взаємодія органів та клітин імунної системи.

Центральні і периферичні органи імунної системи

До центральних органів імунної системи належать тимус, кістковий мозок, сумка Фабриція (у птахів), в яких стовбурові гемопоетичні клітини диференціюють до лімфоцитів (етап антигенного диференціювання). Центральні органи імунної системи містяться в добре захищених від зовнішнього впливу місцях. Так, кістковий мозок знаходиться в кістковомозковій порожнині, а тимус – в грудній порожнині позаду широкої і міцної грудини. В центральних органах імунної системи лімфоїдна тканина перебуває у своєрідному мікрооточенні. В кістковому мозку таким середовищем є мієлоїдна тканина, а в тимусі – епітеліальна тканина, яка розвивається із ембріональної епітеліальної закладки зябрових кишень.

Кістковий мозок – орган, що містить мультипотентні гемопоетичні стовбурові клітини (СК), які здатні забезпечувати організм всіма типами клітин крові – кровотворні СК (джерело утворення імунокомпетентних клітин). Крім того в кістковому мозку знаходяться клітини лімфоїдного ряду на початкових стадіях свого розвитку, оточені складною ретикулярною системою епітеліальних

клітин, які складають специфічне мікрооточення дозріваючим імуніцитам. Саме тут розпочинають своє дозрівання як Т-, так і В-лімфоцити. В подальшому Т-лімфоцити залишають червоний кістковий мозок і мігрують до тимусу, де відбуваються завершальні етапи антигеннезалежної диференціації цих клітин. Антигеннезалежна диференціація В-лімфоцитів повністю відбувається в червоному кістковому мозку.

Тимус – центральний орган імунної системи, де відбуваються завершальні етапи антигеннезалежної диференціації Т-лімфоцитів. Тимус здійснює синтез низки гормоноподібних речовин пептидної природи, необхідних для дозрівання і диференціювання Т-лімфоцитів: тимопоетин, тимозин, гуморальні та сироваткові тимічні фактори, тимулін. В організмі людини тимус дозріває до періоду статевої зрілості, досягаючи в цей час максимальної активності. Після цього відбувається його вікова інволюція.

Морфологічно в тимусі *медулярну* і *кіркову зони*. З червоного кісткового мозку незрілі Т-лімфоцити прибувають до кіркового шару тимусу, а по мірі дозрівання переміщуються до мозкового. З мозкового шару зрілі Т-клітини залишають тимус й надходять до лімфатичних вузлів різної локалізації. Належні умови для антигеннезалежної диференціації лімфоцитів забезпечуються функціонуванням так званого гематотимічного бар'єру. Слід відзначити, що більшість Т-лімфоцитів, що надійшли до тимусу, гинуть шляхом апоптозу. Виживають тільки ті клітини, рецептори яких мають середній ступінь спорідненості до власних антигенів. Аутореактивні Т-лімфоцити, що надто активно реагують при взаємодії з власними антигенами, і функціонально неповноцінні Т-клітини, нездатні розпізнавати аутоантигени, неминуче гинуть.

Специфічне мікрооточення для дозріваючих тимоцитів складають тимічні епітеліальні та дендритні клітини. Саме вони експресують аутоантигени для відбору функціонально повноцінних, проте безпечних щодо ініціації аутоімунних реакцій Т-лімфоцитів.

Сумка Фабриція – імунологічний орган у птахів, де утворюються і дозрівають В-лімфоцити. У людей поки що такий орган офіційно не встановлено.

Оскільки в центральних органах імунної системи здійснюється антигеннезалежна диференціація (без контакту зі специфічним антигеном), в них формуються хоча і повноцінні з функціонального боку, але абсолютно «недосвічені» клітини (так звані «наївні» лімфоцити). Компетентність вони набувають на стадії антигензалежної диференціації, яка відбувається в периферійних органах імунної системи.

До складу периферичних органів належать: лімфатичні вузли, пейєрові бляшки, селезінка, кров, апендикс, мигдалики.

Лімфатичні вузли поширені по всьому організму і сполучаються між собою та іншими лімфоїдними органами за допомогою лімфатичних судин. Завдяки існуванню лімфатичних вузлів увесь організм поділяється на своє рідні зони, за кожною з яких відповідає певна група лімфовузлів. Відомо, що міжклітинна рідина перебуває в стані постійного оновлення. Утворюючись шляхом фільтрації з плазми крові, вона відтікає з тканини по лімфатичним судинам, які сходяться в колекторах – лімфатичних вузлах. Така організація

обміну тканинної рідини дозволяє імунокомпетентним клітинам лімфовузлів безперервно контролювати антигенний склад міжклітинної речовини своєї зони.

Лімфатичні вузли здійснюють затримання й елімінацію антигенів із тканинної рідини та лімфи від периферії до грудної протоки. Людина має 500 – 1000 лімфовузлів розміром від 2 до 8 мм. Лімфовузол складається з трьох шарів: зовнішнього – кіркового; внутрішнього – мозкового і розташованого між ними – паракортикального шару.

Кірковий шар – це в основному В-зона. В кірковому шарі містяться декілька фолікулів – так званих В-залежних зон, в яких перебігають процеси проліферації і диференціації В-лімфоцитів. Первинні фолікули кіркового шару містять В-лімфоцити у стані спокою. Вторинні фолікули утворюються за умов активації В-лімфоцитів антигеном, що потрапив у лімфовузол із первинного фолікула. Вторинні фолікули є місцем утворення В-клітин пам'яті та клітин антитілопродуцентів. В міжфолікулярному просторі містяться як В- так і Т-лімфоцити, макрофаги. Паракортикальний шар – це Т-залежна зона. В цій зоні інтердигітальні дендритні клітини експресують значну кількість молекул МНС класу II і здійснюють презентацію тимусзалежних антигенів Т-лімфоцитам. Мозкова зона містить Т- і В-лімфоцити, плазматичні клітини та макрофаги.

У лімфатичних вузлах відбувається розвиток як клітинної так і гуморальної імунної відповіді. Вони відіграють важливу роль у реакціях гіперчутливості сповільненого типу та реакціях трансплантаційного імунітету.

Селезінка – периферійний орган імунної системи, що поєднує функцію імуногенезу з функцією елімінації старих формених елементів крові. За образним порівнянням Р.М. Хайтова, селезінка є своєрідною «митницею» організму, яка здійснює контроль антигенного складу об'єктів, що надійшли на слизові оболонки або до системного кровообігу.

Селезінка складається з білої та червоної пульпи. Зовнішньо селезінка вкрита сполучною тканинною капсулою, від якої відходять сполучнотканні тяжі (трабекули), які пронизані капілярними судинами. В червоній пульпі містяться макрофаги, які здійснюють фагоцитоз відпрацьованих формених елементів крові, а також різних патогенів, що перебувають у плазмі крові. Біла пульпа являє собою лімфоїдні фолікули, в яких в основному знаходяться малі лімфоцити тимусного і кістковомозкового походження. При цьому Т- і В-лімфоцити локалізуються в певних зонах лімфоїдних фолікулів. Т-лімфоцити локалізуються в периартеріальних зонах, а В-лімфоцити знаходяться в перифолікулярних зонах. Між лімфоїдними фолікулами та червоною пульпою знаходиться маргінальна зона, в якій знайдено Т- і В-лімфоцити, плазматичні клітини, ретикулоцити. Строма селезінки складається із таких типів ретикулярних клітин: незрілі стовбурові клітини, дендритні клітини, фагоцити. Морфологічно лімфоїдні клітини селезінки диференціюються на малі, середні, великі лімфоцити, лімфобласти, плазмобласти, плазматичні клітини. В селезінці немає лімфатичних судин, клітинний обмін між лімфоїдною тканиною та кров'ю відбувається через трабекули і ретикулярну тканину. Лімфоїдна тканина селезінки приймає участь в імунних реакціях гуморального типу. При внутрішньовенному введенні антигенів продукція антитіл головним чином відбувається в селезінці.

У складі слизових оболонок містяться скупчення лімфоїдних елементів (апендикс, пейєрові бляшки тощо), які складають морфологічний субстрат так званої лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовими, яка функціонує до певної міри автономно від системного імунітету. *Пейєрові бляшки* – це скупчення лімфатичних фолікулів в підслизовому шарі стінки тонкого кишківника. Вони являють собою скупчення окремих зародкових центрів, що оточені компактними скупченнями лімфоцитів, які подібні лімфоцитам коркового шару сумки Фабриція. Лімфатичні судини виходять із ворсин кишківника і лімфа, що відтікає від кишківника потрапляє в систему грудного протоку. До цих пір немає однозначної відповіді про статус пейєрових бляшок – чи це центральний орган імунної системи, чи периферійний.

Загальна характеристика клітин імунної системи

Всі клітини імунної системи утворюються зі стовбурової кровотворної клітини, яка локалізується в кістковому мозку. В подальшому їх розвиток може проходити або на шляху лімфопоезу, або мієлопоезу. По першому шляху розвиваються лімфоцити. Всі інші лейкоцити розвиваються по шляху мієлопоезу.

Всі відомі клітини імунітету можна об'єднати в декілька великих груп, в залежності від виконуваних ними функцій. Пропонують виділяти:

- Фагоцити (макрофаги та нейтрофіли), здійснюють як правило функції фагоцитозу;
- Гранулоцити (еозинофіли, тучні клітини, базофіли і тромбоцити), виконують функції позаклітинного цитолізу мішеней;
- Антигенпрезентуючі клітини (різноманітні популяції дендритних клітин), які представляють антиген для лімфоцитів;
- Ендотеліальні та інші клітини, що формують мікро оточення клітин імунітету;
- Лімфоцити – які реалізують основні функції специфічної імунної відповіді.

Ці клітини мають на своїй поверхні спеціальні молекули, які допомагають здійснювати взаємодію між собою та виконувати притаманні їм функції.

Фагоцитуючі клітини. Не дивлячись на те, що фагоцитуючими властивостями можуть володіти майже всі клітини організму, в даному випадку мова йде тільки про «професійні» фагоцити. До цієї групи можна включити тільки два різновиди клітин:

- моноцити і локалізовані в органах макрофаги, які всі разом об'єднують в систему мононуклеарних фагоцитів;
- нейтрофіли (мікрофаги) – одна із самих багато численних популяцій клітин білої крові.

Ці клітини знаходяться в першому ряді розвитку захисних реакцій. Зазвичай вони першими контактують з мікроорганізмами та паразитами, які потрапляють в організм, і, як правило, забезпечують їх загибель. Коли самотійно не можуть їх знешкодити, вони ініціюють цілий каскад реакцій, які запускають механізм специфічної імунної відповіді, при якій їх кіллерна властивість по відношенню до збудника зростає багаторазово.

Моноцити продукуються в дорослому організмі від стовбурових кровотворних клітин, а в ембріоні – із жовчного міхура та печінки. Дозріваючи в кістковому мозку до стадії моноцита, ці клітини надходять в кров, де циркулюють на протязі 2-5 днів. Після чого вони мігрують в різноманітні органи із моноцитів перетворюються на макрофаги. Тривалість їхнього життя коливається від 20 діб до 6-7 місяців, в залежності від субпопуляції і локалізації в органі. Моноцити та локалізовані в органах макрофаги об'єднують в систему моноклеарних фагоцитів.

Моноцити представляють собою крупні клітини округлої форми, з характерним підковоподібним ядром. Тканинні макрофаги, як правило, крупніші моноцитів та мають неправильну форму. Електронно-мікроскопічним аналізом ультраструктури моноцитів показано, що їх мембрана має виражену складчастість. Комплекс Гольджі добре розвинутий. В цитоплазмі є велика кількість гранул лізосом, які містять різноманітні ферменти.

Локалізація моноклеарних фагоцитів надзвичайно різноманітна. Як правило, вони вистилають та контролюють ті місця, які найбільш сприятливі для проникнення інфекції в організм. В залежності від локалізації виділяють наступні групи:

- клітини Купфера (зіркоподібні ретикулоендотеліоцити печінки);
- альвеолярні макрофаги (розміщені в порожнині між кровоносними судинами альвеол та повітряним шаром в легенях);
- перитонеальні макрофаги (локалізовані на серозних оболонках черевної порожнини);
- макрофаги лімфоїдних тканин;
- макрофаги нирок;
- мікроглія мозку.

Функціональна роль системи моноклеарних фагоцитів також різноманітна. Але основними функціями є:

- *кілерна функція* – здійснюється за рахунок позаклітинного цитолізу та фагоцитозу.
- *антигенпрезентуюча функція* – макрофаги можуть також виконувати процесінг та презентацію лімфоцитам антигенного матеріалу.
- *секреторно-регуляторна функція* – макрофаги секретують цілий спектр різноманітних молекул, які виконують регуляторну роль, тобто здатні активувати або приглушувати інтенсивність імунної відповіді.
- *участь в репаративних процесах* – приймають активну участь в процесах репарації тканин через систему фіброгенезу, а також сприяють прискореному росту кровоносних судин.

Нейтрофіли представляють собою одну з найчисленніших популяцій циркулюючих лейкоцитів. Їх процентний склад у різних видів ссавців коливається у межах 40-60%. Як і всі клітини білої крові, нейтрофіли продукуються стовбуровими клітинами кісткового мозку. Це невеликі клітини поліморфної форми. Для них характерне багатодольчатє сегментоване ядро, а також наявність в цитоплазмі великої кількості гранул. Крім циркулюючої корві

нейтрофіли містяться в інших паренхіматозних органах, локалізуючись, як правило, навколо кровоносних судин.

Функції цих клітин надзвичайно різноманітні та відіграють важливу роль в розвитку бактерицидних та цитолітичних реакцій, в патогенезі запалення та фіброгенезі.

Характерною рисою діяльності нейтрофілів є швидкість та інтенсивність розвитку реакції. Вони першими вступають в контакт з патогеном та являються ініціаторами каскаду імунних реакцій. Цьому сприяє їх мобільність та багато численність.

Основні функції:

1. Фагоцитарна функція (внутрішньоклітинний кілінг).
2. Внутрішньоклітинний цитоліз.
3. Секреторно-регуляторна функція.
4. Ініціація запальних реакцій.
5. Участь в процесах звертання крові

Гранулоцити та тромбоцити. Клітини цієї групи об'єднує не тільки споріднене походження, але і багато численні морфологічні та функціональні особливості. Їх цитоплазма заповнена великою кількістю гранул, які містять токсичні для бактерій та паразитів речовини. Тому їх основний кіллерний ефект виникає в результаті звільнення таких речовин із гранул у позаклітинний простір. Ці процеси включаються після отримання клітиною відповідних сигналів і проходить досить інтенсивно. Клітини даної групи містяться в циркулюючій крові у досить незначній кількості. Локалізовані вони переважно у тканинах.

Еозинофіли – лейкоцити, яких серед білих клітин крові досить незначна кількість (2-5%). Це крупні клітини з двохдольчатим ядром. Цитоплазма містить велику кількість гранул, що являють собою клітинні органели з кристалоподібною серцевиною, оточеною ліпідними мембранами. Основні функції:

1. Позаклітинний цитоліз.
 2. Фагоцитарна функція.
- Секреторно-регуляторна функція.

Базофіли – гранулоцити, яких містяться в циркулюючій крові ссавців менше 1% від загальної кількості лейкоцитів.

Це середніх розмірів клітина, яка має сегментоване ядро. Цитоплазма заповнена гранулами, які оточені мембраною.

Найбільш важливою функцією цих клітин вважають миттєве звільнення вмісту гранул у позаклітинний простір, що зумовлює розвиток алергічних реакцій. При цьому гранули спочатку зливаються між собою, після чого зливаються із зовнішньою мембраною та звільнюють її вміст.

Базофіли рухливі, здатні до фагоцитозу, але не можуть ділитись та відновлювати гранули.

Тучні клітини – являються аналогами базофілів, локалізованих в тканинах. Вони практично відсутні в циркулюючій крові. Вони крупніші базофілів та мають неправильну форму. В цитоплазмі велика кількість гранул, склад яких аналогічний складу гранул базофілів, але вони багатше трипсиноподібними протеазами. Розрізняють дві субпопуляції тучних клітин:

тучні клітини сполучної тканини і тучні клітини слизової оболонки. Основні функції:

1. Позаклітинний цитоліз.
2. Секреторно-регуляторна функція

Тромбоцити приймають участь у реакціях імунної відповіді. Вважають, що тромбоцити локалізуються в основному у складі циркулюючої крові.

Крім функції зсідання крові, тромбоцити приймають участь в імунних процесах в основному в якості своєрідного депо активних субстанцій. Ці субстанції звільняються під впливом різноманітних факторів, які утворюються в результаті запальних процесів: імунних комплексів, фактора активуючого тромбоцита.

Антигенпрезентуючі клітини. Лімфоцити – найбільш вивчені та важливі клітини крові, які приймають участь в процесі формування адаптивного антиген специфічної імунної відповіді.

Лімфоцити складають основну клітинну масу лімфоїдних органів, а у деяких ссавців більше 95% клітин лімфи. Морфологічно розрізняють три типи лімфоцитів:

1. Малі лімфоцити – ядро з глибокими хроматину (іноді у вигляді спиць колеса), цитоплазма гомогенна, рибосом мало.
2. Середні лімфоцити – в ядрі щільний хроматин, рибосом мало.
3. Великі лімфоцити – світле велике ядро з зернятками хроматину і ядерцями, велика кількість рибосом.

В-лімфоцити є основною клітинною структурою, завдяки якому розвивається гуморальна імунна відповідь. Він характеризується продукуванням специфічних циркулюючих антитіл. В процесі дозрівання В-лімфоцити мігрують із кісткового мозку в периферичні лімфоїдні органи, де локалізуються в основному в лімфоїдних фолікулах. Вважається, що період життя складає декілька місяців. В – лімфоцити мають рецептори, які дозволяють контактувати не тільки з антигенами, але і з іншими клітинами.

Основні функції В-лімфоцитів:

- Продукування імуноглобулінів (антитіл).
- Антигенпрезентуюча функція.
- Секреторно-регуляторна функція

Т-лімфоцити – це велика група лімфоцитів, яка приймає участь у формуванні специфічного імунітету. Вони характеризуються високою активністю та гетерогенністю. Свою назву Т-лімфоцити отримали в зв'язку з особливостями свого розвитку. Основні етапи їх дозрівання відбуваються в тимусі. Інша назва – тимус-залежні лімфоцити, Т-клітини.

Основні функції Т-лімфоцитів:

- Т-хелпери – приймають участь в індукції специфічної імунної відповіді, допомагаючи іншим клітинам розвивати або цитотоксичні реакції, або гуморальні реакції, пов'язані з виробленням антитіл.
- цитотоксичні Т-клітини (кіллери) здійснюють безпосередній контактний Кіплінг клітини мішені.
- секреторно-регуляторна функція

Розподіл Т- і В-лімфоцитів у центральних та периферичних органах імунної системи значно різниться.

Наприклад: у периферичній крові людини Т-лімфоцити становлять 50-60%, В-лімфоцити – 25-30%. Останні 10-20% лімфоцитів не мають ознак Т- або В-лімфоцитів, не залежить від Тимура чи еквівалента бурси Фабриціуса і утворюють третю популяцію так званих нульових клітин, або НК – клітин. Можливо, останні є попередниками Т-лімфоцитів.

Розроблено ряд методів, за допомогою яких розділяють популяції Т- і В-лімфоцитів: адгезії (прилипання) на склі, адгезії на нейлоновій ваті, фільтрації через спеціальні сефадекси в колонках, розеткоутворення (нагромадження еритроцитів навколо лімфоцита), імуофлуоресценції, реакції бластанформації лімфоцитів, лізису лімфоцитів специфічними цитотоксичними сироватками.

В електронному мікроскопі можна виявити морфологічні відмінності між Т- та В-лімфоцитами: поверхня у Т-лімфоцитів гладенька, у В-лімфоцитів покрита численними волосинками.

Природні кілери (НК-клітини) не несуть на своїй поверхні ні маркерів Т- ні маркерів В-лімфоцитів і відносяться до групи так названих 0-клітин. Це великі гранулярні лімфоцити. Цитоплазма містить велику кількість гранул, які містять перфорин, а також гранзими. Основні функції:

1. Кілерна активність.
2. Секреторно-регуляторна функція.

Плазматичні клітини вперше описані Валдейером (1875), Каял (1890), Унна (1891) і Маршалко (1895). Клітини плазмоцитарного ряду деферціюються з В-клітин.

В процесі функціональної активності плазматична клітина проходить декілька стадій розвитку. Вони розміщуються за ступенем її зрілості: плазмобласт – юна плазматична клітина – зріла плазматична клітина

Цитоплазма плазматичних клітин переповнена ергастоплазматичними мішечками, стіни яких усіяні багато численними рибосомами, де, як відомо, відбувається синтез білка.

Плазматичну клітину іноді називають одноклітинною білковою залозою. Плазматичні клітини основні продуценти гуморальних антитіл. Антитіла починають синтезуватися уже в плазмобластах.

Клітини імунної пам'яті. Добре відомо, що імунізація супроводжується виникненням „імунної пам'яті”. Проявляється вона в більш швидшій та більш інтенсивній імунній відповіді організму, який повторно зустрічається з гомологічним антигеном. Така закономірність однаково виражена в реакціях гуморального і клітинного імунітету.

Формування імунологічної пам'яті здійснюється на рівні популяції Т- і В-клітин, до того ж, клітини пам'яті представляють собою довго живучу популяцію особливих клітин як тимусної, так і кістково мозкової лінії. Вони мають меншу густину, володіють високою чутливістю до гомологічних антигенів, під впливом яких перетворюються в клітини-ефектори. Ці клітини зберігають в організмі довготривалу пам'ять, вони можуть фіксуватися в лімфоїдних органах або вільно циркулювати в організмі. Існують дані, що у людини клітини пам'яті живуть 20 років і більше, у пацюків – до половини їхнього життя.

На мембрані лімфоцитів пам'яті є специфічні рецептори, якими вони реагують з відповідними антигенами. Існує припущення, що ці рецептори подібні з молекулою антитіла, але на відміну від неї специфічні і не здатні реагувати з перехресними антигенами.

Накопичення клітин пам'яті, як правило, максимальне через три тижні після імунізації і може залежати від дози антигену.

Взаємодія органів та клітин імунної системи

Злагоджена робота імунної системи забезпечується складною та динамічною взаємодією клітин між собою та з мікрооточенням, яке формують спеціалізовані органи. Ці взаємодії відбуваються в суворо контрольованому просторі й часі, що дозволяє ефективно реалізовувати як вроджену, так і адаптивну імунну відповідь.

Імунна відповідь розпочинається з виявлення антигену клітинами вродженого імунітету, зокрема макрофагами, дендритними клітинами та нейтрофілами. Після розпізнавання чужорідного матеріалу запускається каскад сигналів, який спрямовує інші імунокомпетентні клітини до зони запалення або до периферійних лімфоїдних органів, де відбувається презентація антигену Т-лімфоцитам.

Презентація антигену і формування імунного синапсу. Ключовим етапом є формування імунного синапсу — структурованого контакту між антигенпрезентуючою клітиною (АПК) та Т-клітиною, у якому відбувається передача інформації про антиген за допомогою рецепторів TCR і молекул головного комплексу гістосумісності (МНС). Повноцінна активація Т-клітин вимагає також додаткових ко-стимуляторних сигналів та цитокінового супроводу.

Кооперація клітин у розвитку імунної відповіді. Активовані CD4⁺ Т-хелпери координують роботу інших клітин імунної системи. Вони продукують специфічні цитокіни, які впливають на В-лімфоцити, макрофаги, цитотоксичні Т-клітини та інші ефектори. У вторинних лімфоїдних органах відбувається інтенсивна міжклітинна взаємодія, зокрема в гермінативних центрах, де Т-хелпери сприяють активації В-клітин, їх проліферації, афінній селекції та диференціації в плазматичні клітини і клітини пам'яті.

Цитокінова регуляція міжклітинних взаємодій. Цитокіни є головними медіаторами міжклітинної комунікації. Вони регулюють активацію, проліферацію, міграцію, пригнічення або загибель клітин імунної системи. Характер цитокінового мікрооточення визначає напрямок і тип імунної відповіді — наприклад, прозапальний або регуляторний, гуморальний чи клітинний.

Регуляція і завершення імунної відповіді. Після елімінації антигену більшість ефекторних клітин гинуть шляхом контрольованої апоптозної загибелі. Частина В- і Т-лімфоцитів перетворюється на клітини пам'яті, здатні до тривалого збереження та швидкої реактивації при повторному контакті з антигеном. Регуляторні Т-клітини відіграють важливу роль у пригніченні надмірної або автоагресивної імунної відповіді.

Функціональна єдність клітин та органів. Ефективність імунної системи полягає не лише в наявності спеціалізованих клітин і органів, а

передусім у злагодженій взаємодії між ними. Від точності передачі сигналів, своєчасності активації, стабільності клітинного мікрооточення та дотримання принципів саморегуляції залежить як сила імунної відповіді, так і її безпечність для власного організму. Ця взаємодія — основа імунологічної толерантності, захисту від інфекцій, протипухлинного контролю та ефективної дії імунобіотехнологічних препаратів.

Практична частина

Тема. Вивчення загальної структури органів імунної системи людини, морфології селезінки миші та ідентифікація клітин у мазку периферичної крові

Матеріали: мікропрепарати селезінки миші (забарвлення гематоксиліном і еозином), мазок периферичної крові людини (забарвлення за Романовським–Гімзою або Май–Грюнвальдом–Гімзою), схеми будови органів імунної системи людини, атлас з гістології та цитології, бланки для заповнення результатів.

Обладнання: мікроскоп світловий, предметні та покривні скельця, піпетка або мікроскопічна голка, імерсійне масло, зошит для замальовок і записів, маркери або олівці, серветки або ватні диски.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Вивчіть структуру центральних і периферичних органів імунної системи людини.

Принцип методу. Аналіз мікроскопічної будови органів дозволяє виявити функціональні зони і взаємозв'язок морфологічних структур із виконуваними імунними функціями.

Хід роботи

1. Розгляньте гістологічні препарати тимусу. Визначте кіркову і мозкову зони, тимічні тільця Гассала.

2. Розгляньте препарат кісткового мозку. Зверніть увагу на локалізацію клітинних елементів кровотворення; визначте наявність клітин лімфоїдного ряду

3. Вивчіть будову лімфатичного вузла. Розмежуйте кіркову, паракортикальну та мозкову зони. Знайдіть фолікули з гермінативними центрами

4. Вивчіть будову селезінки. Розрізніть білу і червону пульпу. Визначте фолікули білої пульпи та маргінальну зону.

Завдання 2. Проведіть морфологічний аналіз гістологічного зрізу селезінки миші.

Принцип методу. Селезінка є важливим периферичним органом імунної системи. Морфологічний аналіз дозволяє виявити її структурні компоненти, що беруть участь в імунній відповіді.

Хід роботи

1. Розгляньте зріз селезінки миші під мікроскопом при малому та середньому збільшенні.

2. Визначте білу пульпу (лімфоїдні вузлики навколо артерій) та червону пульпу (зони синусів і тяжів).

3. Знайдіть маргінальну зону між білою та червоною пульпою.

4. Замалюйте спостережувану структуру, вказуючи всі виявлені елементи.

Завдання 3. Ідентифікуйте клітини у мазку периферичної крові людини.

Принцип методу. Ідентифікація лейкоцитів за морфологічними ознаками дозволяє оцінити функціональний стан імунної системи.

Хід роботи

1. Розгляньте мікропрепарат мазка периферичної крові людини під об'єктивом $\times 100$ (з імерсійною олією).

2. Ідентифікуйте основні формені елементи крові: еритроцити, тромбоцити, лейкоцити.

3. Визначте морфотипи лейкоцитів: нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, лімфоцити.

4. Заповніть таблицю з морфологічними характеристиками клітин периферичної крові.

Таблиця 1. Цитоморфологічна характеристика клітин периферичної крові людини

№	Назва клітини	Характеристика ядра	Характеристика цитоплазми	Наявність гранул	Коментар
1					
2					
3					
...					

Завдання 4. Проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Оцініть відмінності між центральними та периферичними органами імунної системи за функціональними і морфологічними ознаками.

2. Поясніть особливості гістологічної будови селезінки як органа, який поєднує функції кровотворення, імунного контролю та фагоцитозу.

3. Назвіть основні типи лейкоцитів у мазку крові та поясніть їхнє функціональне значення в імунній системі.

4. Порівняйте цитоморфологічні характеристики клітин периферичної крові, визначте ознаки, за якими можна диференціювати їх під мікроскопом.

Контрольні запитання

1. Поясніть функціональні відмінності між центральними та периферичними органами імунної системи. Як ці відмінності пов'язані з етапами розвитку лімфоцитів?

2. Опишіть процес антигеннезалежної диференціації Т-лімфоцитів у тимусі. Яку роль у цьому процесі відіграє гематотимічний бар'єр і клітинне мікрооточення?

3. Розкрийте принципи формування імунної пам'яті. Які клітини залучені до цього процесу і якими властивостями вони характеризуються?

4. Наведіть порівняльну характеристику будови та функцій лімфатичного вузла і селезінки як периферичних органів імунної системи. У чому полягає їхня специфіка імунної відповіді?

5. Розкрийте роль макрофагів і нейтрофілів як «професійних» фагоцитів у розвитку вродженого імунітету. Які функції вони виконують поза фагоцитозом?

6. Опишіть особливості імунної відповіді, що реалізується у лімфоїдній тканині, асоційованій зі слизовими оболонками. Які органи її формують та як функціонують у контексті місцевого імунітету?

7. Розкрийте морфофункціональні особливості В-лімфоцитів і Т-лімфоцитів. Які маркери та локалізація допомагають розрізняти ці клітини?

8. Поясніть механізм формування імунного синапсу між антигенпрезентуючою клітиною та Т-лімфоцитом. Яке біологічне значення цієї структури в адаптивному імунітеті?

9. Яким чином природні кілери (NK-клітини) беруть участь у неспецифічному захисті організму? У чому полягає їх відмінність від Т-клітин?

10. Проаналізуйте роль цитокінів у регуляції імунної відповіді. Які типи клітин їх продукують та які основні функції вони виконують?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Будова та функції імуноглобулінів

Мета: ознайомитися зі структурними та функціональними особливостями імуноглобулінів, механізмами їх синтезу та специфічної взаємодії з антигенами, а також сформувати уявлення про властивості імунних комплексів як ключових ефektorів гуморальної імунної відповіді; засвоїти принцип радіальної імунодифузії як одного з класичних методів кількісного визначення імуноглобулінів різних класів у сироватці крові, набути практичних навичок постановки реакції за методом Манчіні, інтерпретації преципітаційних результатів та оцінки імунного статусу на основі концентрацій IgA, IgG та IgM.

Теоретичні відомості

1. Структура і синтез антитіл в організмі. Класифікація антитіл.
2. Взаємодія антитіл з антигенами.
3. Імунні комплекси та їх властивості.

Структура і синтез антитіл в організмі. Класифікація антитіл

Антитіла (АТ) — це спеціалізовані розчинні білкові молекули, які належать до класу імуноглобулінів (Ig). Вони синтезуються В-лімфоцитами (плазматичними клітинами) у відповідь на появу чужорідних антигенів і відіграють ключову роль у гуморальній імунній відповіді. Антитіла наявні в плазмі крові, лімфі, слизових секретах та інших біологічних рідинах.

Усі антитіла є глобулярними білками зі специфічною вторинною, третинною та четвертинною структурою, які забезпечують їхню здатність до високоспецифічного розпізнавання антигенів. У міжнародній номенклатурі використовують позначення Ig (від англ. immunoglobulin), після якого додається літера, що вказує на клас.

Молекулярна будова антитіл

Антитіла складаються з чотирьох поліпептидних ланцюгів: двох ідентичних легких (англ. L — light) і двох ідентичних важких (англ. H — heavy). Ланцюги з'єднані дисульфідними зв'язками й формують Y-подібну структуру.

Важкі ланцюги визначають клас антитіла і поділяються на типи: γ (гамма), μ (мю), α (альфа), δ (дельта), ϵ (епсILON), які відповідають п'яти основним класам імуноглобулінів: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Легкі ланцюги поділяються на два типи — κ (каппа) та λ (лямбда). Кожне антитіло має лише один тип легких ланцюгів.

Кожен поліпептидний ланцюг має варіабельну (V) та константну (C) ділянки. Варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів утворюють антигензв'язувальний центр (паратоп). Антитіла, як правило, двовалентні — мають два паратопа, здатні зв'язувати два епітопи.

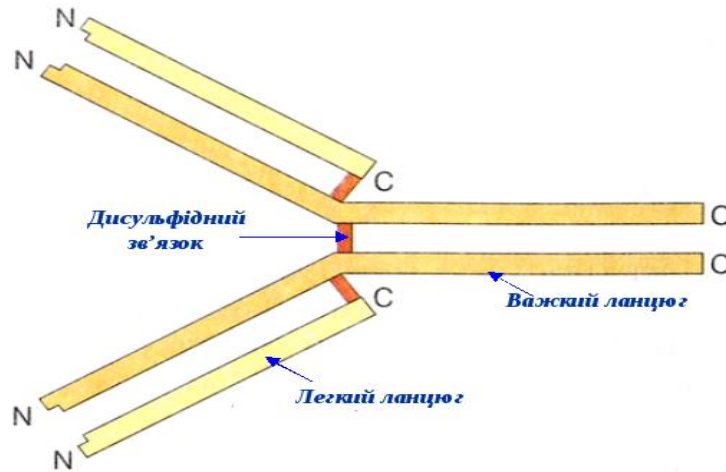


Рис 1. Структура молекули імуноглобуліну

Активний центр АТ формується важким і легким ланцюгом. Це стало відомо після досліджень англійського вченого Р. Портера та американського вченого Г. Едельмана у 1959 році. Портер обробив АТ папаїном і отримав 3 фрагмента. Два з яких з молекулярною масою 45000 Д ідентичні один одному і їх назвали Fab₁ та Fab₂ тобто фрагменти, які з'єднували антиген (англ. antigen binding). Третій фрагмент з молекулярною масою 55000 Д специфічної активності не мав, але мав постійний амінокислотний склад і був названий Fc-фрагментом (англ. crystallizable).

Коли ж Г. Едельман обробив АТ меркаптоетанолом у концентрованому розчині сечовини, то молекула імуноглобуліну розпалась на 2 легкі ланцюги з М.М. 20000–25000Д та 2 важкі ланцюги з молекулярною масою 50000Д кожний. Повноцінну активність АТ не один із ланцюгів не мав, тобто було встановлено, що активний центр формується важким та легким ланцюгом. АТ мають два активних центра і відповідно двовалентність, яка забезпечує можливість приєднуватися до них великій кількості антигенів (АГ). Реакція АГ-АТ максимально відбувається тільки в певному діапазоні концентрацій обох реагентів, тобто у зоні еквівалентності і має деякі фізико-хімічні характеристики:

а) наявність електролітів — 0,85% NaCl, рН близьке до нейтральних значень;

б) швидкість реакції з'єднання АГ з АТ, яка відбувається в перші секунди, а проявляється реакція через кілька годин;

в) реакції з'єднання АГ з АТ – зворотні. При зміні рН у лужний або кислотний бік та підвищення концентрації NaCl до 15%, а температури до 60°C можна із комплексу АГ-АТ виділити АТ;

г) при взаємодії АГ з АТ виділяється невелика кількість тепла.

В утворенні комплексу АГ-АТ приймають участь електростатичні та міжмолекулярні сили, що діють на близькій відстані.

Синтез антитіл

Синтез антитіл розпочинається після активації В-лімфоцита антигеном. Після розпізнавання специфічного епітопу, В-клітина проходить диференціацію в плазматичну клітину, яка секретує імуноглобуліни. Спочатку синтезуються IgM, а згодом — інші класи антитіл у процесі класової ізотипової зміни (class switch recombination), що регулюється цитокінами і взаємодією з Т-хелперами.

Класифікація антитіл (ізотипи)

Активовані В-Лф в першу чергу секретують IgM. IgM складають приблизно 7% сироваткових Ig. Це досить крупні молекули, які складаються з 5 звичайних мономерних одиниць, зв'язаних j-ланцюгом.

IgM. Це перші антитіла, що з'являються у відповідь на антиген. Утворюють пентамерні структури, зв'язані J-ланцюгом, мають 10 паратопів, що забезпечує високу авідність. Ефективно аглютинують мікроорганізми та активують систему комплементу. Утворюють більшість природних (неспецифічних) антитіл. Так звані “нормальні антитіла”, присутні в крові здорових індивідів, теж є здебільшого IgM. Це антитіла екстремального імунного захисту.

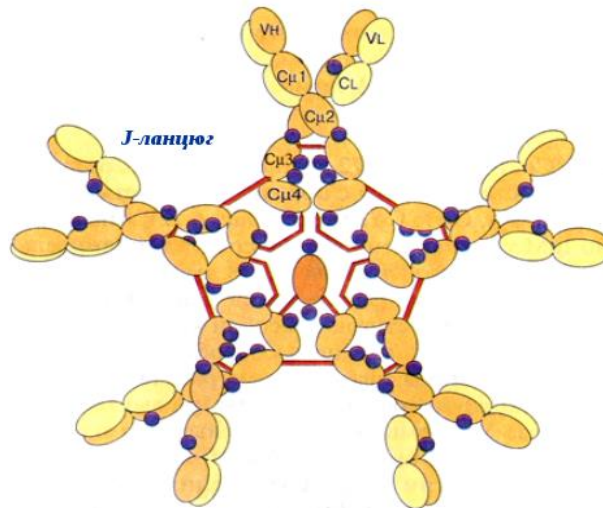


Рис. 2. Структура Ig M людини

IgG. Найпоширеніший клас (≈75% сироваткових Ig). Основний у вторинній імунній відповіді. Здатний проникати через плаценту, активує комплемент, опосередковує фагоцитоз і нейтралізацію токсинів. Існують чотири основні підкласи: IgG1–IgG4, які відрізняються за біологічною активністю.

IgA. За вмістом в сироватці та тканинних рідині IgA посідає 2 місце після IgG. Представлений у сироватці як мономер, у секретах — як димер (секреторний IgA, або sIgA). Основний захисний компонент слизових оболонок (слина, слюзи, молозиво, секрет ШКТ). Має два підкласи — IgA1 і IgA2, які

відрізняються за стійкістю до протеолізу. Деякі бактерії, які паразитують на слизових оболонках, утворюють протеази, які руйнують IgA1, але не IgA2.

Секреторний IgA (sIgA) – димер, який складається з двох молекул IgA, що з'єднані j-ланцюгом. Крім того, він містить додатковий пептид, який називається секреторним компонентом (S-компонент). Секреторні IgA слугують важливим фактором захисту слизових оболонок від бактерій та вірусних інфекцій.

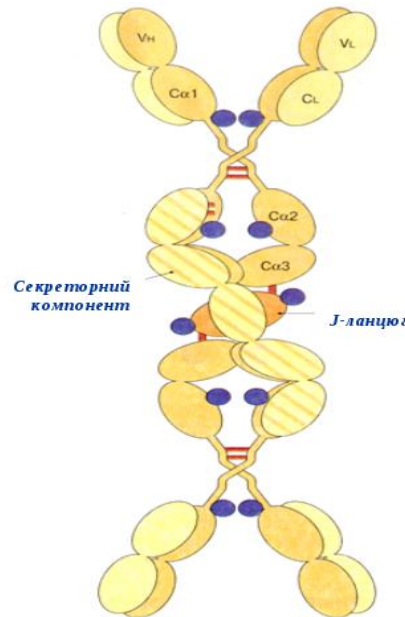


Рис. 3. Структура sIgA людини

IgD. Наявний у незначній кількості в сироватці. Функції повністю не з'ясовані. Відомо, що IgD разом з IgM виступає рецептором на поверхні зрілих В-лімфоцитів.

IgE. Концентрація в крові дуже низька, проте цей клас відіграє провідну роль у розвитку алергічних реакцій (гіперчутливість I типу) та в протипаразитарному захисті. IgE зв'язується з рецепторами базофілів і тучних клітин, спричиняючи дегрануляцію та вивільнення гістаміну й інших медіаторів запалення. IgE лежать в основі таких захворювань, як бронхіальна астма, сінна лихоманка, атопічний дерматит, анафілактичний шок. Тому IgE – головні медіатори алергії.

Фізико-хімічні властивості антитіл

Антитіла характеризуються:

- **специфічність** — здатність розпізнавати лише певну антигенну детермінанту;
- **валентність** — числом паратопів, здатних одночасно зв'язувати епітопи;
- **афінність** — силою зв'язування одного епітопа з одним паратопом;
- **авідність** — сумарною міцністю комплексу антиген–антитіло, з урахуванням мультивалентності.

Утворення комплексу АГ–АТ супроводжується слабо екзотермічним ефектом і є оборотним: при зміні температури, рН або іонної сили можливе дисоціювання комплексу. Найінтенсивніше взаємодія відбувається у зоні еквівалентності, тобто за рівних концентрацій антитіла й антигену.

Методи визначення антитіл

Антитіла виявляють за допомогою реакцій:

- аглютинації (прямої і непрямой),
- преципітації,
- зв'язування комплементу,
- імуноелектрофорезу,
- твердофазного імуноферментного аналізу,
- імунофлуоресценції,
- імунохемілюмінесценції.

Антитіла є основними ефекторами гуморального імунітету. Їх структурна різноманітність, висока специфічність, багатфункціональність та здатність до тривалої циркуляції у біологічних рідинах роблять їх незамінними в захисті організму від інфекцій, алергенів та пухлин, а також у клінічній діагностиці та терапії.

Взаємодія антитіл з антигенами

Взаємодія антитіл з антигенами є фундаментальним молекулярним процесом, який лежить в основі гуморальної імунної відповіді. Це високо специфічна, оборотна та нековалентна взаємодія, що реалізується через сумісність між унікальним антигензв'язувальним сайтом антитіла (паратопом) і визначеним епітопом антигену. Взаємодія відбувається за рахунок водневих зв'язків, ван-дер-ваальсових сил, гідрофобних ефектів та електростатичних притягань. Її специфічність забезпечується як просторовою, так і хімічною комплементарністю.

Характеристика цієї взаємодії включає **афінність** (силу зв'язування одного паратопу з одним епітопом) та **авідність** — сукупну силу багатоточкового зв'язування між мультимерним антитілом і поліепітопним антигеном. Афінність є показником якісної відповідності, тоді як авідність — кількісною мірою стабільності комплексу в цілому. IgG, маючи високу афінність, забезпечує тривалу імунну відповідь, тоді як IgM, завдяки високій авідності, ефективно аглютинує антигени на ранніх стадіях імунної відповіді.

Реакції між антигенами й антитілами можуть призводити до нейтралізації токсинів або вірусів, аглютинації мікроорганізмів, активації системи комплементу, опсонізації та утворення імунних комплексів. Ці процеси є основою імунного захисту та широко використовуються в діагностичних і терапевтичних підходах — зокрема, в імуноаналізах, тестах на сумісність тканин, терапії моноклональними антитілами тощо.

Імунні комплекси та їх властивості

Імунні комплекси — це структуровані агрегати, що утворюються в результаті взаємодії антитіл з розчинними або парціально зв'язаними антигенами. Їх утворення є природною фізіологічною відповіддю організму на антигенну стимуляцію та відіграє центральну роль у нейтралізації та елімінації чужорідних агентів.

Імунні комплекси можуть бути розчинними, якщо утворюються у надлишку одного з компонентів, або нерозчинними, якщо досягається

еквівалентне співвідношення антигену й антитіла — тоді вони осаджуються у вигляді преципітатів або аглютинатів. Важливим фактором стабільності імунного комплексу є його валентність: чим більше епітопів на антигені й паратопів на антитілі, тим більший розмір комплексу та ймовірність його осадження.

У нормі імунні комплекси швидко кліренсуються із кровотоку за участю фагоцитів, Fc-рецепторів і компонентів комплементу. Однак при надмірному утворенні або порушенні механізмів їх видалення можливе накопичення комплексів у тканинах, що є основою патогенезу так званих імунокомплексних захворювань (наприклад, системного червоного вовчака, постстрептококового гломерулонефриту, васкулітів).

Імунні комплекси здатні активувати комплемент за класичним шляхом, що призводить до генерації хемоатрактантів, опсонінів та утворення мембраноатакувального комплексу. Вони також можуть викликати вивільнення прозапальних медіаторів із гранулоцитів та базофілів, сприяючи розвитку локального або системного запалення.

У лабораторній діагностиці імунні комплекси можуть бути виявлені за допомогою преципітаційних реакцій, імуноелектрофорезу, радіоімуноаналізу або методів твердофазного зв'язування. У терапевтичній практиці знання властивостей імунних комплексів важливе для оцінки ризиків гіперчутливості III типу та розробки стратегій імуносупресивного або протизапального лікування.

Практична частина

Тема. Визначення вмісту імуноглобулінів різних класів в сироватці крові методом радіальної дифузії в гелі (метод Манчіні)

Матеріали: стандартні зразки сироватки з відомою концентрацією IgA, IgG та IgM; досліджувані зразки сироватки крові; агара або агароза (1% розчин у фізіологічному розчині); консервант (натрій азид); антисироватки до імуноглобулінів класів IgA, IgG, IgM; фарбувальні розчини для гелю (за потреби); буферні розчини для підтримки ізотонічного середовища; дистильована вода.

Обладнання: лабораторні планшети або чашки Петрі; шаблон або спеціальний штамп для формування лунок у гелі; мікропіпетки з набором стерильних наконечників; термостат або камера для інкубації гелю; штангенциркуль або мікрометр для вимірювання діаметра преципітаційних кілець; вологі камери для інкубації; захисні засоби (лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри); при потребі — фотометр або гелъ-документуюча система для реєстрації результатів.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть постановку реакції радіальної дифузії.

Принцип методу. Метод Манчіні базується на радіальній дифузії розчинного антигену (Ig) у шарі гелю, насиченого специфічними антитілами. При досягненні зони еквівалентності формується кільце преципітації, діаметр якого пропорційний концентрації імуноглобуліну в зразку. Отримані значення порівнюють зі стандартною калібрувальною кривою.

Клінічне значення. Метод Манчіні дозволяє кількісно визначати концентрацію основних класів імуноглобулінів у сироватці крові, що є надзвичайно важливим для діагностики імунодефіцитів, моніторингу інфекційних та аутоімунних захворювань, оцінки стану імунної системи та контролю за ефективністю імунної терапії.

Хід роботи

1. Підготовка гелю. Приготуйте 1% агарозний гель на основі фізіологічного розчину з додаванням консервантів. Підігрійте до розчинення, охолодіть до $\sim 45^{\circ}\text{C}$ і додайте антисироватку до відповідного імуноглобуліну (IgA, IgG, IgM). Залийте на планшети.

2. Формування лунок. Після застигання гелю пробийте лунки діаметром 2–3 мм на рівній відстані одна від одної.

3. Внесення зразків. У центр кожної лунки внесіть по 10–20 мкл досліджуваних або стандартних сироваток.

4. Інкубація. Інкубуйте планшети у вологій камері при кімнатній температурі протягом 48 годин.

5. Реєстрація результатів. За потреби профарбуйте гель. Виміряйте діаметр преципітаційних кілець (у мм^2) і розрахуйте концентрацію імуноглобулінів за калібрувальною кривою.

Завдання 2. Проведіть оцінку отриманих результатів.

Таблиця 2. Результати аналізу взаємодії білка з цільовою ділянкою

№	Назва зразка	Клас Ig (A/M/G)	Діаметр зони (мм)	Концентрація Ig (мг/мл)	Примітки
1	Стандарт IgG (1:1)	IgG			
2	Досліджувана сироватка 1	IgG			
3	Досліджувана сироватка 2	IgA			
4	Стандарт IgM (1:2)	IgM			

Пояснення до таблиці

✓ **Наявність ампліфікату:** позначте «+» або «–» залежно від того, чи спостерігалася смуга на гелі.

✓ **Інтенсивність смуги:** оціни за візуальною шкалою:

- + – слабка смуга
- ++ – помірна
- +++ – інтенсивна

Примітка: додайте інформацію про специфічність, наявність неспецифічного зв'язування або артефактів.

Завдання 3. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи було виявлено наявність імуноглобулінів у досліджуваних зразках? Проаналізуйте утворення преципітаційних кілець у лунках з досліджуваною сироваткою. У яких зразках спостерігалися чітко виражені кільця? До якого класу належали виявлені імуноглобуліни? Яку концентрацію Ig було розраховано за калібрувальною кривою?

2. Як оцінити якість проведеного аналізу методом Манчіні? Зверніть увагу на правильність формування гелю, рівномірність дифузії, чіткість контурів преципітаційних кілець. Порівняйте діаметри зон у стандартних і дослідних зразках. Чи були ознаки неспецифічної преципітації, розмитих контурів або відсутності кілець?

3. Яке клініко-біологічне значення мають виявлені концентрації імуноглобулінів? Оцініть, чи перебувають рівні Ig у межах референтних значень. Якщо ні — які можливі причини (інфекційне захворювання, імунодефіцит, аутоімунний процес тощо)? Яке значення має співвідношення IgG, IgA та IgM у клінічній інтерпретації?

4. Які фактори могли вплинути на ефективність експерименту? Проаналізуйте технічні моменти: точність приготування гелю, концентрацію антисироватки, температуру інкубації, термін дифузії, точність вимірювання діаметра зон. Чи дотримано умов зберігання дослідних сироваток? Чи могли вони вплинути на результат?

5. Сформулюйте висновок щодо використання методу Манчіні у лабораторній діагностиці. Оцініть метод як інструмент кількісного визначення імуноглобулінів.

Контрольні запитання

1. Яка молекулярна структура антитіла і яку роль відіграють важкі та легкі ланцюги у формуванні паратопу?

2. У чому полягає відмінність між афінністю та авідністю антитіл, і як ці характеристики впливають на ефективність імунної відповіді?

3. Який клас імуноглобулінів синтезується першим у відповідь на антиген, і які його структурні особливості забезпечують високу авідність?

4. Які основні функціональні відмінності між імуноглобулінами класів IgG, IgA та IgE?

5. Які фізико-хімічні умови впливають на стабільність комплексу антиген–антитіло та в яких умовах може відбутися його дисоціація?

6. Як утворюється секреторна форма IgA і яку роль вона відіграє в захисті слизових оболонок?

7. Який принцип лежить в основі реакцій преципітації та аглютинації як методів виявлення антитіл?

8. Як імунні комплекси беруть участь у розвитку імунопатологічних станів, зокрема при системному червоному вовчаку або гломерулонефриті?

9. Які молекулярні взаємодії забезпечують специфічність зв'язування антитіла з антигеном?

10. Яким чином Fc-фрагмент антитіла забезпечує ефекторні функції в імунній відповіді (опсонізація, активація комплементу тощо)?

ЧАСТИНА 2. КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ТЕРАПЕВТИЧНИХ АНТИТІЛ

Розвиток клітинних технологій отримання терапевтичних антитіл відкрив нові можливості для лікування широкого спектра захворювань, зокрема

аутоімунних, інфекційних та онкологічних. Моноклональні антитіла (мАТ) є високоспецифічними біомолекулами, які відіграють ключову роль у сучасній імунотерапії, діагностиці та біотехнології.

Дана частина лабораторного курсу присвячена вивченню основних методів отримання моноклональних антитіл, що включають:

- гібридомну технологію, яка передбачає злиття В-лімфоцитів і мієломних клітин для створення безсмертних гібридом, що синтезують специфічні антитіла;
- фаговий дисплей, що дозволяє створювати бібліотеки антитіл та відбирати найефективніші молекули за допомогою бактеріофагів;
- трансгенні тварини, які модифікуються для продукування повністю людських антитіл, що мінімізує імуногенність терапевтичних препаратів;
- метод одиничних В-клітин, який дає змогу отримати антитіла безпосередньо від імунізованих організмів, зберігаючи природний репертуар антитільного відповіді.

У рамках лабораторних занять здобувачі ознайомляться з ключовими етапами отримання моноклональних антитіл, методами їхнього очищення, а також принципами застосування сучасних технологій у терапії. Практичні завдання включають перегляд і аналіз відеоматеріалів, що демонструють процеси отримання та використання комерційних моноклональних антитіл, а також засвоєння основ афінної хроматографії як методу очищення антитіл.

Засвоєння цих методів є важливим для підготовки фахівців у галузі біотехнології та біоінженерії, що працюють над створенням нових біотерапевтичних препаратів, розробкою ефективних імунотерапевтичних стратегій та вдосконаленням діагностичних підходів у медицині.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Гібридомна технологія: етапи отримання та виділення моноклональних антитіл

Мета: ознайомитися з основними етапами гібридомної технології отримання моноклональних антитіл, включаючи імунізацію тварин, підготовку клітин мієломи, гібридизацію, селекцію та клонування гібридом, а також методи культивування та отримання антитіл *in vitro* й *in vivo*; навчитися визначати особливості технологічного процесу на прикладі отримання Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) та опанувати принципи виділення моноклональних антитіл методом афінної.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика моноклональних антитіл.
2. Одержання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології.
3. Отримання моноклональних антитіл у вигляді асцитної рідини.
4. Виділення та очищення моноклональних антитіл.
5. Номенклатура моноклональних антитіл.

Загальна характеристика моноклональних антитіл

Моноклональні антитіла – це антитіла, які виробляються ідентичними імунними клітинами, які клоновані з однієї клітини-попередника (В-лімфоцита), що специфічні до одного антигену.

Моноклональні антитіла можуть вироблятися проти будь-якого природного антигену (найчастіше це білки, полісахариди, білкова оболонка вірусу, пухлинні або пошкоджені клітини, токсини), який можуть зв'язувати дані антитіла.

Моноклональні антитіла можуть використовуватись як для виявлення специфічного антигену в організмі, так і для його зв'язування та його знешкодження. Найбільш широко моноклональні антитіла застосовуються в медицині для діагностики (зокрема, різних гематологічних захворювань), та для лікування різноманітних онкологічних, ревматологічних, деяких неврологічних захворювань (зокрема, розсіяного склерозу) та захворювань, а також у трансплантології для профілактики реакції відторгнення трансплантату.

Назви усіх моноклональних антитіл, що застосовуються в медицині, мають закінчення «-маб» або «-mab» (скорочення, яке з англійської мови перекладається «monoclonal» (моноклональні) «antibodies» (антитіла).

Одержання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології

Як утворюються антитіла? Імунна відповідь – це складний процес міжклітинних взаємодій різних типів лімфоїдних клітин за участю спеціальних гормонів, у результаті В-лімфоцити починають активно синтезувати і виділяти в кров специфічні антитіла проти даного антигену. На поверхні В-лімфоцитів існують рецептори, аналогічні антитілам, взаємодія яких з антигеном у складному міжклітинному комплексі є стимулом для початку біосинтезу антитіл.

Отримання антитіл для потреб людини починається з імунізації тварин. Після кількох ін'єкцій антигену за наявності стимуляторів імунної відповіді у сироватці крові накопичуються специфічні антитіла. Антитіла виділяють із сироватки у вигляді глобулінової фракції, осаджуючи сироватку крові сульфатом амонію, спиртом, поліетиленгліколем (ПЕГ) та іншими речовинами. Отримані антитіла містять багато домішкових білків. Високоочищені антитіла отримують за допомогою іонообмінної хроматографії.

Стандартні препарати отримати досить складно, оскільки їх склад залежить від виду тварини, її індивідуальних особливостей, циклу імунізації, інших малоконтрольованих факторів. У той же час, для сучасного біохімічного аналізу дуже важливою є специфічність, тобто здатність виділити цю речовину зі складних багатокомпонентних середовищ, таких як сироватки крові, сік рослин, ферментне середовище. Таке можливе при використанні імунохімічного методу, що використовує антитіла, що взаємодіють вузько специфічно за принципом "антиген-антитіло". Для проведення такого аналізу необхідні абсолютно ідентичні антитіла, синтез яких звичайними способами не є прийнятним.

Вирішення проблеми було запропоновано у 1975 році англійськими вченими Георгом Келером та Цезарем Мільштейном. Вони розробили методику отримання клітинних гібридів – гібридом. Гібридами утворюються в результаті

злиття лімфоцитів, взятих від імунізованих тварин, з клітинами мієломи кісткового мозку, що культивуються *in vitro*.

Тварину імунізують, і у відповідь на введення антигену в організмі миші активізуються продукуючі антитіла В-лімфоцити. Ці клітини можуть жити лише в організмі господаря, при переведенні на штучне живильне середовище вони гинуть. Якщо злити імунну клітину з пухлинною, утворюються гібридні клітини, здатні необмежено довго жити у штучних середовищах. Одночасно вони зберігають здатність синтезувати антитіла.

Гібридоми, які синтезують певні види антитіл, відбирають на селективних ростових середовищах. Потім їх поміщають у культуральну рідину, в якій вони розмножуються та утворюють багато споріднених клітин (клон). Такі клони можуть синтезувати антитіла, що отримали назву моноклональних (МКА). МКА – це антитіла, однорідні за структурою та специфічністю, які можна виробляти у необмежених кількостях.

Інший метод отримання антитіл ґрунтується на ін'єкції отриманої гібридоми в черевну порожнину мишки. Там гібридома реплікується та викликає утворення асцитної пухлини (скупчення клітин, що плавають у рідині, яка заповнює черевну порожнину). Асцитна рідина, виділена з цієї миші, є суспензією, що містить антитіла. Клітини та білки, що не належать до МКА, видаляються. Матеріал, що залишився, представлений переважно антитілами, використовують. Цей метод дозволяє одержувати висококонцентровані препарати антитіл.

Але масове виробництво потребує одночасного використання кількох тисяч мишей. Крім того, матеріал вимагає доочищення. Це дорого і трудомістко, тому в даний час перевага надається першому способу з використанням культури клітин.

Висока специфічність антитіл щодо антигену перетворює їх на потужний інструмент для ідентифікації різних речовин – макромолекул, клітинних фрагментів або цілих кліти.

Повністю процедура отримання МКА включає наступні етапи:

- імунізація тварин;
- підготовка клітин до злиття;
- злиття;
- відбір клонів, що продукують специфічні антитіла;
- клонування та реклонування;
- масове напрацювання гібридомних клітин;
- одержання культуральної рідини або асциту, які містять антитіла;
- виділення антитіл.

Зазвичай вся процедура від початку імунізації до виділення антитіл займає 3-4 місяці. Для отримання гібридом бажано виділити окреме приміщення. Експеримент можна проводити і в частині великої кімнати максимально віддаленої від вхідних дверей.

Це приміщення треба оснастити наступним обладнанням:

- ламінарний бокс з вертикальною або горизонтальною подачею стерильного повітря; стерильність забезпечується наявністю фільтрів, що затримують частинки більше 0,3 мкм,
- інкубатор, у якому автоматично підтримується вологість, температура та концентрація CO₂,
- низькошвидкісна центрифуга, бажано з охолодженням,
- звичайний та інвертований мікроскопи з фазово-контрастним пристроєм,
- холодильник на +4°C та на +20°C,
- водяна баня на +37°C та +56°C.

Крім цього, в окремому приміщенні бажано мати морозильник на -70°C і посудину Дьюара з рідким азотом для зберігання клітин. Для отримання гібридом потрібно придбати також спеціальний пластиковий посуд для культури клітин: 96-лункові планшети з плоским дном, 24-лункові планшети, флакони з площею росту 25, 75 см² та ін., пластиковий посуд для проведення імуноферментного та радіоімунологічного аналізів, середовища для культивування, необхідні реактиви, сироватку плода корови (СПК).

Приготування окремих компонентів для культивування. Основними середовищами, які використовують для отримання гібридом, є середовище RPMI 1640 та середовище Ігла у модифікації Дульбекко.

Застосовуються інші середовища, зокрема, середовище Дульбекко в модифікації Іксова. Середовища випускають у вигляді готових розчинів, 10-кратних концентратів та сухих порошків. Найкращі результати виходять при приготуванні середовищ в умовах лабораторії із сухих порошків, проте при цьому важливе значення має якість води. Для приготування середовищ необхідна деіонізована та двічі перегнана в кварцовому посуді вода.

Вибір експериментальної тварини. Зазвичай для імунізації використовують мишей та щурів. Це пов'язано з тим, що відповідні мієломні клітини мишей і щурів широко поширені і, крім цього, не складно вирощування отримані гібридами в організмі цих тварин.

Інші тварини практично не використовуються. При імунізації тварин імунна відповідь виробляється на всі антигенні детермінанти всіх компонентів матеріалу, що вводиться. Це значно ускладнює відбір клонів, що продукують антитіла до антигенної детермінанти, що цікавить, тому що їх частка може бути вкрай незначною. Тому по можливості імунізації застосовують очищені антигени, принаймні на останніх етапах імунізації.

Однією з основних переваг гібридомної техніки і є якраз та обставина, що специфічні антитіла проти даного антигену можна отримати, взявши для імунізації неочищений препарат антигену, та використавши згодом ці антитіла для очищення антигену.

Методи імунізації. Призначення процесу імунізації полягає в тому, щоб збільшити частину клітин, що продукують антитіла заданої специфічності, і перевести ці клітини у функціональний стан, при якому вони здатні зливатися та утворювати гібридні антитілоутворюючі клітини.

Експериментально показано, що для гібридизації необхідно виділити клітини селезінки тварини через 3-4 доби після останнього введення антигену,

тобто тоді, коли в лімфоїдних органах багато активно проліферуючих клітин. Конкретна схема імунізації сильно залежить від природи антигену та його імуногенності. Антигени клітинної поверхні є сильними імуногенами, тоді як більшість розчинних білків слабкі імуногени.

В останньому випадку необхідно застосовувати різні ад'юванти, які посилюють імунну відповідь. Серед ад'ювантів найбільшого поширення набув повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ). Крім цього, використовують введення антигену, преципітованого на галун, і введення разом з антигеном убитих клітин *Bordetella pertussis*. Зазвичай антиген вводять неодноразово, що необхідно для розвитку сильної імунної відповіді, хоча надмірна імунізація може мати зворотний ефект. Показано, що іноді клітини гіперімунованих тварин знижують здатність утворювати гібридами. У деяких випадках буває достатньо однієї імунізації.

По ходу імунізації необхідно визначати титр антитіл до антигену (титр антитіл величина, зворотна до розведення сироватки, при якій ступінь імунологічної реакції знижується вдвічі порівняно з максимальною). Зазвичай це роблять перед останньою імунізацією. У дослід відбирають тварин із високим титром антитіл. Не слід очікувати хороших результатів гібридизації, якщо за імунізації тварини утворення антитіл не відбувається або вони утворюються в низькому титрі.

Для більшості розчинних антигенів можна використовувати наступну схему імунізації:

1. Вводять 1-100 мкг антигену в ПАФ або у вигляді преципітату на галуні внутрішньочеревно. Якщо є можливість, одночасно вводять 2×10^9 вбитих клітин *B. pertussis*.

2. Через 2-3 тижні вводять антиген розведеним на фізіологічному розчині внутрішньочеревно або внутрішньовенно. Цю процедуру можна повторювати до появи високого титру антитіл.

3. Останню імунізацію проводять внутрішньовенно, через 3 доби тварин забивають і готують суспензію клітин для гібридизації.

При застосуванні як імуногену різних клітин (пухлинні клітини, чужорідні клітини крові, бактерії, паразити і т.д.) роблять кілька ін'єкцій без ад'юванта внутрішньочеревно з інтервалом в 2-3 тижні по $(1-5) \times 10^7$ клітин. Останню ін'єкцію роблять внутрішньовенно і через 3 дні виділяють клітини селезінки для гібридизації.

Останнім часом активно розвиваються методи повної імунізації поза організмом з метою отримання гібридами.

Імунізація *in vitro* має низку істотних переваг:

- коротший період імунізації до 4-5 діб;
- потрібна істотно менша кількість антигену;
- до багатьох антигенів можна отримати більш виражену імунну відповідь (частково за рахунок зниження вкладу толерантності та супресії);
- легко перевіряти фактори, які впливають на ефективність імунізації.

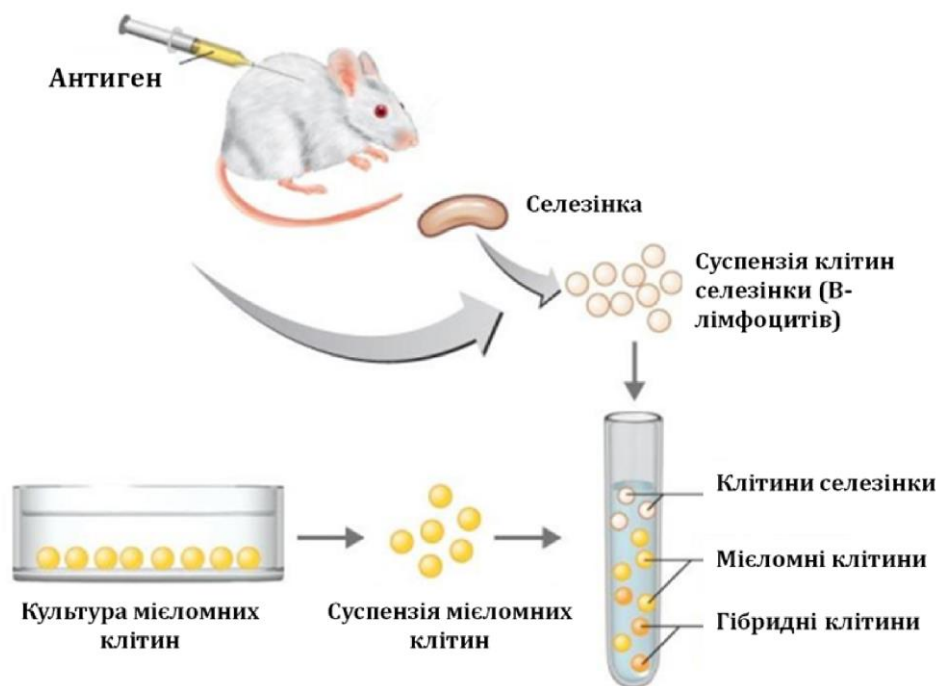
Сучасні методи імунізації *in vitro* ґрунтуються на двох системах культивування лімфоцитів, розроблених наприкінці 1960-х років.

Метод суспензійного культивування був першим методом, у якому імунізація повністю проходила поза організмом. Критичними факторами в даному методі були низька концентрація кисню в атмосфері (7%), висока щільність клітин, легке похитування культури, щоденне додавання свіжого середовища та вибір відповідної партії СПК та антигену (використовували еритроцити барана).

Іншою основною системою імунізації *in vitro* є метод Д. Марбрука. Клітини культивують у невеликій камері на діалізній мембрані, через яку відбувається обмін середовищем з великого резервуара.

Одним із основних недоліків імунізації *in vitro* є наявність певної кількості IgM продукуючих клонів. Це пов'язано з тим, що при імунізації *in vivo* клітини відбирають під час вторинної імунної відповіді, при якій утворюються в основному IgG, тоді як реакція *in vitro* проходить за первинним типом, для якого характерна продукція IgM. Ця проблема може бути подолана після відпрацювання способів отримання вторинної імунної відповіді *in vitro*.

Гібридизація. Існують два основні варіанти додавання ПЕГ, що використовуються сьогодні. Перший спосіб полягає в наступному. Протягом 1 хв додають 1 мл 50% розчину ПЕГ при 37°C з постійним перемішуванням. Потім розчин поступово розбавляють до 10 мл протягом декількох хвилин середовищем без сироватки, після чого клітини центрифугують і ресуспендують у культуральному середовищі. У другому методі використовують тривалішу обробку клітин розчином ПЕГ. До осаду клітин додається 30-35% ПЕГ за кімнатної температури. Клітини центрифугують 2 хв, потім залишають при кімнатній температурі ще на 5-7 хв. Потім їх розводять у великому обсязі середовища із сироваткою та культивують.



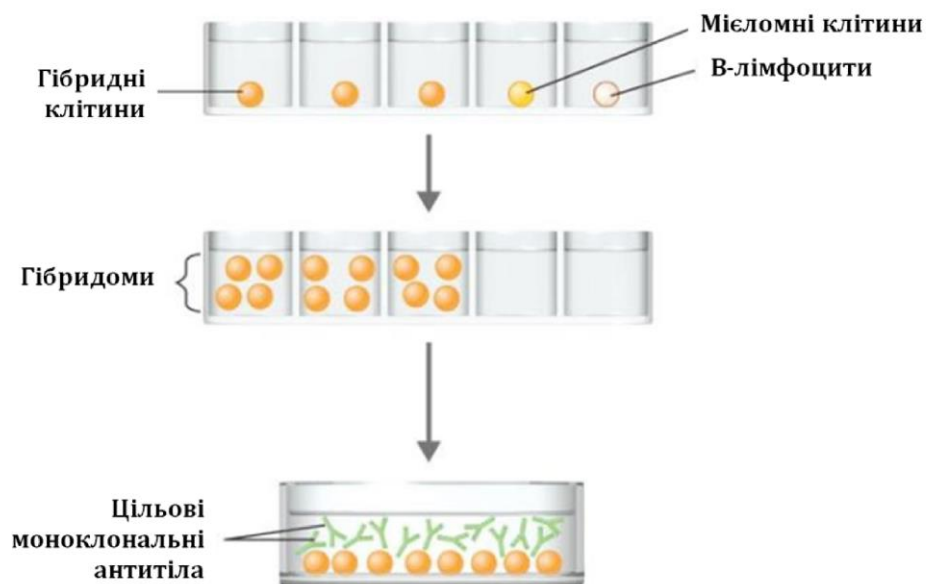


Рис. 4. Етапи одержання гібридоми

Клонування гібридомних клітин. Клонування здійснюється виділення стабільних клонів гібридомних клітин. Для нещодавно утворених гібридомних клітин характерна висока нестабільність, пов'язана із втратою хромосом. При культивуванні можуть з'являтися клітини, що втратили здатність продукувати антитіла і можуть переростати антитілоутворюючі гібридні клітини. До основних методів клонування клітин відносяться клонування методом розведення, що лімітує, клонування в напіврідкому агарі і клонування за допомогою приладу проточного цитофлуориметра. Клонування методом лімітуючих розведень.

Якщо клітини посіяні в 96-лункові планшети дуже рідко, то частка лунок, у якій спостерігається зростання клітин, підпорядковується розподілу Пуассона: де $f(0)$ фракція лунок, де відсутня зростання; середня кількість клітин на лунку. При $\lambda = 1$ $f(0) = 0,37$. Для того, щоб отримати розумну ймовірність тільки одного клону в лунці, більше 37% лунок не повинно спостерігатися зростання клітин. Оскільки ефективність клонування рідко буває рівною 100%, клітини необхідно засівати при щільності 10, 3 та 0,5 клітин на лунку. У планшетах, у яких спостерігається зростання половині лунок, містяться ізольовані клони.

При першому клонуванні активною може бути лише невелика частина клонів. Необхідно завжди проводити повторне клонування, у якому частка позитивних клонів зростатиме. Для клонування треба застосовувати клітини живильного шару. Використовуються самі види клітин, як і для початкового зростання гібридом. Клонування в напіврідкому агар-агарі. Для клонування гібридом можна застосовувати напіврідкий агар. Зазвичай береться система, що складається із двох шарів. Нижній (твердий) шар містить 0,5% агар-агару серед культивування. Йому дають затвердіти.

Потім додають другий м'який шар, що містить 0,3% агар-агару, який включаються клоновані клітини. При використанні клітин живильного шару їх засівають у чашку Петрі до заливання агар-агару, і середовище культивування видаляють безпосередньо перед додаванням нижнього шару агару. Колонії

стають видимими через 7-14 діб, їх переносять на рідку культуру. Клонування з допомогою проточного цитофлуориметра. Готують флуоресцентні мікрокульки з латексу та покривають їх антигеном. Такі кульки адсорбуються на антигенспецифічних гібридомних клітинах, що дозволяє виділяти їх у цьому приладі. Після виділення тим чи іншим способом позитивних клонів, клітини цих клонів розмножують у достатній кількості та зразки їх заморожуються.

Масове напрацювання моноклональних антитіл. Після відбору гібридомних клітин, що синтезують цільові антитіла, можна приступити до їх масового виробництва з метою отримання великих кількостей цих МКА.

На початку культивування гібридомні клітини можуть рости повільно і погано переносити низьку густину посіву. У зв'язку з цим при пересіванні клітин їх треба розводити лише у 3-5 разів. Прискоренню росту клітин може сприяти додавання клітин живильного шару. Гібридомні клітини необхідно підтримувати у логарифмічній фазі росту та уникати підвищення концентрації клітин вище 0,5 млн/мл. Клітини можна культивувати як у стаціонарній культурі, так і в ролерній, а також у різноманітних культиваторах (біореакторах).

Для отримання максимальної продукції МКА за допомогою культури клітин їх культивують до граничної щільності. У такій культурі через певний час спостерігається загибель гібридомних клітин. Далі надосадову рідину збирають, а клітинний осад відкидають, тобто не намагаються культивувати живі клітини, що залишилися далі.

Також для отримання великих кількостей антитіл живі гібридомні клітини вводять в організм тварин і отримують від них асцитну рідину. Попередньо тваринам вводять агенти, що підвищують здатність гібридом рости у черевній порожнині. Як такий агент найчастіше використовують пристан 0,5 мл за 10-14 діб до введення клітин.

Виділення та очищення моноклональних антитіл

Для багатьох цілей не потрібно проводити очищення антитіл оскільки вони використовуються у вигляді культуральних або асцитних рідин. «Грубу» імуноглобулінову фракцію можна отримати висолюванням білків сульфатом амонію з подальшим діалізом. Якщо ж антитіла необхідно виділити у чистому вигляді, попередньо визначають їх клас і підклас, так як способи очищення різняться для антитіл різних класів. Це можна зробити за допомогою методу імунодифузії за Ухтерлоном. Виділення чистих антитіл найкраще проводити на імуносорбентах. При цьому методі є небезпека, що при фіксації змінюється антигенна структура клітинної поверхні. Якщо не вдається виділити антитіла прямим способом, то одержують імуноглобулінову фракцію за допомогою різних методів афінної та іонообмінної хроматографії на сефарозес, пришитим ковалентно білком А.

Використовуючи афінну хроматографію проводять виділення та очищення моноклональних антитіл. Виділяють моноклональні антитіла шляхом афінної хроматографії на сорбенті А-сефарозу. Асцитну рідину, яка містить моноклональні антитіла центрифугують для відділення осаду. Надосадову рідину діалізують проти 0,1 М натрій фосфатного буфера (рН=8,0). Після цього моноклональні антитіла, що зв'язалися з сорбентом, елюють 0,1М натрій

цитратним буфером (pH=3,0). Отриманий елюат концентрують, наприклад, ультрафільтрацією та використовують для отримання лікарського препарату.

Номенклатура моноклональних антитіл

Назви-підказки. Завдяки загальноприйнятій методиці визначення назв нових діючих речовин фармацевти та медики орієнтуються у них завдяки характерним «родовим» частинам складних найменувань (stems), наприклад:

- фрагментом «-вір» маркують противірусні засоби, наприклад, ацикловір, озельтамівір, ритонавір;
- інгібітори тирозин-кінази можна розпізнати за закінченням на «-тиніб» (імаїніб, суніїніб, сорафеніб);
- сартанами називають блокатори рецепторів до ангіотензину 2-го типу (валсартан, ірбесартан, кандесартан).

Донедавна препарати МКА можна було впізнати завдяки наявності у назві родового позначення «-маб». Зазначимо відразу, що для запобігання загрозам для постмаркетингового нагляду усі раніше надані назви збережуться, проте нові будуть складати за новою системою, яка описана нижче.

Система міжнародних непатентованих назв (МНН). Непатентовані назви, які є унікальними та загальновизнаними для всіх фармацевтичних речовин, призначаються в рамках Програми міжнародних непатентованих назв ВООЗ. Відповідну експертну групу започатковано у 1953 р. У 1991 р. було запроваджено першу систему номенклатури моноклональних антитіл. У подальшому її удосконалювали, але в якості «родової» частинки всіх назв використовували склад «-маб». На сьогодні відомо 879 МНН, що містять його у назвах (Guimaraes Koch S.S. et al., 2022). Через таку велику кількість назв, що закінчуються на «-маб» розробка нових МНН стала проблемою. Вирішення потребувало питання призначення назви, яка була б інформативною, короткою та приємною на слух (Robertson J.S. et al., 2019).

Переглянуту систему було схвалено та прийнято ВООЗ у жовтні 2021 р., зокрема, узгоджено радикальне рішення припинити використання добре відомої частинки «- маб» у найменуванні нових препаратів на основі антитіл і в майбутньому замінити її чотирма новими: «-таг», «-барт», «-міг» та «-мент»:

- 1-ша група — «-таг» — для немодифікованих імуноглобулінів;
- 2-га група — «-барт» — штучних антитіл;
- 3-тя група — «-міг» — мультиспецифічних імуноглобулінів;
- 4-та група — «-мент» — усіх моноспецифічних конструкцій, які не містять домен Fc.

Інфікси (морфеми всередині кореня) у новій номенклатурі в основному залишаються колишніми. Їх перелік доповнено лише частково.

Нову номенклатуру буде відповідно скориговано для кон'югатів «антитіло — лікарський засіб», які зазвичай використовуються в терапії пацієнтів з пухлинами. Це означає, що в майбутньому нове антитіло буде називатися згідно з оновленою номенклатурою, а кон'югована діюча речовина збереже свою назву. З іншого боку, нова схема іменування не застосовується до клітинних терапевтичних засобів, таких як клітини CAR-T, навіть якщо їх позаклітинний

домен складається з фрагмента антитіла. ВООЗ визначила власну номенклатуру МНН для клітинної терапії.

Практична частина

Тема 1. Перегляд і обговорення демонстраційного відео про отримання моноклональних антитіл Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) за допомогою гібридомної технології

Матеріали: демонстраційне відео з процесу отримання Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), друковані інформаційні матеріали (схеми, таблиці, ключові етапи гібридомної технології), роздаткові картки з описом технологічних процесів, бланки для індивідуальної роботи, зошити або блокноти для запису, ручки, маркери.

Обладнання: персональний комп'ютер або ноутбук, мультимедійний проектор, інтерактивна дошка або фліпчарт, маркерна дошка для презентації результатів групової роботи, підключення до мережі Інтернет для демонстрації відеоматеріалів, колонки або навушники для якісного озвучення демонстрації.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з основними етапами отримання моноклональних антитіл за гібридомною технологією:

- Імунізація лабораторних тварин
- Отримання спленоцитів
- Злиття з мієломними клітинами
- Селекція гібридом
- Скринінг продукції антитіл
- Клонування та масштабування
- Очищення антитіл

Завдання 2. Опрацюйте коротку довідку про Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): його мішень, терапевтичне застосування, біотехнологічне значення.

Завдання 3. Перегляньте демонстраційне відео, яке ілюструє процес створення Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3). Зверніть увагу на:

- Вид тварини, що використовується для імунізації
- Умови злиття клітин та використання селекційного середовища (НАТ)
- Методи скринінгу позитивних клонів
- Масштабування культури гібридом та методи очищення продукту

Завдання 4. Групове обговорення.

1. Об'єднайтесь у групи (по 3–5 осіб).
2. Заповніть аналітичну таблицю щодо ключових етапів гібридомної технології:

Таблиця 3. Аналіз етапів гібридомної технології

Етап	Мета	Ключові інструменти/матеріали	Потенційні труднощі
Імунізація			

Отримання спленоцитів			
Злиття клітин			
Селекція гібридом			
Скринінг продукції			
Клонування			
Масштабування			
Очищення антитіл			

3. Обговоріть у групі:

- Які ключові переваги гібридомної технології перед традиційним отриманням антитіл?

- Які можливі джерела похибок на кожному етапі?

- Які перспективи має ця технологія в сучасній імунотерапії?

4. Представте коротку презентацію (до 5 хв) з підсумками групового обговорення.

Завдання 5. Оформіть письмово короткі (індивідуальна робота) відповіді на такі питання:

1. Які основні етапи передбачає гібридомна технологія?

2. Чим Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) є унікальним серед моноклональних антитіл?

3. Яке значення гібридомна технологія має для сучасної біотехнології, медицини та фармацевтики?

4. Які, на вашу думку, переваги та обмеження має ця технологія?

Тема 2. Виділення моноклональних антитіл методом афінної хроматографії з використанням А-сефарози

Матеріали: зразок культурального середовища з моноклональними антитілами, фракційні пробірки, PBS-буфер (фосфатно-сольовий буфер), елюючий буфер (наприклад, 0,1 М гліциновий буфер, рН 2,7), нейтралізуючий буфер (наприклад, 1 М Tris-HCl, рН 9), дистильована вода, лабораторний журнал.

Обладнання: афінна колонка з сорбентом А-сефароза, штатив для колонки, спектрофотометр або наноспектрофотометр для вимірювання оптичної густини при 280 нм, мікропіпетки (100–1000 мкл), наконечники, центрифуга, магнітна мішалка (за потреби), холодильник (для зберігання фракцій).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть виділення моноклональних антитіл методом афінної хроматографії на А-сефарозі.

Принцип методу. Афінна хроматографія — це метод специфічного виділення антитіл із суміші білків на основі високоспецифічної взаємодії між антитілом і лігандом, іммобілізованим на сорбенті. У цьому випадку використовується А-сефароза, на якій закріплений білок А (Protein A), що зв'язується з Fc-фрагментом імуноглобулінів класу IgG. Після пропускання культурального середовища через колонку антитіла зв'язуються із сорбентом.

Решта білків промивається буфером, а антитіла елюються зміною умов (рН або іонної сили). Отримані фракції містять очищені моноклональні антитіла.

Біотехнологічне значення. Афінна хроматографія є ключовим етапом у виробництві терапевтичних і діагностичних моноклональних антитіл у промисловій біотехнології. Завдяки високій специфічності та селективності, метод дозволяє отримати високочисті препарати антитіл, що відповідають вимогам якості для медичного застосування, включно з імунотерапією онкологічних захворювань, створенням вакцин, діагностичних тест-систем та біосенсорів. Крім того, афінна хроматографія використовується для стандартизації виробництва біофармацевтичних препаратів та забезпечення їхньої біоеквівалентності.

Хід роботи

1. Підготовка колонки до афінної хроматографії. Промийте колонку PBS для балансування сорбенту. Завантажте зразок із моноклональними антитілами. Проведіть промивання неспецифічно зв'язаних білків PBS.

2. Елюювання антитіл із сорбенту А-сефароза. Додайте елюючий буфер і зберіть фракції у пробірки. Нейтралізуйте фракції за допомогою буфера з відповідним рН.

3. Вимірювання концентрації білка у фракціях. Проведіть спектрофотометричне визначення оптичної густини (англ. optical density, OD) при 280 нм. Визначте концентрацію антитіл у кожній фракції.

Завдання 2. Проведіть оцінку отриманих результатів.

Таблиця 4. Спектрофотометричне визначення концентрації моноклональних антитіл у фракціях після афінної хроматографії на А-сефарозі

Фракція	OD ₂₈₀	Концентрація білка (мг/мл)	Коментар
1			
2			
3			
(продовжити таблицю за потреби)			

Завдання 3. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи вдалося виділити моноклональні антитіла з культурального середовища? Проаналізуйте наявність білка в отриманих фракціях після афінної хроматографії. Вкажіть, у яких саме фракціях було зафіксовано найвищі значення OD при 280 нм. Чи відповідають ці фракції тим, що елюювалися після застосування елюючого буфера? Чи спостерігалось ефективне відділення антитіл від інших білків?

2. Як оцінити ефективність проведеної афінної хроматографії? Врахуйте наявність білка у промивних фракціях (ознака втрат при очищенні), форму спектрофотометричної кривої, різницю між OD у промиванні та елюаті, а також прозорість та колір елюатів. Оцініть якість підготовки колонки та дотримання режиму елюювання (наприклад, рН та об'єм буфера). Чи не були втрачено частину антитіл у ході промивання?

3. Яке біотехнологічне значення має очищення моноклональних антитіл? Визначте роль очищених антитіл у подальших біомедичних або діагностичних застосуваннях. Наведіть приклади використання — наприклад, у створенні діагностичних ІФА-систем, імунотерапії (Muromonab-CD3), дослідженні клітинних маркерів або терапевтичному блокуванні специфічних рецепторів. Які переваги афінної хроматографії порівняно з іншими методами очищення білків у біотехнології?

Контрольні питання

1. Що таке моноклональні антитіла, і чим вони відрізняються від поліклональних антитіл за специфічністю та структурною однорідністю?
2. Які основні етапи включає гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл, і яка роль кожного з них у створенні високоспецифічного препарату?
3. У чому полягає принцип злиття В-лімфоцитів з клітинами мієломи при створенні гібридом, і чому саме мієломні клітини обирають для цієї процедури?
4. Які методи використовуються для відбору та клонування гібридом, що продукують специфічні антитіла? Назвіть переваги і недоліки кожного з методів.
5. Поясніть, як відбувається масове напрацювання моноклональних антитіл *in vitro* та *in vivo*. У яких випадках перевагу надають кожному з методів?
6. Які підходи застосовують для очищення моноклональних антитіл після їхнього отримання, і який із них дозволяє досягти найвищого ступеня чистоти?
7. У чому полягає біотехнологічне та медичне значення моноклональних антитіл? Наведіть приклади клінічного застосування.
8. Поясніть принцип і переваги афінної хроматографії у виділенні моноклональних антитіл. Який тип сорбенту використовується найчастіше?
9. Які зміни були внесені до міжнародної номенклатури моноклональних антитіл у 2021 році, і як вони впливають на класифікацію нових препаратів?
10. Які фактори впливають на ефективність імунізації експериментальних тварин перед отриманням гібридом, і чому надмірна імунізація може бути небажаною?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Одержання рекомбінантних

моноклональних антитіл методом дисплею

Мета: ознайомитися з основами отримання рекомбінантних моноклональних антитіл методом дисплею, зокрема фагового дисплею, що є ключовою сучасною технологією у біотехнології та біофармацевтиці. Засвоїти поняття про рекомбінантні антитіла, їх фрагменти, типи дисплейних систем, принципи створення та експресії антитіл *in vitro*; проаналізувати біотехнологічні етапи створення терапевтичного препарату *adalimumab* (Humira) на основі фагового дисплею як приклад успішного застосування цієї технології у створенні повністю людських антитіл для лікування аутоімунних захворювань.

Теоретичні відомості

1. Поняття про рекомбінантні антитіла.
2. Типи рекомбінантних фрагментів антитіл.
3. Способи отримання рекомбінантних антитіл та їх фрагментів.
4. Створення рекомбінантних антитіл та їх фрагментів *de novo* (фаговий, рибосомний, мРНК, клітинний дисплей).
5. Експресія рекомбінантних антитіл.
6. Практичне використання рекомбінантних антитіл.

Рекомбінантними антитілами називають антитіла, які отримують шляхом використання підходів генної інженерії. Використання генно-інженерних методів дозволяє експресувати легкі та важкі ланцюги імуноглобулінів як індивідуальні білки, створювати цілий набір різноманітних фрагментів антитіл, а також змінювати такі властивості антитіл, як афінність, число та специфічність паратопів, склад доменів, рухливість молекули, просторову орієнтацію ділянок зв'язування з антигеном, молекулярну масу, ізоелектричну точку та потенційну імуногенність.

Типи рекомбінантних фрагментів антитіл

У літературі описано отримання декількох різних типів рекомбінантних фрагментів антитіл (деякі представлені на рис.5).

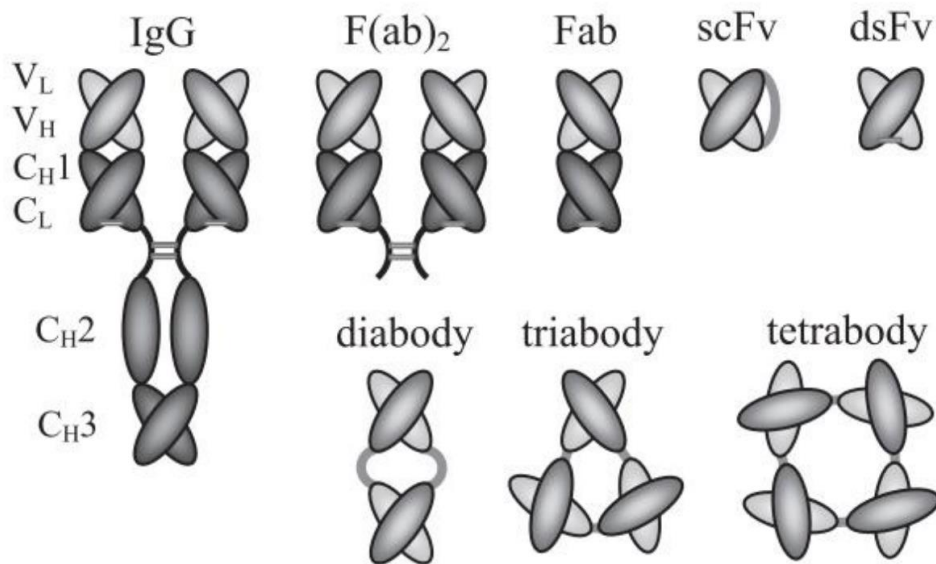


Рис. 5. Основні типи фрагментів та похідних рекомбінантних антитіл
Позначення: VL - варіабельна ділянка LC; VH – варіабельна ділянка HC; CL – константна ділянка легкого ланцюга; CH1, CH2, CH3 – константні ділянки важкого ланцюга; IgG – повнорозмірний імуноглобулін класу G. Світло-сіримі лініями з окантовкою зображені дисульфідні зв'язки між різними ланцюгами, а темно-сіримі – лінкерні послідовності, що вставляють для стабілізації структури рекомбінантних антитіл

Сьогодні виділяють такі типи рекомбінантних антитіл:

- Fv – варіабельний фрагмент антитіла (variable fragment),
- scFv (single chain Fv) – варіабельний фрагмент антитіла, у якого фрагменти легкого та важкого ланцюга пов'язані поліпептидним лінкером,

- (scFv)₂ – фрагмент, що складається з двох молекул scFv, з'єднаних дисульфідним зв'язком,
- dsFv (disulfide-stabilized Fv) – варіабельний фрагмент, стабілізований додатковою внутрішньомолекулярним дисульфідним зв'язком,
- Fab- і (Fab)₂ фрагменти (ідентичні за своєю структурою фрагментам, що утворюються в результаті протеолізу повнорозмірних антитіл типу IgG під дією папаїну та пепсину, відповідно),
- V_H - варіабельний домен.

Також слід згадати такі похідні антитіл як «diabodies», «triabodies», «tetrabodies» – це молекули, що складаються з двох, трьох або чотирьох однакових або різних фрагментів антитіл однакової або різної специфічності, з'єднаних між собою. Найменшим фрагментом антитіла, який може зберігати здатність зв'язувати антиген, є Fv фрагмент. Він складається з варіабельних фрагментів легкого (V_L) та важкого ланцюгів (V_H), кожен з яких стабілізований внутрішньомолекулярним дисульфідним зв'язком. Однак між собою V_H та V_L контактують тільки за рахунок іонних взаємодій, що робить структуру цього фрагмента вкрай нестабільною.

Для підвищення стабільності структури Fv фрагментів використовують або внесення додаткових міжланцюжкових дисульфідних зв'язків (dsFv), або – амінокислотної послідовності-лінкера між варіабельними доменами HC та LC ланцюгів (scFv), внаслідок чого антигензв'язуюча білкова молекула експресується як один поліпептидний ланцюг.

Найбільш «простим» об'єктом для клонування та експресії є scFv фрагменти, однак часто вони мають нижчу стабільність, іноді нижчу афінність і мають більш короткий час напівжиття у кровотоку (при терапевтичному використанні) порівняно з більшими фрагментами.

Комплекси, що складаються з двох («diabodies» або (scFv)₂), трьох («triabodies») та чотирьох scFv-мономерів («tetrabodies») часто мають ще більшу спорідненість до антигену за рахунок збільшення кількості антиген-зв'язувальних ділянок. Це відбувається у випадку, коли scFv-мономери є похідними однакових антитіл, а антиген містить велику кількість ідентичних епітопів, або, у разі коли scFv-мономери є похідними різних антитіл до одного антигену, а всі епітопи антигену знаходяться в доступній їм близькості. Фрагменти (scFv)₂, отримані в результаті з'єднання дисульфідним зв'язком С-кінцевих амінокислотних залишків цистеїну, при використанні їх як терапевтичних агентів краще транспортуються *in vivo* у тканини порівняно з scFv-фрагментами. Це пов'язано з великим часом їхнього напівжиття в кровотоку і, як наслідок, більшою стабільністю їх структури порівняно із scFv.

Рекомбінантні похідні антитіл, що містять Fc-фрагмент, відрізняються ще більшим часом напівжиття. Тривале перебування таких похідних антитіл у тканині забезпечується взаємодією з FcRВ рецепторами (англ. Fc Brambell receptor), розташованими на поверхні кровотворних клітин та клітин ендотелію.

Способи отримання рекомбінантних антитіл та їх фрагментів

Існує два принципово різні підходи до отримання рекомбінантних антитіл. Перший полягає в отриманні рекомбінантних аналогів моноклональних антитіл

або їх фрагментів, з використанням генетичного матеріалу з гібридомних клітин, які продукують ці моноклональні антитіла. Другий підхід пов'язаний зі створенням безлічі варіантів послідовностей рекомбінантних антитіл (бібліотек) з подальшим відбором з них антитіл необхідної специфічності та афінності, тобто створенням антитіл необхідної специфічності *de novo*.

Створення рекомбінантних аналогів антитіл

Метод отримання рекомбінантних антитіл або їх фрагментів, ідентичних антитілам, отриманих стандартним гібридомним методом, включає наступні основні стадії:

- виділення тотальної або матричної РНК із клітин гібридами, які секретують антитіла;
- проведення синтезу первинного ланцюга кДНК (зворотна транскрипція);
- ампліфікація кДНК важких та легких ланцюгів методом полімеразної ланцюгової реакції;
- отримання молекулярно-генетичних конструкцій, що містять отримані кДНК;
- проведення експресії (або коекспресії) у відповідній експресійній системі;
- виділення та очищення білка, що експресується. Цей метод дозволяє отримувати як повнорозмірні антитіла, так і їх фрагменти, а також легкий і важкий ланцюг антитіл як індивідуальні білки. Використання для отримання антитіл генно-інженерних методів уможливорює маніпуляції з нуклеотидною, і, як наслідок, з амінокислотною послідовністю легкого та важкого ланцюгів.

Створення рекомбінантних антитіл та їх фрагментів de novo

Альтернативним підходом є *in vitro* метод отримання рекомбінантних антитіл або їх фрагментів з використанням відбору з бібліотек їх білкових фрагментів на основі здатності зв'язувати антиген. Група методів, що використовуються для вирішення такого завдання, носить назву **дисплейних**. Важливою перевагою цієї групи методів є можливість працювати одночасно з нуклеотидною та амінокислотною послідовностями кожного конкретного варіанта антитіла.

Отримання рекомбінантних фрагментів антитіл, з використанням такого підходу, включає три етапи:

1. створення бібліотек рекомбінантних ДНК антитіл,
2. експресія та презентація білкових фрагментів антитіл на поверхні клітин або фагових частинок (залежно від того, який дисплейний метод використовують, див. далі),
3. відбір підходящих білкових фрагментів антитіл на основі їх взаємодії з антигеном.

Якщо потрібно отримати повнорозмірне антитіло, специфічне до відповідного антигену, спочатку отримують фрагмент антитіла, а потім на його основі реконструюють повну нуклеотидну та амінокислотну послідовність антитіла.

Принцип дисплею полягає у використанні об'єднаних в одному молекулярному комплексі нуклеотидної послідовності цільового білка та продукту його експресії. Такий метод дозволяє відбирати необхідний генетичний матеріал (ДНК чи РНК) на основі здатності продукту його експресії (імуноглобуліну або його фрагмента) до взаємодії з цим антигеном. З використанням декількох циклів відбору, що повторюються, вдається отримати антитіла, що взаємодіють з антигеном з високою спорідненістю. Відомі кілька «дисплейних» методів для отримання антитіл:

- фаговий,
- рибосомний,
- мРНК,
- клітинний.

Всі ці підходи можуть бути використані не тільки для створення антитіл *de novo*, але й для покращення параметрів вже існуючих антитіл (наприклад, збільшення афінності антитіл).

Як правило, для створення та тестування бібліотек антитіл за основу беруть не повнорозмірні антитіла, а їх фрагменти. Оскільки scFv фрагменти є найменшими стабільними одиницями антитіла, здатні зв'язувати антиген, їх набагато простіше використовувати для збільшення афінності в будь-якому вигляді дисплею, ніж повнорозмірні антитіла чи Fab-фрагменти. Існує кілька принципів створення бібліотек рекомбінантних фрагментів антитіл:

- на основі генів антитіл, отриманих з імунізованих донорів (бібліотека, збагачена антитілами до певних антигенів);
- на основі генів первинних антитіл;
- на основі нуклеотидної послідовності антитіл, отриманої з В-лімфоцитів;
- на основі послідовностей найбільш стабільних варіабельних доменів антитіл із рандомізованими амінокислотними залишками у CDR-петлях, синтезованих штучно.

Для відбору антитіл з необхідними властивостями з безлічі варіантів (зазвичай, 10^8 – 10^9), наявних у бібліотеці, використовуються технології дисплею. Загальною рисою всіх цих методів є об'єднання нуклеотидної та амінокислотної послідовностей цільового фрагмента антитіла в єдиному об'єкті, а відрізняються вони типом такого об'єкта – від комплексу мРНК з синтезованим на ній білком-фрагментом антитіла до клітини, яка несе фрагмент антитіла на своїй поверхні. Найбільш поширеним і простим є фаговий дисплей, хоча останнім часом набувають популярності нещодавно розроблені методи, такі як клітинний дисплей, рибосомний та мРНК-дисплей.

Клітинний дисплей

Особливістю клітинного дисплею є використання різних прокаріотичних або еукаріотичних клітинних систем як для експресії різних варіантів антитіл, так і для здійснення відбору за властивостями антитіл, що експресуються. У цьому випадку створюється бібліотека гібридних ДНК, які одночасно містять нуклеотидні послідовності фрагментів антитіл і трансмембранного домену одного з мембранних білків, а синтезовані після трансформації (або трансфекції) клітин такою бібліотекою антитіла є гібридні білки, що складаються з

експонованого в позаклітинний простір нативного фрагмента антитіла та трансмембранного домену, за допомогою якого фрагменти антитіл заякорені у мембрані. Таким чином, клітина виконує функції сполучної ланки між експресованим варіантом антитіла і генами, що його кодують. Для відбору клонів з найбільшою афінністю використовується варіант методу проточної цитометрії, який називається сортування флуоресцентно-активованих клітин (англ. fluorescence activated cell sorting, FACS). Цей метод полягає в тому, що клітини, що містять на поверхні фрагменти антитіл, піддаються сортуванню разом з антигеном, міченим флуоресцентними барвниками, що випускають сигнал при випромінюванні. Відмінності в інтенсивності флуоресценції, що випромінюється клітинами, допомагають диференціювати афінні варіанти від неафінних і є критерієм для сортування матеріалу.

Клітинні дисплеї бувають як прокаріотичними, так і еукаріотичними. Для прокаріотичного дисплею характерна висока ефективність трансформації та простота у використанні, однак сфера його застосування обмежена, оскільки деякі фрагменти антитіл, що містять потенційні сайти глікозилювання, будучи синтезованими в бактеріальній системі, не є функціонально-активними. Для заякорювання синтезованих білкових молекул антитіл на поверхні бактеріальних клітин було запропоновано використати кілька трансмембранних білків. Ці трансмембранні білки використовуються для створення химерних білків, які містять фрагмент антитіла. Так, наприклад, для заякорювання scFv-фрагментів антитіл часто використовують білок зовнішньої мембрани OmpA.

Еукаріотичний дисплей дозволяє проводити експресію як різних фрагментів антитіл, так і повнорозмірних варіантів антитіл, оскільки синтезована в такій системі білкова молекула має необхідні для функціонування посттрансляційні модифікації, специфічні для еукаріотів. Одним з найбільш поширених видів такого дисплею є дріжджовий, оскільки з усіх еукаріотичних клітин саме дріжджові клітини найбільш прості для генно-інженерних маніпуляцій та культивування. Для експонування рекомбінантних фрагментів антитіл на поверхні дріжджових клітин запропоновано створювати гібридні білки, що складаються з антитіла або його фрагмента та субодиниці аглютиніну Aga2p, яка ковалентно з'єднана за допомогою двох дисульфідних зв'язків з аглютиніном Aga1, заякореним в клітинній стінці дріжджової клітини. Аналогічна стратегія була розроблена також і для експресії антитіл у клітинах ссавців.

Фаговий дисплей

При використанні методу фагового дисплею у геном бактеріофагів також вбудовують ген гібридного білка, що представляє собою продукт поєднання фрагмента антитіла та поверхневого білка фагової частки. Фрагменти Ig виявляються експонованими на поверхні вірусних частинок (рис. 6).

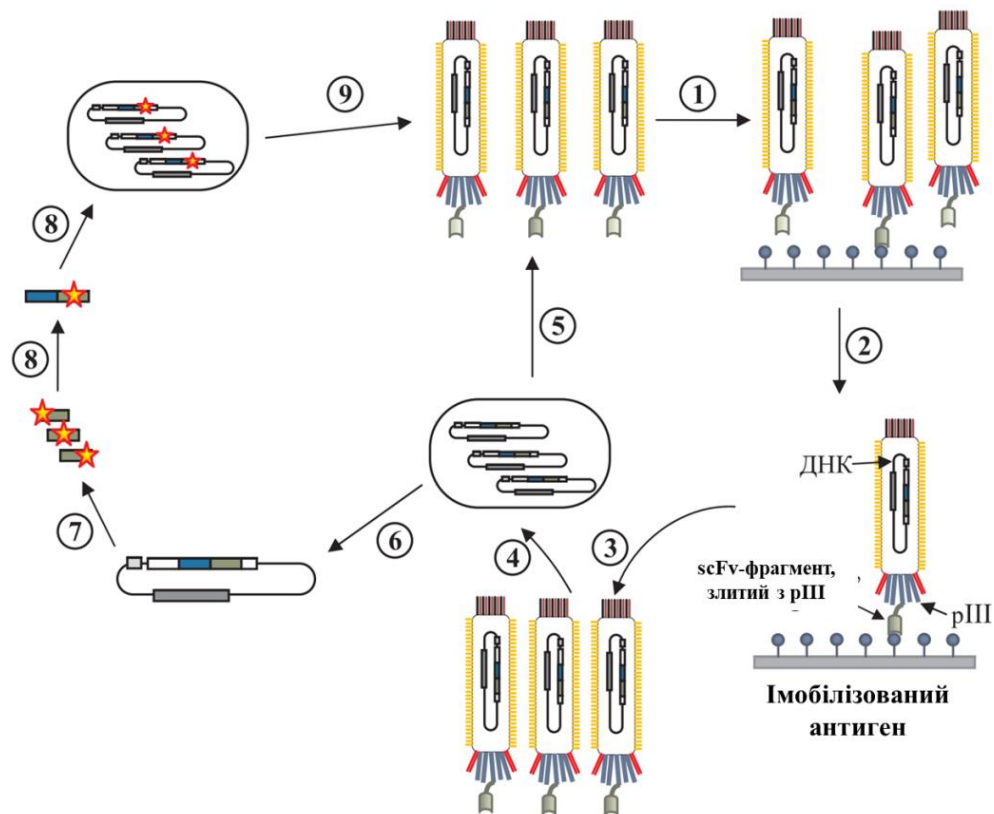


Рис. 6. Збільшення афінності антитіл з використанням методу фагового дисплею.

Бібліотека з 10^8 – 10^9 варіантів фрагментів антитіл (зазвичай використовуються scFv-фрагменти антитіл), експонованих на поверхні частинок фага M13 інкубується з імобілізованим антигеном (1). За кілька етапів промивання видаляють низькоафінні фагові частинки (2), потім елюють фагові частинки, що залишилися зв'язаними (3). Відібрані після першого циклу частинки ампліфікують шляхом інфікування клітин *E. coli* (4) для генерації бібліотеки, збагаченої варіантами фрагментів антитіл, що взаємодіють з антигеном із високою афінністю. Цей цикл повторюється від двох до чотирьох разів (5) доти, доки фракція високоафінних антитіл не стане домінуючою. Для збільшення афінності відібраних антитіл їх гени виділяють з фагових частинок (6) і, використовуючи метод мутагенезу, створюють нові варіанти (7). Отримані гени клонують у плазмиди (8), якими трансформують клітини *E. coli* (8), внаслідок чого отримують нову бібліотеку фрагментів антитіл, експонованих на поверхні фагових частинок (9), яка може бути використана для наступного циклу відбору (1) та подальшого збільшення афінності. Результатом використання фагового дисплею є відбір високоафінних варіантів антитіл, гени яких можуть бути виділені з фагових частинок (6) для подальшого клонування та експресії.

Відбір фагових частинок проводиться на основі спорідненості фрагментів антитіл до антигену. Як правило, для отримання фагового дисплею використовується фаг M13 та фрагменти антитіл експресують у вигляді гібридних білків з білками оболонки фага pIII, pIV та pVIII. З відібраних фагових частинок потім виділяють фагову кДНК і визначають нуклеотидну послідовність фрагментів антитіл. На основі цієї послідовності надалі створюють повнорозмірні рекомбінантні антитіла.

Рибосомний дисплей

Іншим методом дисплею є метод рибосомного дисплею. Для рибосомного дисплею використовується безклітинна система синтезу поліпептидного

ланцюга з матриці мРНК. В процесі синтезу білка утворюється потрійний комплекс білок-рибосома-мРНК (рис. 7).

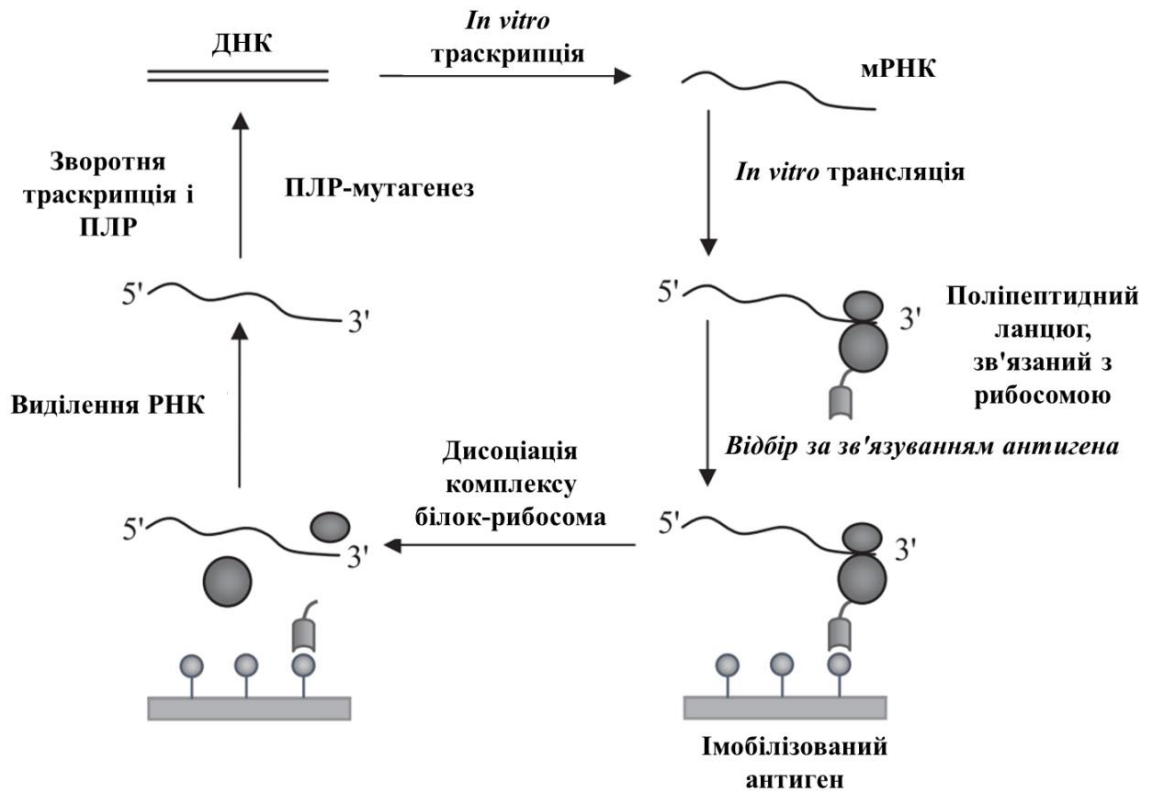


Рис. 7. Рибосомний дисплей

Бібліотека генів антитіл (наприклад, фрагментів scFv) транскрибується та транслюється *in vitro*. В отриманій мРНК відсутній стоп-кодон, що дозволяє зберегти комплекс рибосома-білок, які піддаються в подальшому відбору на імобілізованому антигені аналогічно відбору при фаговому дисплеї. Відібрані комплекси використовують для отримання мРНК, що використовується як матриця для зворотної транскрипції і для ПЛР. У нуклеотидну послідовність можуть бути введені точкові заміни, що призводять до створення нових варіантів фрагментів антитіл, які можуть бути використані у наступному циклі. Молекули ДНК, що кодують відібрані за кілька циклів дисплею високоафінні варіанти антитіл, можуть бути отримані за допомогою зворотної транскрипції молекул мРНК та ПЛР та використані для подальшого клонування та експресії

Далі, як і у випадку більшості інших дисплейних методів, цей комплекс виділяється з розчину на основі спорідненості синтезованих фрагментів антитіла до цільового антигену. Метод дозволяє одночасно відбирати найбільш афінні фрагменти антитіл разом з їх мРНК. Рибосома у даному випадку виконує функцію стабілізатора комплексу. Далі мРНК піддають зворотній транскрипції, отримуючи кДНК, яку ампліфікують методом ПЛР, а отримані ПЛР-продукти використовують для створення плазмиди для експресії рекомбінантних фрагментів антитіл. Описані як прокаріотичний, так і еукаріотичний рибосомні дисплеї.

мРНК дисплей

Для отримання рекомбінантних антитіл використовують також метод мРНК дисплею (mRNA display, *in vitro* virus, RNA-peptide fusion). Ідея цього методу полягає в тому, що синтезований *in vitro* поліпептидний ланцюг залишається взаємодіяти з кодуючою її молекулою мРНК за рахунок

пуроміцинового лінкеру, що зв'язує дві молекули між собою. Тому на основі імунохімічних властивостей синтезованого білка може бути відібрана і відповідна мРНК (рис. 8). Далі використовують технологію аналогічну рибосомному дисплею.

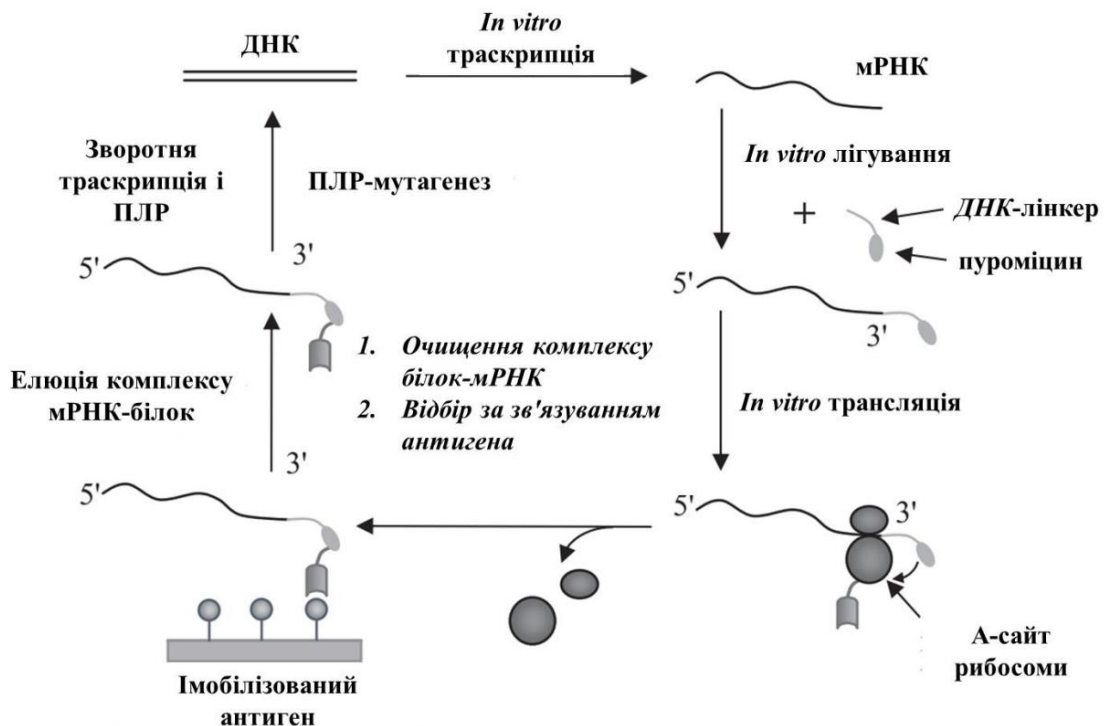


Рис. 8. Метод мРНК дисплею

Бібліотека генів антитіл (наприклад, у формі фрагментів scFv) транскрибується *in vitro*. Шляхом лігування транскрибованої мРНК із пуроміцином за допомогою ДНК-лінкеру можна створювати комплекси мРНК-синтезований білок. При цьому, завершуючи *in vitro* трансляцію, рибосома зупиняється на місці «з'єднання» РНК та ДНК, а пуроміцин зв'язується з А-сайтом рибосоми, після чого синтезований білок транслокується на пуроміцин. Отриманий ковалентний комплекс мРНКбілок може використовуватись для відбору афінності аналогічно добору при фаговому дисплеї, а потім, після елюції, для зворотної транскрипції та ампліфікації кДНК методом ПЛР. Різноманітність варіантів послідовності може створюватися на основі кДНК шляхом мутагенезу.

Таким чином, як ми бачимо, існує безліч способів відбору та отримання найбільш афінних варіантів антитіл з генних бібліотек. На даний момент найпоширенішим є метод фагового дисплею. Однак пізніші підходи, які використовують *in vitro* системи трансляції білка та не потребують трансформації (мРНК та рибосомний дисплей), дозволяють здійснювати скринінг бібліотек більшого розміру, ніж у разі фагового дисплею. Одним із обмежень дисплейних методів є нерівномірність експресії різних мутантних форм антитіл. Можливі ситуації, коли наявність єдиної амінокислотної заміни повністю блокує експресію мутантної форми антитіла. Крім цього, за наявності бібліотек, що складаються з великого числа варіантів, наприклад, 10^{10} - 10^{13} , виникають складності, пов'язані з неможливістю розгляду та аналізу кожного варіанту. Цей момент слід враховувати під час створення та використання подібних бібліотек.

Методичні прийоми відбору найбільш афінних варіантів антитіл з використанням антигену

Для отримання високоафінних антитіл необхідно диференціювати антитіла з низькою та високою афінністю. Для цього можна використовувати методи відбору за кінетичних або термодинамічних параметрів антитіл (рис. 9).

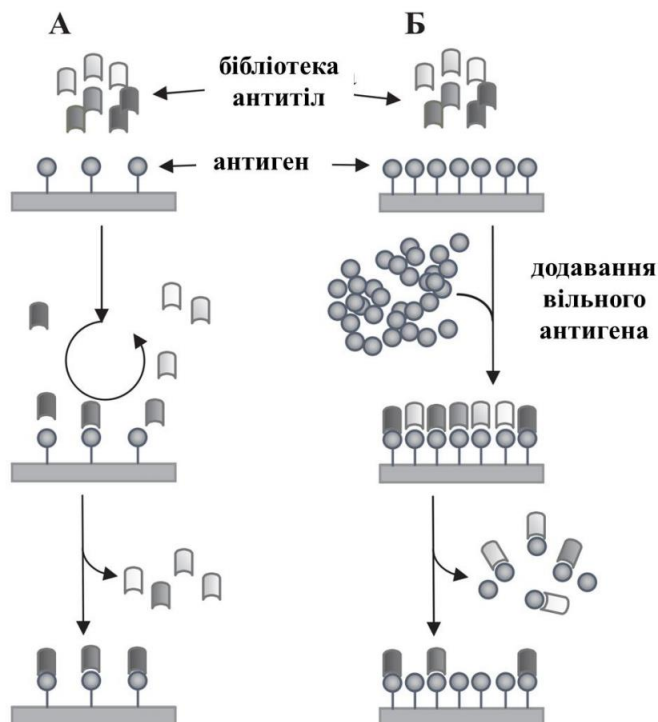


Рис. 9. Дві стратегії відбору найбільш афінних антитіл

А) Рівноважний відбір. Антитіла, що відбираються, інкубуються з недостатчею антигену. Після досягнення рівноваги зв'язаними з антигеном залишаються, переважно, більш афінні антитіла. Б) Відбір за кінетичними параметрами. Антитіла, що відбираються, інкубуються з достатньою кількістю зв'язаного антигену, після чого до суміші додається вільний антиген. У комплексі зі зв'язаним антигеном залишаються тільки антитіла, що мають найменшу швидкість дисоціації (і, тому, більшу афінність).

Для відбору за термодинамічними параметрами (у рівноважному стані) бібліотека антитіл, що відбираються, інкубується з антигеном, що має нижчу концентрацію, ніж бажане значення KD комплексу антиген-антитіло. Після досягнення рівноваги у системі будуть переважати імунні комплекси, утворені антитілами з більш високим афінітетом, а антитіла з низьким афінітетом виявляться у незв'язаному вигляді. Відбір імунних комплексів, що утворилися дозволяє отримати антитіла з найвищими значеннями афінності. Однак такий метод вимагає тривалого часу інкубації (до тижня!) для встановлення рівноваги. Тому лише дуже невелика кількість антитіл з покращеними властивостями може бути виявлена.

Спосіб відбору за кінетичними параметрами (англ. «off-rate selection»), полягає в інкубації бібліотеки антитіл з невеликою кількістю міченого (або сорбованого) антигену, концентрація якого близька до KD комплексу аналізованих антитіл та антигену. На наступному етапі ця суміш інкубується з великим надлишком вільного антигену, причому тривалість інкубації збільшується на кожному наступному етапі відбору. Додавання надлишку вільного антигену робить дисоціацію антитіл, що відбираються від міченого (або сорбованого) антигену практично незворотною. Слабо зв'язані молекули

антитіл, що мають найбільшу швидкість дисоціації, утворюють комплекс з вільним антигеном і потім видаляються за допомогою відбору, а молекули антитіл із найменшою швидкістю дисоціації залишаються зв'язаними з міченим або сорбованим антигеном і відбираються для подальших робіт.

Експресія рекомбінантних антитіл

Залежно від поставленого завдання експресію рекомбінантних антитіл та їх фрагментів можна проводити у різних системах:

- бактеріальній (*E. coli*),
- дріжджовій (*Pichia pastoris*),
- бакуловірусній (клітинна лінія sf9),
- в клітинах ссавців (наприклад, клітинні лінії CHO та HEK293).

Для експресії неглікозильованих фрагментів антитіл невеликого розміру (V_L , V_H , scFv, dsFv), а також Fab-фрагментів зазвичай використовують бактеріальну та дріжджову системи експресії. У разі отримання повнорозмірних антитіл, де необхідно, щоб молекула антитіла була глікозильована, часто використовують клітини ссавців та бакуловірусну систему експресії. У разі бактеріальної та дріжджової експресійної системи часто вдається досягти високих виходів рекомбінантних фрагментів (20–1000 мг/л культуральної середовища). Однак при експресії може виникати низка проблем, які утруднюють отримання функціональних фрагментів антитіл:

- неправильне утворення дисульфідних зв'язків і, як наслідок, велика кількість функціонально неактивного білка та наявність олігомерів синтезованих фрагментів;
- втрата функціональної активності внаслідок набуття мутацій;
- протеоліз синтезованого білка під дією внутрішньоклітинних пептидаз.

В разі еукаріотичної та бакуловірусної систем виходи дещо нижчі (1–10 мг/л та 10–100 мг/л, відповідно), але при цьому, як правило, майже весь синтезований білок виявляється функціонально активним.

Таким чином, використання методичних підходів, розглянутих вище, дозволяє отримати рекомбінантні антитіла або їх фрагменти, придатні для реалізації практично будь-яких науково-дослідних та прикладних завдань. ▮

Практичне використання рекомбінантних антитіл

Завдяки ряду переваг, які мають рекомбінантні антитіла та їх фрагменти, сфера їх можливого застосування значно ширша, ніж у моноклональних антитіл, причому в першу чергу – через можливість їх використання як терапевтичних агентів при лікуванні різних захворювань.

Як уже зазначалося вище, важливою перевагою антитіл, отриманих з використанням генно-інженерних технологій, є можливість модифікувати їх послідовність та вносити зміни, необхідні для реалізації кожного конкретного завдання. Методи генної інженерії дозволяють долати такі властивості моноклональних антитіл, що ускладнюють їх застосування у клінічній практиці, як, наприклад, підвищена імуногенність. Для зниження імуногенності моноклональних антитіл, ділянки, що викликають імунну відповідь (як правило, це константні домени), замінюють на відповідні послідовності антитіл людини.

Такі антитіла називають "химерними" і вони зберігають антигенну специфічність завдяки унікальним варіабельним доменам. Для подальшого зниження імуногенності отримують гуманізовані (майже повністю «заміщені») антитіла, у яких від антитіл миші залишаються тільки ділянки варіабельних доменів, що безпосередньо взаємодіють з антигеном, а всі інші частини молекули заміщаються на послідовність людських імуноглобулінів.

Таким чином, описані вище модифікації антитіл суттєво розширили їх застосування у клінічній практиці. Область використання терапевтичних антитіл включає лікування раку, аутоімунних, респіраторних, серцево-судинних, інфекційних та багатьох інших захворювань. Терапевтичні антитіла також використовують для зниження ймовірності відторгнення трансплантатів. Застосування рекомбінантних фрагментів антитіл успішно розвивається і нині. Певною скрутою при використанні терапевтичних антитіл може бути мінливість молекул-мішеней, таких як вірусні та бактеріальні білки, а також можливість розвитку у хворого імунної реакції навіть на практично повністю гуманізовані антитіла.

Для вдосконалення рекомбінантних антитіл з метою застосування у науководослідній діяльності можна змінювати такі властивості антитіл, як афінність та специфічність, а також вводити до послідовності антитіл додаткові а.о. для подальшого кон'югування з іншими молекулами, у тому числі і додавати до послідовності антитіл короткі амінокислотні послідовності («таги»), які дозволяють суттєво спростити процедуру очищення антитіл. Крім цього, генно-інженерні технології дозволяють створювати антитіла до тих антигенів, які не мають імуногенності або токсичні для тварин, які тому складно отримати, використовуючи гібридомну технологію.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційного відео про отримання антитіла *adalimumab* (Humira) за допомогою технології фагового дисплею

Матеріали: демонстраційне відео з процесу отримання моноклонального антитіла *adalimumab* (Humira) методом фагового дисплею; інформаційні роздаткові матеріали (схеми фагового дисплею, етапи селекції фагів, особливості структури антитіла Humira); друковані таблиці для аналізу ключових етапів технології; картки для обговорення в групах; бланки для індивідуальної письмової роботи; зошити або блокноти для записів; письмове приладдя (ручки, маркери).

Обладнання: персональний комп'ютер або ноутбук; мультимедійний проектор; інтерактивна дошка або фліпчарт; маркерна дошка для демонстрації результатів групової роботи; підключення до мережі Інтернет для перегляду відео; акустична система (колонки або навушники) для якісного озвучення демонстраційного матеріалу.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з принципом методу фагового дисплею:

- створення бібліотеки фагів, що експресують варіабельні ділянки антитіл на своїй поверхні;

- взаємодія між фаговим білком і специфічним антигеном;
- вибір та ампліфікація фагів з найвищою спорідненістю до антигену.

Завдання 2. Опрацюйте коротку довідку про моноклональне антитіло adalimumab (Humira): його мішень, терапевтичне застосування, біотехнологічне значення.

Завдання 3. Перегляньте демонстраційне відео щодо створення препарату моноклональних антитіл Humira методом фагового дисплею. Зверніть увагу на:

- тип фага (найчастіше — фаг M13),
- етапи створення бібліотеки антитіл,
- вибір фагів, що специфічно зв'язуються з ФНП-α,
- клонування генів антитіл у експресійні системи.
- отримання та перевірка активності готового препарату.

Завдання 4. Групове обговорення.

1. Об'єднайтесь у групи (по 3–5 осіб).
2. Заповніть аналітичну таблицю щодо ключових етапів отримання моноклональних антитіл за допомогою методу фагового дисплею.

Таблиця 5. Аналіз етапів отримання моноклонального антитіла adalimumab (Humira) за допомогою фагового дисплею

Етап	Мета етапу	Використані матеріали/інструменти	Короткий опис технологічного процесу
1. Конструювання бібліотеки антитіл			
2. Введення бібліотеки у фаги (трансформація)			
3. Експресія антитіл на поверхні фагів			
4. Біопанінг (відбір фагів, що зв'язуються з антигеном)			
5. Збагачення фагів з високою афінністю			
6. Секвенування обраних клонів			
7. Виробництво антитіла в клітинній лінії			
8. Очищення антитіла (наприклад, афінна хроматографія)			

4. Обговоріть у групі:

- У чому полягає ключова відмінність технології фагового дисплею від гібридної?
- Які переваги має препарат Numira як повністю людське антитіло?
- Які біоетичні переваги має ця технологія?
- У чому полягає цінність фагового дисплею для сучасної біофармацевтики?

5. Підготуйте коротку усну презентацію (до 5 хвилин) з висновками.

Завдання 5. Оформіть письмово короткі (індивідуальна робота) відповіді на такі питання:

1. Опишіть принцип технології фагового дисплею та її ключові етапи.
2. Які особливості препарату Numira порівняно з іншими терапевтичними антитілами?
3. У яких клінічних ситуаціях застосування Numira є обґрунтованим?
4. Які перспективи має технологія фагового дисплею у створенні антитіл наступного покоління?
5. Назвіть ключові біотехнологічні переваги отримання антитіл без використання тварин.

Контрольні питання

1. Що таке рекомбінантні антитіла і які переваги їх отримання за допомогою генно-інженерних методів у порівнянні з традиційною гібридною технологією?
2. Які типи рекомбінантних фрагментів антитіл існують і чим відрізняються між собою scFv, dsFv, Fab, diabody, triabody та tetraabody?
3. У чому полягає принцип методу дисплею і яку роль відіграє зв'язок між нуклеотидною послідовністю антитіла та його білковим продуктом?
4. Охарактеризуйте метод фагового дисплею: які етапи він включає і чому фаг M13 є оптимальним носієм у цій технології?
5. Порівняйте фаговий, рибосомний, мРНК і клітинний дисплей за критеріями складності, ефективності скринінгу та придатності для *in vitro* добору.
6. Які системи експресії використовуються для отримання рекомбінантних антитіл і які фактори впливають на вибір експресійної системи?
7. Як змінюється стабільність, спорідненість до антигену та час напіввиведення у різних типів рекомбінантних фрагментів антитіл?
8. Які методи використовуються для селекції найбільш афінних антитіл із великих бібліотек, і в чому різниця між відбором за кінетичними та рівноважними параметрами?
9. Які є клінічні та біотехнологічні переваги використання гуманізованих і химерних рекомбінантних антитіл у порівнянні з повністю мишачими антитілами?
10. У яких галузях медицини та біотехнології рекомбінантні антитіла знайшли найширше застосування, і які обмеження їх використання слід враховувати?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Одержання моноклональних антитіл за допомогою трансгенних тварин

Мета: ознайомитися з принципами отримання моноклональних антитіл за допомогою трансгенних тварин, що експресують гени імуноглобулінів людини; розглянути особливості побудови та функціонування моделей трансгенних організмів, які продукують повністю людські або химерні антитіла; поглибити розуміння процесів генної інженерії та біотехнологічного виробництва антитіл для терапевтичного застосування; проаналізувати демонстраційні відео щодо створення препаратів Opdivo (nivolumab), Vectibix (panitumumab) і Kevzara (sarilumab), отриманих за допомогою трансгенних мишей, з метою закріплення теоретичних знань та оцінки переваг цієї технології у сучасній біотехнологічній та фармацевтичній практиці.

Теоретичні відомості

1. Трансгенні тварини як продуценти людських антитіл.
2. Організація та експресія генів імуноглобулінів людини.
3. Трансгенні тварини, які продукують повністю людські антитіла.
4. Трансгенні тварини, які продукують химерні антитіла.
5. Успішні розробки антитіл, отриманих за допомогою трансгенних тварин.

Трансгенні тварини як продуценти людських антитіл

Трансгенні тварини забезпечують надійну платформу для отримання терапевтичних антитіл. Порівняно з іншими технологіями виробництва людських антитіл, трансгенні тварини мають кілька **переваг**:

- більш швидкий процес утворення антитіл,
- оскільки відбір йде *in vivo*, а не *in vitro*, виключено утворення антитіл з поганою розчинністю і іншими проблемами в подальшій розробці,
- відсутність потреби в гуманізації,
- більша різноманітність.

Однак великий розмір локусів Ig людини був **проблемою** під час розробки технології трансгенних мишачих антитіл. Крім того, продукція репертуарів антитіл трансгенними мишами подібних або порівнюваних з репертуарами антитіл у людей, потребує різноманітних перебудов у поєднанні з високою експресією V, D та J сегментів Ig людини.

Організація та експресія генів імуноглобулінів людини

Довгий час великою проблемою імунології була неможливість пояснити походження великої різноманітності антитіл. Відомо, що все різноманіття антитіл є неадекватним числу генів, які локалізовані в ядрі лімфоцитів. Так, в клітинах людини є загалом не більше 10^5 генів, а вважається, що може утворюватись 10^{11} варіантів Ig. Враховуючи догму молекулярної біології, один ген - один поліпептидний ланцюг, кількість генів для кодування антитіл всіх можливих специфічностей перевищувала б розмір геному хребетних. Після відкриття поліфункціональності антитіл (одне антитіло здатне зв'язуватись

більше, ніж з 1 антигеном) їх розрахована кількість значно знизилась (до 10^6 – 10^8 варіантів), але все ж таки залишалась високою.

Одна з перших теорій, що пояснювала весь арсенал можливого утворення антитіл – інструктивна гіпотеза: антиген, впливаючи на гнучку молекулу Ig, формує в ній комплементарний собі центр зв'язування. Але в 60-ті роки 20 ст. ця теорія зазнала поразки, перемогла клонально–селекційна теорія, яка була висунута одночасно Ерне і Бернетом, де стверджувалось, що кожний лімфоцит утворює Ig лише однієї специфічності, і антиген вибирає і стимулює клітини, які несуть антитіла, специфічні саме для цього антигену.

Але лишалося ще одне питання - які джерела різноманіття антитіл? Теоретично припустили, що існують свої особливі гени для антитіл кожної специфічності, але половина амінокислотної послідовності легкого ланцюга і четвертина важкого – є завжди варіабельною, а інші – константні. Як останні зберігають свій склад незмінним в разі начебто такої великої кількості генів антитіл? В 1965 році Дрейер і Беннет вперше запропонували, що V і C домени Ig кодуються різними генами, причому варіабельні домени кодуються великою кількістю генів, а константні – лише певною (невеликою) кількістю генів. А передумовою початку експресії цих генів є їх попередня перебудова (реаранжування).

Справа в тому, що в геномі незрілих чи зародкових В-клітин, як і в інших соматичних клітинах, гени, що кодують V і C домени одного ланцюга Ig, знаходяться хоч і на одній хромосомі, але є на значній відстані одне від одного (до 100000 п.н.). Така нативна локалізація генів отримала назву – зародкова лінія (англ. *germline*). При дозріванні В-клітини від про-В до зрілих плазмочитом відбувається реорганізація геному, а саме **вирізання=делетування** великого об'єму генетичної інформації, закладеної в ДНК, що забезпечує зближення V і C областей і утворення повного гену – тобто єдиної інформаційної ділянки, яка кодує легкі ланцюги та повного гену, що кодує важкі ланцюги Ig. Особливу перебудову зазнають гени варіабельних областей, які складаються з певних фрагментів, що розділені також великими генними сегментами, які делетуються в свою чергу, на етапах дозрівання В-клітин. Цей процес отримав назву **реаранжування** (перебудова) генів.

Гіпотеза, що V і C домени Ig кодуються різними генами, була блискуче доведена в 1976 році. Було знайдено, що в клітинах ембріону V і C гени знаходяться у різних ділянках ДНК, а в ДНК зрілої мієломи вони локалізуються в одному місці. Таким чином доведено, що в процесі онтогенезу гени Ig підлягають перебудові (реаранжуванню), реорганізації, в результаті якої V і C гени зближуються і об'єднуються.

За вивчення будови генів Ig C. Тонегава отримав Нобелівську премію 1987 року.

Таким чином ідея "кожному імуноглобуліноподібному білку в будь-якій клітині – свій ген" при існуючому розмірі геному була хибною. Природа вирішила його просто і чітко – успадковуються всього кілька сотень генів, які відповідають за структуру цих молекул.

Виявилось, що синтез антитіл кодується трьома різними родинами незчеплених генів, розташованих в різних хромосомах.

Отже існують три кластери генів Ig: H , k і λ , які кодують відповідні ланцюги Ig. Вони знаходяться на різних хромосомах. У людини: H -14, k - 2 і λ – 22 хромосомах, відповідно, у мишей – H - 12, k - 6 і λ - 16 хромосомах, відповідно.

До складу кластерів входять V і C гени важких і легких ланцюгів, а також J -гени (від англ. joining - поєднання) і D -гени (від англ. diversity - різноманітність). Важливо, що V -варіабельні домени важких і легких ланцюгів містять активний центр антитіла (англ. CDRs) = Fab-фрагменти, а C -константні ділянки, що визначають класи Ig, містять Fc фрагменти.

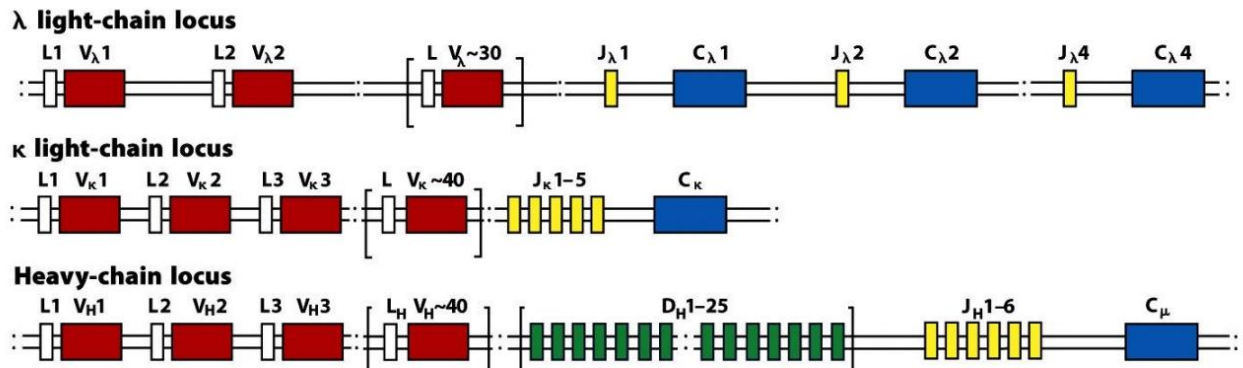


Рис. 10. Схематичне зображення організації кластерів генів імуноглобулінів (джерело: <https://www.creative-biolabs.com/blog/index.php/antibody-diversity/>)

1. **Кластер генів λ -ланцюга** складається із 30 V -генів (за рядом даних 200) і чотирьох пар J - і $C\lambda$ -генів (7 за деякими даними), тобто вони є зчепленими між собою – $J1 C\lambda1$; $J2 C\lambda2$ і т.д.

V -гени всіх ланцюгів мають лідерні L (сигнальні) послідовності, які кодують амінокислотну послідовність в основному з гідрофобними властивостями на N -кінці поліпептиду (16-18 а.к.з.), що забезпечує зв'язування з мембраною ЕПР та проходження всередину ЕПР, оскільки Ig- мембранозв'язані і експортні білки. Між V - і J -генами – сотні тисяч пар основ інтрону, між J - і C -генами – невеликий інтрон.

2. **Кластер генів κ -ланцюга** містить 40 V -генів, 5 J -генів (4 функційні) і 1 $C\kappa$ -ген.

3. **Кластер генів H -ланцюгів** побудований найскладніше. Він містить більше, ніж 1000 V -генів (із них функціональних 51), 27 (за деякими даними 30) DH -генів, 6 JH -генів та C -гени, що кодують важкі ланцюги всіх класів Ig.

По мірі дозрівання В-лімфоцитів відбувається реорганізація генів, які кодують Ig:

- сайт-специфічна рекомбінація VJ (для генів легких ланцюгів) – одна рекомбінаційна подія;
- сайт-специфічна рекомбінація DJ (1) і $V+DJ$ (2) – для генів важкого ланцюга – дві рекомбінаційні події;
- транскрипція цілого блоку $V(D) J$ -інтрон- C ;
- сплайсинг РНК з утворенням функціонального транскрипту $V(D)JC$;
- трансляція;
- посттрансляційне відщеплення лідерної послідовності.

Транскрипційний промотор активується тільки після проходження рекомбінації, тобто транскрипція неперебудованої ДНК не є можливою.

Схема перебудови генів імуноглобулінів: гени, що кодують варіабельні домени, утворюються в результаті сайт-специфічної рекомбінації.

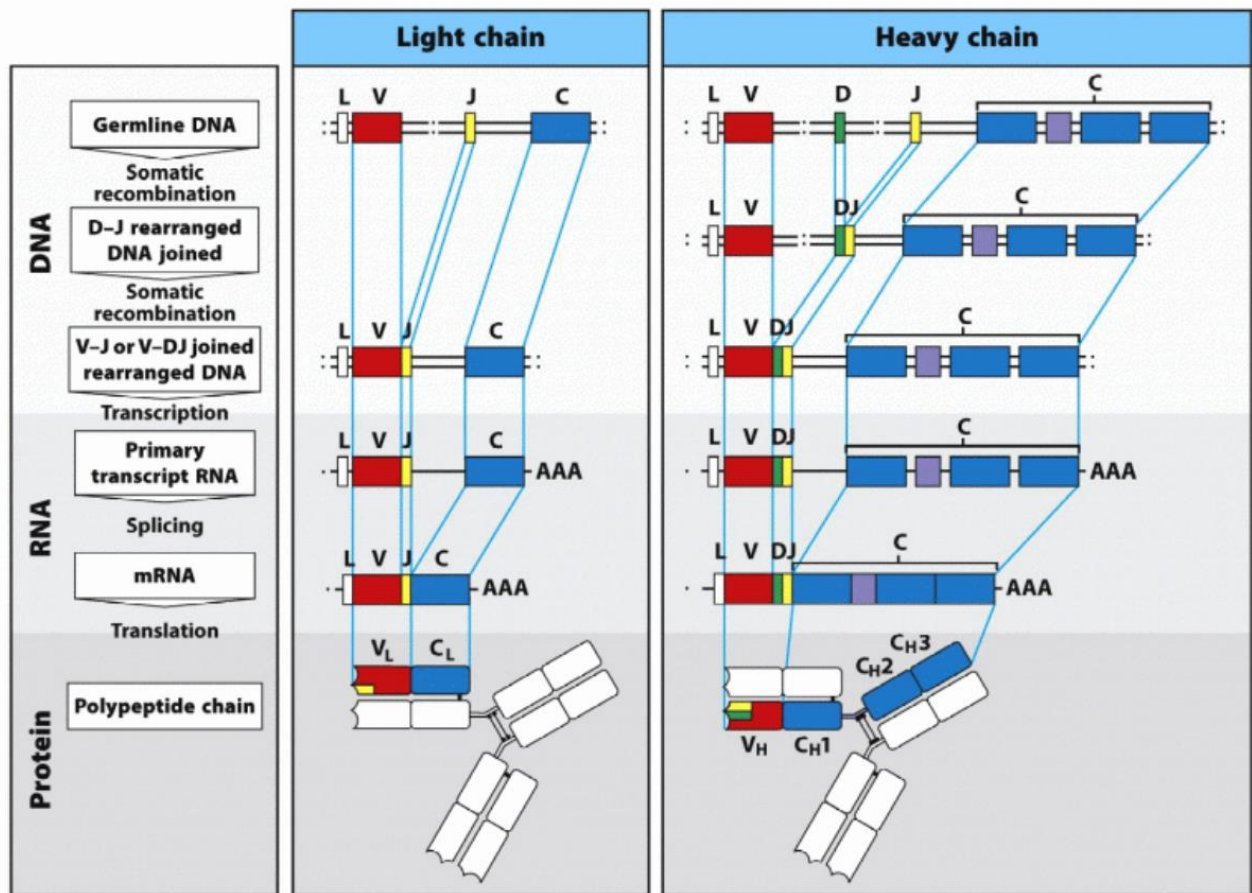


Рис. 11. Схема перебудови генів імуноглобулінів (джерело: <https://www.creative-biolabs.com/blog/index.php/antibody-diversity/>)

Легкі ланцюги: V- і J-генні сегменти геномної ДНК з'єднуються з утворенням повного екзону, що кодує варіабельний домен ланцюга. V-генного сегменту передуює екзон, що кодує лідерний пептид, що направляє синтезовані білки для подальшого секретування. С-домен ланцюга кодується іншим окремим екзоном і з'єднується з VJ екзоном при сплайсингу мРНК і видаленні L-V і J-C інтронів.

Важкі ланцюги: регіон складається з 3 типів генних сегментів. Спершу об'єднуються DJ сегменти, потім до них долучається V і утворюється повний V_H екзон. Константний регіон кодується кількома екзонами. На рівні мРНК відбувається сплайсинг LV_H і C_H екзонів, подальше відщеплення лідерного пептиду, утворення дисульфідних зв'язків, що зв'язують поліпептидні ланцюги. Фіолетовим показано шарнірну ділянку.

Щоб подолати основні проблеми, які пов'язані з отриманням антитіл за допомогою трансгенних тварин, були успішно використані різні стратегії для створення таких тварин, які експресують людський репертуар антитіл

Трансгенні тварини, які продукують повністю людські антитіла

Ідея отримання людських антитіл за допомогою трансгенних мишей була вперше запропонована в 1985 році, коли Alt та інші запропонували ввести гени, що кодують людські антитіла в зародкову лінію миші. Ця ідея була безпрецедентною і забезпечила новий напрямок для отримання людських антитіл.

У 1989 році Brüggenmann та ін. створили першу конструкцію для важкого ланцюга людського антитіла, що містила два гени людського VH, сегменти різноманітності (D), пов'язаних з об'єднувальним кластером важкого ланцюга людини (JH), і константної області μ . Конструкцію розміром 25 kb мікроін'єктували в запліднені яйцеклітини миші, що дозволяло її випадкову вставку в геном миші. Близько 4% В-лімфоцитів цих трансгенних мишей експресували людський ланцюг μ на достатніх для виявлених рівнях. Крім того, за допомогою цієї трансгенної лінії мишей (їх В-лімфоцитів) також можна створити гібридами для отримання людських антитіл класу M.

У 1992 році Taylor та ін. створили конструкцію для експресії легкого ланцюга κ людського антитіла. Дана конструкція містила один варіабельний ген легкого ланцюга каппа людини (V κ), з'єднувальний кластер легкого каппа ланцюга людини (J κ) і константну область каппа (C κ). Хоча миші експресували важкий ланцюг людини (VH-D-JH-C μ -C γ 1) і легкий κ -ланцюг людини, кількість людських антитіл становила менше 10% від загальної кількості антитіл, тому експресія людських антитіл була несумісною з експресією мишачого ендогенного Ig.

Водночас були створені різні лінії мишей з нокаутом Ig. У 1993 році Chen та ін. нокаутували гени JH і J κ за допомогою генно-цільової делеції, інактивуючи мишачий Ig таким чином. У спробі створити лінії, які могли б генерувати більш різноманітні людські антитіла, трансгенних мишей із людськими генами IgH та IgL потім схрещували з мишами нокаутними за IgH та IgL (мишачі варіанти).

У 1994 році Лонгберг та ін. створили першу лінію трансгенних мишей HuMabMouse, які експресують людські IgH та IgK. Оскільки різноманітність антитіл походить від генів V(D)J зародкової лінії, то зрозуміло, що введення більшої кількості варіабельних генів людини призведе до більшої різноманітності генерованих антитіл.

У 1997 році Mendez та ін. ввели більші людські гени IgK (~ 700 Kb) або IgH (~ 1 Mb) (за допомогою YAC) у мишачі ES-клітини, схрестивши таким чином мишей, які експресують людський Ig з мишами нокаутними за IgH та IgL (мишачі варіанти), і створили мишей XenoMouse. Як і очікувалося, XenoMouse експресують лише людські антитіла, а не мишачі. Незважаючи на те, що розробка цієї лінії усунула проблеми ендогенного Ig миші та розширила гени Ig людини, ефективність генерації антитіл людини, перемикування класів Ig та соматична гіпермутація все ще залишаються низькими через відсутність експресії гена константної області миші.

Трансгенні тварини, які продукують химерні антитіла

Щоб подолати недоліки пов'язані з експресією важкого ланцюга людського антитіла, необхідно зберегти вихідну константну мишачу область. Якщо химерне антитіло з людським Fab і мишачим Fc може бути створене в

миші, мишачий Fc буде модулювати передачу сигналів для соматичної гіпермутації під час дозрівання афінності антитіл і ефекторної функції антитіл.

Відповідно до цього у 2013 році Osborn та ін. зв'язали гени VH, D та JH людини з локусом константної області щурів. Великі сегменти людських IgH та IgL були субклоновані та зв'язані (за допомогою технології у якій використовувалися ВАС та дріжджова штучна хромосома YAC) з подальшою мікроін'єкцією мінілокусної плазмиди в запліднені ооцити щура. Тим часом ендогенні локуси Ig щурів були приглушені нуклеазою цинкового пальця (нуклеази цинкового пальця (англ. ZFN) – це штучні рестрикційні ферменти, що утворюються шляхом злиття ДНК-зв'язуючого домену цинкового пальця з доменом розщеплення ДНК. Кожен із цих білкових доменів здатний розпізнавати та специфічно пов'язувати певну послідовність молекули ДНК із трьох нуклеотидів). Отримана лінія щурів (OmniRat) для експресії химерних антитіл демонструвала вироблення антитіл, афінність до антигену та соматичні мутації, подібні до щурів дикого типу.

У 2014 році Lee та ін. використали ВАС з рекомбінацією Cre/loxP у ES-клітинах миші для створення лінії миші з людськими VH-D-JH та Vκ-Jκ, вставленими безпосередньо перед мишачими Cμ та Cκ-областями (KyMouse). Після імунізації антигеном KyMouse можуть здійснювати соматичну гіпермутацію та виробляти високоафінні химерні антитіла людини. В іншій спробі Murphy та ін. використовували ВАС для збирання великих людських генів Ig і серійно мікроін'єктували конструкції в ES-клітини миші. Гени IgH та IgL людини націлювалися на мишачі IgH та IgL і замінювали їх вище за константну область (миша VelocImmune).

Успішні розробки антитіл, отриманих за допомогою трансгенних тварин

Виробництвом людських антитіл трансгенними тваринами займаються сім компаній: Abgenix, XenoMouse (придбана Amgen в 2005); Medarex, HuMAbMouse (придбана Bristol Myers Squibb в 2009); Ligand, OmniRat; Kymab, KyMouse; Regeneron VelocImmune mouse; Harbour Antibodies, H2L2 Mouse і Trianni Inc., Trianni Mouse.

Перший препарат з антитілами, отриманий від трансгенних мишей, був схвалений FDA (англ. Food and Drug Administration) США в 2006 році. Людські моноклональні антитіла, схвалені FDA США Станом на 2019 рік, 19 препаратів антитіл, отримані від трансгенних тварин, створені за допомогою трансгенних ліній мишей, Xenomouse, HuMabMouse та VelocImmune, є на ринку. Вісім препаратів використовуються для лікування раку, а інші – для аутоімунних або запальних захворювань.

У США було створено сім антитіл, схвалених FDA за допомогою технології XenoMouse (див. таблицю в презентації). Наприклад, у 2006 році перший препарат, panitumumab (Vectibix, Amgen, людський IgG2/каппа), було схвалено для лікування метастатичного колоректального раку, при якому відбувається експресія EGFR (рецептор епідермального фактора росту; англ. epidermal growth factor receptor, EGFR). Ці антитіла блокують взаємодію EGFR

та його лігандів, що призводить до інгібування передачі сигналів EGFR та індукції апоптозу ракових клітин.

Два препарати з антитілами від XenoMouse використовуються для лікування аутоімунних дерматологічних захворювань. Один, secukinumab (Cosentyx, Novartis, людський IgG1), зв'язується з прозапальним цитокином IL-17 α для зменшення запалення при псоріазі. Інший — brodalumab (Siliq, Valeant Pharmaceuticals, людський IgG2), який зв'язується з рецептором IL-17, для пригнічення дії цитокинів родини IL-17. Ці препарати моноклональних антитіл були схвалені FDA США для лікування псоріазу в 2015 і 2017 роках, відповідно.

За допомогою технології HuMabMouse було отримано вісім препаратів антитіл, схвалених FDA США. Для лікування меланоми використовуються два препарати: ipilimumab (Yervoy, Bristol-Myers Squibb, людський IgG1) і nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb, людський IgG4/каппа); препарати були схвалені у 2011 та 2014 роках, відповідно.

Ipilimumab зв'язується з CTLA-4, інгібітором імунної контрольної точки, блокуючи його взаємодію з B7 на APC (антигенпрезентуючі клітини, англ. Antigen-presenting cells, APC) і змушуючи цитотоксичні Т-лімфоцити вбивати ракові клітини.

Nivolumab розпізнає PD-1 (англ. programmed cell death 1; CD279) — мембранний білок надродини імуноглобулінів, який відіграє важливу роль в клітинній диференціації імунних клітин, зменшуючи інгібіторну передачу сигналів для відновлення імунної відповіді пухлиноспецифічних Т-клітин у пацієнтів. Примітно, що ніволумаб також був схвалений для лікування недрібноклітинного раку легенів у 2018 році.

Серед препаратів моноклональних антитіл, отриманих від HuMabMouse, деякі використовуються для лікування аутоімунних захворювань. Наприклад, ustekinumab (Stelara, Johnson & Johnson, людський IgG1/каппа) зв'язується з цитокінами, особливо з субодинами р40 IL-12 та IL-23, блокуючи прозапальну передачу сигналів, що полегшує перебіг запального процесу). Цей препарат був схвалений для лікування важкого бляшкового псоріазу у 2009 році та для лікування хвороби Крона у 2016 році.

Миші VelocImmune — це трансгенна лінія химерних мишей другого покоління, яка дала чотири схвалені препарати. Dupilumab (Dupixent, Sanofi та Regeneron, людський IgG4) зв'язується з рецептором IL-4 та пригнічує шлях IL-4 та IL-13. Використовується як засіб для лікування екземи. Sarilumab (Kevzara, Sanofi та Regeneron, IgG1 людини) пригнічує передачу сигналів IL-6 шляхом зв'язування з рецептором IL-6 (IL-6R), який інакше посилював би вивільнення факторів, пов'язаних з ревматоїдним артритом, з гепатоцитів. Обидва препарати були схвалені в 2017 році.

Цікаво, що AstraZeneca незважаючи на доступ до технології XenoMouse і володіння Cambridge Antibody Technology (компанія фагового дисплею, що стоїть за Humira), заплатила понад 120 мільйонів доларів США за кілька пар мишей VelocImmune.

Таким чином, для того щоб підвищити різноманітність продуктів і створити кращі ліки на основі моноклональних антитіл, значні зусилля щодо розробки привели до створення трансгенних тварин (миші, щурі), що здатні

продукувати химерні, а також повністю людські антитіла другого покоління, протягом 30 років з моменту появи першої трансгенної миші в 1989 році. Постійне вдосконалення технологій (зокрема тих у яких використовуються трансгенні тварини) відкриває все більше можливостей для розробки препаратів моноклональних антитіл.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційних відео про отримання антитіл Opdivo (nivolumab), Vectibix (panitumumab) і Kevzara (sarilumab) за допомогою трансгенних мишей

Матеріали: демонстраційні відео з процесу отримання терапевтичних антитіл Opdivo (nivolumab), Vectibix (panitumumab) і Kevzara (sarilumab); інформаційні роздаткові матеріали (принципи створення трансгенних мишей, платформи XenoMouse™, VelocImmune™ тощо); порівняльні таблиці характеристик антитіл; картки з описом клінічних кейсів; бланки для індивідуальної роботи; зошити або блокноти для нотаток; письмове приладдя (ручки, маркери).

Обладнання: персональний комп'ютер або ноутбук; мультимедійний проектор; інтерактивна дошка або фліпчарт; маркерна дошка для демонстрації результатів групової роботи; підключення до мережі Інтернет для перегляду відео; акустична система (колонки або навушники) для якісного озвучення демонстраційних матеріалів.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з принципом методу отримання антитіл за допомогою трансгенних мишей.

Принцип методу. Технологія створення повністю людських антитіл за допомогою трансгенних мишей ґрунтується на внесенні генів важких і легких ланцюгів людських імуноглобулінів у геном миші з паралельною деактивацією мишачих Ig-генів. Після імунізації тварин відповідним антигеном їхні В-клітини продукують повністю людські антитіла, які потім можуть бути виділені, клоновані та масштабовані для терапевтичного використання.

Біотехнологічне значення. Технологія трансгенних мишей дозволяє отримувати антитіла з мінімальним ризиком імуногенності для людини. Цей підхід уникає складного процесу гуманізації мишачих антитіл і забезпечує швидке створення терапевтичних препаратів із високою специфічністю. Він широко використовується у фармацевтичній промисловості для розробки ліків проти онкологічних, аутоімунних, запальних захворювань.

Завдання 2. Опрацюйте коротку довідкову інформацію про препарати:

- Opdivo (nivolumab) — інгібітор PD-1, застосовується в імунотерапії раку (меланома, рак легенів, нирок),
- Vectibix (panitumumab) — антагоніст EGFR, використовується для лікування метастатичного колоректального раку,
- Kevzara (sarilumab) — антагоніст рецептора ІЛ-6, показаний для лікування ревматоїдного артриту.

Завдання 3. Перегляньте відео з процесу отримання кожного антитіла за допомогою трансгенних мишей. Зверніть увагу на:

- назву використаної технологічної платформи (наприклад, XenoMouse, VelocImmune, OmniRat),
- генетичну модифікацію тварин,
- протокол імунізації та ізоляції В-клітин,
- селекцію антитіл з найвищою специфічністю,
- масштабування продукції антитіл.

Завдання 4. Групове обговорення.

1. Об'єднайтесь у групи (по 3–5 осіб).
2. Заповніть аналітичну таблицю щодо ключових етапів щодо ключових аспектів створення кожного антитіла.

Таблиця 6. Порівняльний аналіз біотехнологічних характеристик антитіл Opdivo (nivolumab), Vectibix (panitumumab) і Kevzara (sarilumab), отриманих за допомогою трансгенних мишей

Препарат	Мішень	Платформа трансгенних мишей	Технологічні особливості	Клінічне застосування
Opdivo (nivolumab)				
Vectibix (panitumumab)				
Kevzara (sarilumab)				

3. Обговоріть у групі:

- Чому технологія трансгенних мишей є проривом у створенні людських антитіл?
- Які переваги має кожен препарат у своєму терапевтичному класі?
- Які ризики та етичні питання пов'язані з використанням трансгенних тварин?

4. Підготуйте коротку усну презентацію (до 5 хвилин) з висновками.

Завдання 5. Оформіть письмово короткі (індивідуальна робота) відповіді на такі питання:

1. У чому полягає суть створення трансгенних мишей для отримання людських антитіл?
2. Поясніть механізм дії одного з антитіл: Opdivo, Vectibix або Kevzara.
3. Яке біотехнологічне значення мають повністю людські антитіла?
4. Чим трансгенні платформи переважають класичну гібридомну технологію?
5. Які регуляторні та етичні аспекти враховуються при виробництві антитіл із використанням трансгенних мишей?

Контрольні питання

1. Які переваги використання трансгенних тварин порівняно з іншими платформами для отримання людських антитіл у терапевтичних цілях?
2. Які молекулярно-генетичні механізми забезпечують формування різноманіття антитіл у трансгенних тварин, і як вони пов'язані з реаранжуванням генів Ig?
3. У чому полягають технологічні складнощі інтеграції великих фрагментів людських генів імуноглобулінів у геном тварин, та як ці труднощі було подолано у моделі XenoMouse?
4. Чим відрізняються трансгенні тварини, що продукують повністю людські антитіла, від тих, що експресують химерні антитіла? У яких випадках доцільне використання кожного з підходів?
5. Яку роль відіграє збереження мишачої Fc-області у формуванні ефекторної функції антитіл при створенні химерних моделей?
6. Охарактеризуйте внесок трансгенних тварин у розробку терапевтичних антитіл, схвалених FDA. Які препарати були отримані з використанням моделей XenoMouse, HuMabMouse, VelocImmune?
7. Які генетичні зміни та біоінженерні інструменти застосовуються для нокауту ендогенних генів Ig у трансгенних мишей і щурів, і яка їх мета?
8. Чому соматична гіпермутація та афінне дозрівання є критично важливими для ефективності антитіл, і як ці процеси реалізуються в трансгенних моделях?
9. Які сучасні інструменти генної інженерії (BAC, YAC, ZFN) використовуються для створення трансгенних ліній тварин, і які з них забезпечують найбільшу стабільність експресії антитіл?
10. Які перспективи має використання трансгенних тварин у створенні терапевтичних засобів нового покоління, зокрема для персоналізованої медицини та лікування складних захворювань?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Одержання моноклональних антитіл за допомогою технології одиничних В-клітин

Мета: ознайомитися з принципами отримання моноклональних антитіл за допомогою технологій одиничних В-клітин; розглянути етапи ідентифікації та ізоляції антиген-специфічних В-лімфоцитів, ампліфікації, секвенування та клонування генів важкого (VH) і легкого (VL) ланцюгів імуноглобулінів; поглибити розуміння підходів до скринінгу реактивності антитіл і дослідження репертуару антитілоутворення на одноклітинному рівні; оцінити переваги й обмеження методу з точки зору біотехнологічного та терапевтичного застосування; проаналізувати демонстраційні відео щодо створення препаратів Palivizumab (Synagis), Ofatumumab (Arzerra) і Ibalizumab (Trogarzo), отриманих за допомогою технологій одиничних В-клітин, з метою закріплення теоретичних знань, візуалізації ключових етапів процесу та оцінки практичної цінності методу у сучасній біофармацевтиці.

Теоретичні відомості

1. Принцип методу одиничних В-клітин для отримання моноклональних антитіл.
2. Ідентифікація та ізоляція одиничних В-клітин.
3. Ампліфікація, секвенування та клонування генів V_H/V_L .
4. Скринінг реактивності антитіл.
5. Дослідження репертуару антитіл одиничних В-клітин.
6. Переваги і недоліки методу.

Принцип методу одиничних В-клітин для отримання моноклональних антитіл (англ. single B cell antibody technologies)

Технологія одиничних В-клітин базується на ідеї прямого отримання пар генів важкого (V_H) та легкого (V_L) ланцюгів імуноглобулінів із окремих В-лімфоцитів, які продукують специфічні антитіла до цільового антигену. У традиційних підходах (наприклад, гібридомна технологія) утримати природну пару V_H – V_L складно, що часто знижує функціональність або специфічність антитіл. Натомість технологія одиничних В-клітин дозволяє зберегти природну комбінацію ланцюгів, що формують антигензв'язувальний сайт антитіла.

Процес включає ідентифікацію антиген-специфічних В-клітин, ізоляцію окремих клітин, ампліфікацію та секвенування генів V_H та V_L , подальше клонування у експресійні вектори та виробництво рекомбінантних моноклональних антитіл.

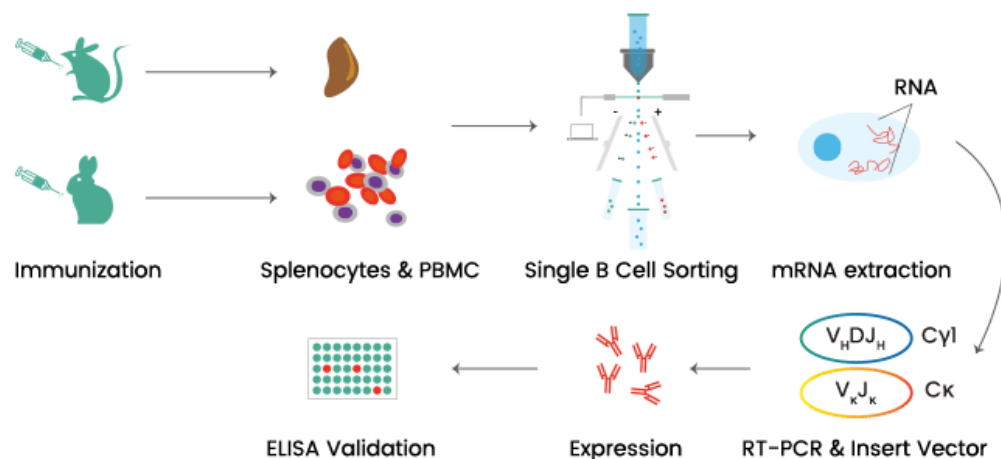


Рис. 12. Отримання антитіл шляхом клонування з одиничних В-клітин (джерело: <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/single-b-cell-technology>)

Ідентифікація та ізоляція одиничних В-клітин

Залежно від дослідницької мети, ізоляція одиничних В-клітин може здійснюватися випадковим чином або з урахуванням специфічності до антигену — з периферичної крові або лімфоїдних органів, таких як кістковий мозок. Для випадкової ізоляції В-клітин описано кілька підходів, зокрема мікроманіпуляція (cell picking), лазерна мікродисекція (laser capture microdissection), а також флуоресцентне сортування клітин (FACS). Альтернативно, селекція антиген-

специфічних В-клітин можлива за допомогою магнітних наночастинок, покритих антигеном, флуоресцентно мічених антигенів із подальшим сортуванням за FACS, гемолітичного тесту на формування бляшок та методу флуоресцентних фокусів. Також було розроблено мікрочипові системи на основі клітин для високопродуктивного скринінгу моноклональних антитіл, що секретуються одиничними антитіло-продукуючими клітинами.

Основною перевагою використання FACS у цьому контексті є можливість точного розмежування клітин за стадією їх розвитку та диференціації на основі експресії специфічних маркерів поверхні. У принципі, можна сортувати В-клітини на будь-якій стадії розвитку, але особливий інтерес становлять клас-специфічні пам'ятеві В-клітини та клітини-секретори антитіл (ASCs — плазмобласти й плазматичні клітини), які несуть соматично мutowані рецептори В-клітин (BCR) із високою спорідненістю. Наприклад, IgG⁺ пам'ятеві В-клітини, специфічні до тримерного gp140-антигену ВІЛ, були успішно відібрані в інфікованих пацієнтів за допомогою флуоресцентно міченого gp140.

На відміну від цього, ASCs, специфічні до вакцини, можуть бути ізольовані після імунізації без попереднього мічення антигеном. Для ефективного отримання специфічних моноклональних антитіл, необхідно оцінити імунну відповідь донора — наприклад, шляхом визначення частоти ASCs у периферичній крові за допомогою методу ELISpot перед ізоляцією одиничних клітин.

Крім того, розроблено високопродуктивні методи, які дозволяють ефективно виявляти В-клітини з бажаною специфічністю ще до клонування Іг-генів. Один із таких методів — м'яка літографія для мікрогравіювання (microengraving). У цьому підході до 100 000 поліклональних В-клітин, стимульованих мітогеном для перетворення на ASCs, осаджують в окремі мікролунки на спеціальному чипі. Потім ця мікролуночна матриця використовується для створення білкового мікрочипа, де кожен осередок містить антитіла, секретовані однією В-клітиною. Антитіла на чипі скринуються флуоресцентно міченими антигенами, що дозволяє зіставити специфічність із конкретною клітиною, яку потім вилучають мікроманіпуляцією та аналізують шляхом клонального розмноження або RT-PCR з одиничної клітини.

Схожий метод — це *імуноплямовий чип-аналіз* (ISAAC), розроблений групою Мурагучі. Як і в методі мікрогравіювання, окремі ASCs розміщують у мікролунки на чипі, поверхня якого вкрита антитілами проти Іг. Це дозволяє захоплювати секретовані антитіла навколо відповідної лунки. Додаткова інкубація з біотинільованим антигеном і флуоресцентним стрептавідином дозволяє візуалізувати специфічну взаємодію.

Технології microengraving і ISAAC мають очевидні переваги, зокрема можливість раннього та швидкого виявлення клітин, які продукують антитіла з високою спорідненістю до заданого антигену з поліклональної суміші. Крім того, вони значно спрощують скринінг на наявність реакцій до декількох антигенів, що дозволяє відібрати клони з різною специфічністю.

Ампліфікація, секвенування та клонування генів VH/VL

Побудова комплементарної ДНК (кДНК) з одиничних В-клітин забезпечує неупереджений підхід до одночасного аналізу експресованих генів важкого (IgH) і легкого (IgL) ланцюгів імуноглобулінів. Як правило, синтез кДНК з одиничної клітини здійснюють безпосередньо в тій самій лунці мікропланшета (наприклад, у 96-лунковій планшетці), в якій проводили депозицію клітини та її лізис. Це спрощує роботу з великою кількістю зразків і мінімізує ризик перехресної контамінації.

Слід зазначити, що різні типи В-клітин мають неоднакову кількість мРНК транскриптів Ig-генів. Наприклад, порівняно з пам'ятевими В-клітинами, активовані плазмобласти (ASCs) містять значно більше мРНК Ig-генів, що полегшує специфічну ампліфікацію.

Як правило, повнорозмірні транскрипти Ig-генів ампліфікують за допомогою вкладеної (nested) або напіввкладеної (semi-nested) RT-PCR. При цьому зворотна транскрипція (RT) може бути виконана у форматі одностадійної реакції разом із першим циклом ПЛР. Зазвичай використовують суміш прямих праймерів, комплементарних до лідерних послідовностей V-генів IgH та IgL, а також один зворотний праймер, специфічний до константної ділянки. За потреби, наприклад при сортуванні клітин без урахування ізо типу, використовують суміш зворотних праймерів, які охоплюють різні ізо типи важкого ланцюга. У другому раунді використовують вкладені праймери або їх суміші для підвищення чутливості та специфічності. На цьому етапі також можуть бути додані сайти рестрикції для подальших етапів клонування.

Як альтернатива, можна збирати лінійні експресійні касети, які трансфікують у ссавців для експресії ампліфікованих Ig-генів *in vitro*.

Також досліджуються стратегії з'єднання перебудованих генів важкого та легкого ланцюгів у процесі ампліфікації. Наприклад, Мейєр зі співавт. розробили мультиплексну RT-PCR на одиничних клітинах, яка поєднує ампліфікати IgH і IgL під час ПЛР завдяки етапу розширення за перекриттям (overlap extension). Отримані об'єднані фрагменти потім клонують у відповідні експресійні вектори для продукування моноклональних антитіл.

Хоча методи RT-PCR на одиничних клітинах є відносно простими, не всі протоколи дозволяють ампліфікувати всі функціональні V-гени IgH та IgL через обмеження у наборі праймерів. Технологія 5'-RACE (швидка ампліфікація 5'-кінців кДНК) дозволяє ампліфікувати невідомі 5'-кінці мРНК. Попри те, що класичні методики 5'-RACE непридатні для роботи з одиничними клітинами через малу кількість мРНК, вдосконалені протоколи вже продемонстрували ефективність для ізоляції Ig-генів з одиничних В-клітин.

Незалежно від обраної стратегії ампліфікації, отриману транскрипційну інформацію з одиничної клітини, яка кодує специфічність антитіла, рятують шляхом секвенування. Перебудовані сегменти V, D і J легко ідентифікують і аналізують на наявність мутацій, вставок або делецій з використанням спеціалізованих баз даних, таких як IgBLAST від NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

Скринінг реактивності антитіл

Для визначення реактивного профілю та біофізичних характеристик антитіл або їх фрагментів білки необхідно експресувати, очищати та тестувати в різноманітних аналітичних системах. Зручно, що у клітинних мікрочип-системах скринінг реактивності може бути проведений ще до клонування генів імуноглобулінів. Однак для детального аналізу відповідних антитіл кроки молекулярного клонування генів Ig є незамінними, оскільки для досліджень потрібні великі кількості білка. Найпоширенішими системами експресії є бактеріальні системи (наприклад, *Escherichia coli*) або транзиторні й/або стабільні системи на основі клітин ссавців (наприклад, клітини НЕК 293, СНО). У *E. coli* клоновані гени Ig зазвичай експресують у форматі антигензв'язувальних фрагментів (F_{ab}), тоді як у клітинах ссавців — у повноцінному форматі IgG.

Дослідження репертуару антитіл одиначних В-клітин

Класичні аналізи репертуару антитіл у мишей та людини на рівні окремих клітин суттєво поглибили наше розуміння загальних принципів імунології В-клітин. Спочатку гени імуноглобулінів (Ig) з окремих В-клітин досліджували на геномному рівні за допомогою ПЛР з одиначної клітини з метою з'ясування молекулярних основ перебудови Ig-генів та подій алельного виключення. Наступним кроком стало впровадження стратегій синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з одиначних В-клітин для неупередженого опису репертуару антитіл у мишей та людини. Значний прогрес у розумінні експресованого людського антитілового репертуару було досягнуто групою Нусензвайга, яка започаткувала дослідження специфічності В-клітин на різних етапах їх розвитку та диференціації.

Аналіз рекомбінантних моноклональних антитіл, клонованих з окремих В-клітин здорових осіб, показав, що більшість новостворених В-клітин у кістковому мозку є самореактивними, а два контрольні механізми — у кістковому мозку та на периферії — здійснюють негативний відбір самореактивних клонів під час розвитку В-клітин. Дослідження, проведені групою МефFRE, засвідчили, що вроджені імунні шляхи необхідні для елімінації самореактивних незрілих В-клітин. На основі аналізу В-клітин у пацієнтів з аутоімунними захворюваннями було запропоновано, що порушення толерантності на цих контрольних етапах пов'язане з розвитком системного червоного вовчак (СЧВ) та ревматоїдного артриту. Подальші дослідження описали третій контрольний етап, який здійснює селекцію проти самореактивності під час диференціації IgM⁺-пам'яті В-клітин. Водночас, несподівано, IgG⁺-пам'ятеві В-клітини у здорових донорів часто експресують самореактивні антитіла.

Окрім фундаментальних досліджень біології В-клітин, було створено системи для ізоляції цінних моноклональних антитіл від імунізованих донорів з потенційним терапевтичним застосуванням, для виявлення епітопів або створення вакцин. Через етичні обмеження неможливо цілеспрямовано імунізувати людей будь-яким антигеном, тому важливим є доступ до відповідних донорів, у яких можна отримати плазмобласти (ASCs) або пам'ятеві В-клітини, що продукують антитіла до цільового антигену. Найкращими кандидатами є вакциновані особи, яких можна обстежити через 6–14 діб після імунізації,

оскільки саме в цей період гуморальна відповідь є найширшою, і можна виділити антитіла до багатьох епітопів імуногену.

Це яскраво продемонструвала лабораторія Вілсона, яка отримала понад 50 людських антитіл до вакцини проти грипу з плазмобластів, ізольованих у донорів на 7-й день після щеплення. Цікаво, що до 80% ASCs, виділених у цей період, були специфічними до вірусу грипу. Ізоляція ASCs з периферичної крові під час піку імунної відповіді є критично важливою, оскільки ці клітини швидко покидають кровотік, мігруючи до кісткового мозку, де диференціюються в довгоживучі плазматичні клітини, які підтримують гуморальну пам'ять протягом усього життя.

Альтернативно, пам'ятеві В-клітини можна ізолювати з периферичної крові людей, які перенесли природну інфекцію або вакцинацію, навіть через кілька місяців чи років після контакту з антигеном. Хоча точна кореляція між частотою антигенспецифічних пам'ятевих В-клітин і титром сироваткових антитіл у людей ще не з'ясована, вимірювання сироваткових титрів антитіл є корисним для ідентифікації відповідних донорів.

Наприклад, Шайд зі співавторами дослідили пам'ятеву відповідь В-клітин проти ВІЛ у шести пацієнтів з широкою нейтралізацією вірусу сироватковими антитілами. Було ізольовано 502 моноклональні антитіла з окремих В-клітин, зв'язувальних із оболонкою ВІЛ, 433 з яких мали специфічну спорідненість до рекомбінантного gp140-антигену. Хоча жодне з них не проявляло широкої нейтралізації щодо всіх штамів ВІЛ, комбінація окремих антитіл демонструвала широкий нейтралізуючий ефект. Подібний підхід дозволив отримати антитіла, активні проти понад 90% циркулюючих штамів ВІЛ-1.

Загалом ці результати дають важливу інформацію про імунну відповідь на ВІЛ і мають вирішальне значення для обґрунтованої розробки вакцин. Крім того, клонування Ig-генів з одиничних клітин дозволило охарактеризувати динаміку та різноманітність антитілової відповіді на анатоксин правця, а також репертуар В-клітин, специфічних до RhD-антигену. Нещодавно за допомогою клітинних мікрочипів було отримано та охарактеризовано моноклональні антитіла до поверхневого антигену вірусу гепатиту В.

У сукупності ці дослідження демонструють універсальність підходів на основі одиничних В-клітин для отримання цінних антигенспецифічних антитіл.

Переваги і недоліки методу

Технології одноклітинного отримання антитіл є інноваційним підходом до ізоляції, аналізу та клонування антитіл безпосередньо з окремих В-лімфоцитів. Завдяки високій точності, швидкості та можливості збереження природного варіанту антитілоутворення, цей метод активно впроваджується у фундаментальних і прикладних дослідженнях, зокрема для створення терапевтичних моноклональних антитіл. Водночас він має як значні переваги, так і певні технологічні обмеження.

Переваги технологій одноклітинного отримання антитіл:

- Збереження природної пари VH/VL-ланцюгів забезпечує високу афінність, специфічність та функціональність отриманих антитіл, що важливо для терапевтичного та діагностичного застосування.

- Швидкість генерації моноклональних антитіл — готові рекомбінантні антитіла можна отримати протягом 1–2 тижнів після ізоляції В-клітин.
- Відсутність потреби у гібридомізації чи використанні лабораторних тварин для створення стабільної лінії, що спрощує процедуру та знижує етичні ризики.
- Можливість прямого використання людських біологічних зразків дозволяє отримувати повністю людські антитіла, що значно знижує ризик імуногенності при терапевтичному застосуванні.
- Висока релевантність до персоналізованої медицини, а також ефективність у випадку нових інфекцій, де важлива оперативність та специфічність імунної відповіді.

Недоліки технологій одноклітинного отримання антитіл:

- Висока вартість інфраструктури — потреба у дорогому обладнанні (FACS, високопродуктивні секвенатори, експресійні системи) обмежує доступність методу.
- Необхідність роботи у стерильних умовах та залучення висококваліфікованого персоналу, що підвищує вимоги до лабораторної бази.
- Імовірність втрати інформації на етапах зворотної транскрипції (RT-PCR), ампліфікації або клонування, що може вплинути на точність відтворення антитіл.
- Обмежене охоплення повного антитільного репертуару, особливо в умовах низької імунної відповіді або при тривалому інтервалі після контакту з антигеном.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційних відео про отримання антитіл palivizumab (Synagis), ofatumumab (Arzerra) і ibalizumab (Trogarzo) за допомогою технологій одиничних В-клітин

Матеріали: демонстраційні відео з процесу отримання моноклональних антитіл palivizumab, ofatumumab і ibalizumab методом Single B Cell Technology; інформаційні роздаткові матеріали (схеми ізоляції одиничних В-клітин, етапи секвенування та клонування); порівняльні таблиці характеристик антитіл; картки з клінічними кейсами; бланки для індивідуальної роботи; зошити або блокноти для нотаток; письмове приладдя (ручки, маркери).

Обладнання: персональний комп'ютер або ноутбук; мультимедійний проектор; інтерактивна дошка або фліпчарт; маркерна дошка для демонстрації результатів групової роботи; підключення до мережі Інтернет для перегляду відео; акустична система (колонки або навушники) для якісного озвучення демонстраційних матеріалів.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з принципом методу одиничних В-клітин.

Принцип методу. Технологія отримання моноклональних антитіл за допомогою одиничних В-клітин (англ. *Single B Cell Technology*) ґрунтується на ідентифікації, ізоляції та аналізі окремих В-лімфоцитів, які продукують

специфічні антитіла проти заданого антигену. Після сортування одиничних В-клітин проводиться ампліфікація генів VH та VL, їх секвенування, клонування у відповідні експресійні конструкції, трансфекція клітинної лінії та продукція повноцінного антитіла.

Біотехнологічне значення. Технологія одиничних В-клітин дозволяє отримати повністю людські антитіла без застосування гібридомної технології або трансгенних тварин. Це пришвидшує процес створення високоспецифічних антитіл з мінімальним ризиком імуногенності та є незамінною платформою у розробці новітніх біофармацевтичних препаратів для терапії інфекційних, автоімунних та онкологічних захворювань.

Завдання 2. Опрацюйте коротку довідкову інформацію про терапевтичні антитіла:

- palivizumab (Synagis) — профілактика важких інфекцій, викликаних РС-вірусом, у недоношених дітей;
- ofatumumab (Arzerra) — терапія хронічного лімфолейкозу (CLL), націлений проти CD20;
- ibalizumab (Trogarzo) — лікування ВІЛ-інфекції у пацієнтів із мультирезистентним вірусом, націлений проти CD4.

Завдання 3. Перегляньте відео процесу створення кожного антитіла за допомогою технологій одиничних В-клітин. Зверніть увагу на:

- джерело В-клітин (донори або пацієнти);
- методики сортування (FACS, мікрофлюїдика);
- ампліфікацію та клонування генів антитіл;
- експресію та перевірку функціональної активності отриманих антитіл;
- масштабування та очищення.

Завдання 4. Групове обговорення.

1. Об'єднайтесь у групи (по 3–5 осіб).
2. Заповніть аналітичну таблицю аналізу для кожного препарату.

Таблиця 7. Порівняльний аналіз отримання терапевтичних антитіл за допомогою технології одиничних В-клітин

Препарат	Мішень	Джерело В-клітин	Особливості виділення антитіл	Клінічне застосування
Palivizumab				
Ofatumumab				
Ibalizumab				

4. Обговоріть у групі:

- У чому полягає перевага технології одиничних В-клітин у порівнянні з гібридомною?
- Які клінічні потреби зумовили розробку кожного з антитіл?
- Які етичні або технічні аспекти є критичними при роботі з людським матеріалом?

5. Підготуйте коротку усну презентацію (до 5 хвилин) з висновками.

Завдання 5. Оформіть письмово короткі (індивідуальна робота) відповіді на такі питання:

1. У чому полягає принцип технології одиничних В-клітин?
2. Порівняйте підхід одиничних В-клітин із фаговим дисплеєм.
3. Які характеристики антитіла palivizumab забезпечують його ефективність проти RSV?
4. Чому ibalizumab є важливим у терапії мультирезистентного ВІЛ?
5. Які перспективи має технологія одиничних В-клітин у персоналізованій медицині?

Контрольні питання

1. У чому полягає основна перевага технології одиничних В-клітин порівняно з гібридомною технологією щодо збереження специфічності антитіл?
2. Які ключові етапи включає метод отримання антитіл з одиничних В-клітин?
3. Які методи використовують для селективної ідентифікації антиген-специфічних В-клітин?
4. Чому клітини-секретори антитіл (ASCs) є цінним джерелом для отримання моноклональних антитіл?
5. Як технології microengraving та ISAAC дозволяють виявляти В-клітини, що секретують специфічні антитіла?
6. Які особливості ампліфікації генів VH/VL при роботі з одиничними В-клітинами?
7. Які обмеження можуть виникати при використанні RT-PCR для ампліфікації Ig-генів?
8. Чому експресія антитіл у клітинах ссавців вважається кращою для повноформатних IgG?
9. Яке біологічне значення мають дослідження репертуару антитіл з одиничних В-клітин у контексті аутоімунних захворювань?
10. Назвіть щонайменше три переваги та три недоліки технології одноклітинного отримання антитіл.

ЧАСТИНА 3. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ НА ОСНОВІ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Імунологічні методи, засновані на використанні імунобіологічних препаратів, є важливим інструментом для виявлення, аналізу та кількісного визначення біомолекул у діагностичних, наукових і медичних дослідженнях. Вони ґрунтуються на специфічній взаємодії антигенів з антитілами, що дозволяє ідентифікувати збудників захворювань, визначати рівень біомаркерів і досліджувати імунні реакції організму.

Лабораторні роботи в цій частині охоплюють класичні та сучасні імунологічні методи, серед яких:

- Серологічні реакції, що використовуються для виявлення антигенів та антитіл у біологічних рідинах;
- імуноферментний аналіз (ІФА), який дозволяє кількісно визначати імуноглобуліни та інші білки за допомогою мічених ферментами антитіл;

- методи ELISpot і FluoroSpot, що допомагають оцінити клітинну імунну відповідь на рівні продукції цитокінів;
- імунохроматографічний аналіз (ІХА), який використовується у швидкісній діагностиці інфекційних захворювань;
- методи імунофлюоресценції (ІФ), імуногістохімії (ІГХ) та імуноцитохімії (ІЦХ), що дозволяють візуалізувати та ідентифікувати білки у тканинах та клітинах;
- імунопреципітація хроматину (ChIP), яка дає змогу аналізувати білок-ДНК взаємодії;
- Вестерн-блот – метод аналізу білкового складу біологічних зразків.

Метою цієї серії лабораторних робіт є оволодіння здобувачами практичними навичками постановки імунологічних реакцій, аналізу отриманих даних та оцінки їх діагностичного значення. Вивчення цих методів є необхідним для розуміння сучасних підходів у медицині, фармацевтиці, біотехнології та наукових дослідженнях, що використовують імунобіологічні препарати.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Серологічні реакції. Реакції преципітації, нейтралізації та зв'язування комплементу

Мета: ознайомитися з основними типами серологічних реакцій, їх біологічним і діагностичним значенням, засвоїти класифікацію та механізм дії реакцій преципітації, нейтралізації та зв'язування комплементу; розглянути різновиди реакцій преципітації, зокрема метод подвійної імунодифузії за Оухтерлоні, та оволодіти навичками їх постановки для виявлення взаємодії антигенів та антитіл у гелевому середовищі.

Теоретичні відомості

1. Поняття про серологічні реакції та їх застосування.
2. Класифікація серологічних реакцій.
3. Різновиди реакцій преципітації.
4. Реакція нейтралізації.
5. Реакції за участю комплементу або реакція зв'язування комплементу.

Поняття про серологічні реакції та їх застосування

Серологічна (від лат. serum – сироватка) **реакція** або (рідше) **гуморальна** – це реакція специфічної взаємодії антитіла з відповідним антигеном, в результаті якої утворюється комплекс антиген-антитіло (іmunний комплекс), і при якій один з інгредієнтів невідомий. Серологічні реакції відбуваються в організмі для боротьби з антигеном, а у лабораторних умовах їх застосовують для розв'язання діагностичних проблем.

***Серологія** (від лат. слів serum – сироватка і logos – знання) – це вчення про сироватку крові та її властивості.

Серологічні реакції протікають у дві фази, які розрізняються між собою за механізмом і швидкістю.

Перша фаза (специфічна) – специфічне поєднання активного центру антитіла з відповідними групами антигену або гаптену ⇒ **видимих змін немає**.

***Гаптени** (англ. *hapten*) – низькомолекулярні молекули, що можуть зв'язуватись з антигенним детермінантом/епітопом, але які самі не є антигенними (через малий розмір), аж поки не утворять комплекс з антигенним носієм (відповідною макромолекулою, зокрема такою як протеїн). Гаптенами є, наприклад, динітрофеноли, фосфорилхоліни та декстран.

Друга фаза (неспецифічна) – комплекс антиген-антитіло взаємодіє з неспецифічними факторами середовища, наприклад електроліти (розчини солей), комплемент (набір імунних білків, що містяться в сироватці крові – кров без формених елементів) ⇒ **результат взаємодії видно неозброєним оком** (склеювання, розчинення, помутніння).

Перша фаза протікає швидко, а друга іноді дуже повільно. Ефективність взаємодії антиген-антитіло

Ефективність взаємодії антитіла з антигеном залежить від різних умов:

- рН середовища,
- температури,
- осмотичного тиску (***осмотичний тиск** – це зв'язуюча здатність водних розчинів, що залежить від кількості розчинених частинок, але не від природи розчиненої речовини або розчинника. Осмотичний тиск створюється в тих випадках, коли розчин відділений від чистого розчинника мембраною, яка вільно прохідна для розчинника, але непроникна для розчинених речовин. Кількість речовин в розчині прийнято позначати в мілімоль на 1 л (ммоль/л)),
- сольового складу середовища і т.д.

Найбільш прийнятними для реакції антиген-антитіло є фізіологічні умови внутрішнього середовища макроорганізму.

***Афінність** – це міра взаємодії (або сила зв'язку) відповідних комплементарних ділянок антигену й антитіла або двох антитіл. Чим більше вони підходять один одному, тим більше утворюється міжмолекулярних зв'язків і тим вищою буде стійкість утворюваного імунного комплексу.

***Авідність** – це міцність зв'язування антигену з антитілом. Вона визначається афінністю і числом антиген-зв'язуючих центрів на одну молекулу антитіла. При рівній афінності найбільшою авідністю володіють антитіла класу М.

Назви серологічних реакцій різноманітні, вони відбивають переважно те, що відбувається з антигеном. Наприклад, реакція преципітації, аглютинації, лізису, зв'язування комплементу. Відповідно й антитіла, які беруть участь у такій реакції, називають преципітинами, аглютинінами, лізинами, комплементзв'язувальними, антитоксинами, віруснейтралізуючими антитілами тощо. Реально це може бути одне й те саме антитіло, але зовнішній результат реакції різний через різницю умов постановки та обліку. Якщо кажуть, що виявлено аглютиніни, це означає, що антитіла виявлено у реакції аглютинації тощо.

Застосування серологічних реакцій

Використання серологічних реакцій лежить в основі серологічних методів аналізу (досліджень). Серологічні методи аналізу – це методи вивчення визначених антитіл чи антигенів у сироватці крові хворих, засновані на імунологічних реакціях. Серологічні реакції використовують з метою:

- серодіагностики інфекційних хвороб, тобто для виявлення невідомих антитіл або антигенів у сироватці крові хворого за допомогою відомого антигену (діагностикуму) або антитіла (сироватки);
- серологічної ідентифікації – визначення виду мікроорганізмів за допомогою стандартних діагностичних сироваток

Класифікація серологічних реакцій

Серологічні реакції класифікують наступним чином.

- Двокомпонентні: прості; складні.
- Трикомпонентні: прості; складні.
- Розрізняють наступні серологічні реакції, які використовують у серологічних дослідженнях:
 - реакції, що ґрунтуються на феномені аглютинації,
 - реакція преципітації (РП),
 - реакція нейтралізації (РН),
 - реакція за участю комплементу або реакція зв'язування комплементу (РЗК),
 - реакції з використання мічених АТ або АГ (реакція імуофлуорисценції – РІФ, радіоімунний аналіз – РІА, імуоферментний аналіз – ІФА).

Реакції преципітації

Реакції преципітації (від лат. praecipito – осаджувати) запропоновані Краусом (1897 р.) і засновані на феномені утворення видимого осаду (преципітату) або загального помутніння середовища після взаємодії розчинних або у колоїдному дисперсному стані АГ з АТ.

Реакція преципітації (РП) – це взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) й антитіла (преципітину) за наявності електроліту (0,85% розчин натрію хлориду, нейтральний рН) з утворенням осаду (преципітату) чи помутніння (рис. 13).

**Як преципітиногени можуть бути використані білки тваринного, рослинного і бактеріального походження: кров, сироватка крові, екстракти з різних органів і тканин, харчових продуктів білкового походження (м'ясо, риба, молоко), фільтрати культур мікроорганізмів або тканин, уражених ними.*

**Відрізняється від аглютинації за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні, навіть цілі клітини, а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані.*

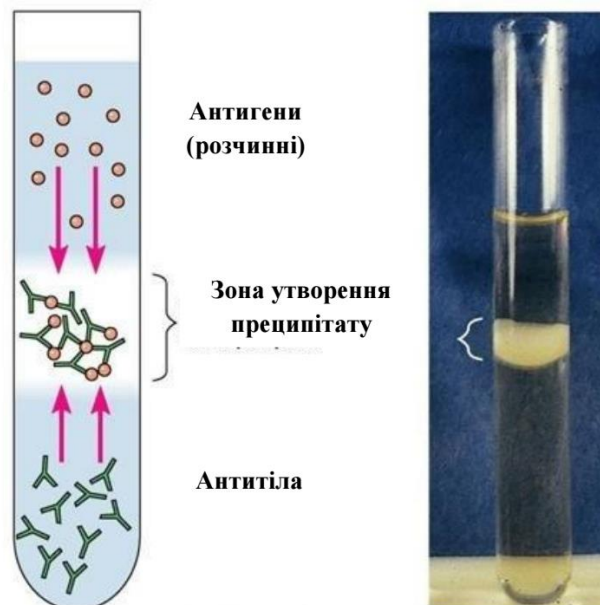


Рис. 13. Реакція преципітації

РП має високу чутливість і специфічність. Вона дає змогу виявити антиген у розведенні 1 : 1 000 000 і 1 : 10 000 000. Реакцію ставлять шляхом нашарування розчину антигену на імунну сироватку. При оптимальному співвідношенні антиген-антитіло на границі цих розчинів утвориться непрозоре кільце преципітату. Діаметр кільця преципітації пропорційний концентрації антигену. Найбільше поширення одержала реакція преципітації в гелі (подвійна імунодифузія, імуноелектрофорез і ін.).

Існує декілька варіантів реакції преципітації: реакція флокуляції, кільцепреципітація, імунодифузія (преципітація в гелі), імуноелектрофорез (поєднання імунодифузії з електрофорезом). Преципітацію можна проводити у рідкому (флокуляція та кільцепреципітація) та щільному (преципітація в гелі) середовищах.

Реакція флокуляції є різновидом преципітації у рідкому середовищі. Використовується для виміру сили токсинів і анатоксинів бактерій, зокрема дифтерійного анатоксина. Для визначення специфічності взаємодії антигена і антитіла змішують у пробірках однакові об'єми цільної (або розведеної у 2 рази сироватки) і розведеного фізіологічним розчином антигена. В процесі інкубації при 45°C спостерігають, в якій пробірці раніше утворилися ніжні хлоп'я (ініціальна флокуляція). Кількість антитоксичних одиниць сироватки у пробірці з ініціальною флокуляцією відповідає кількості одиниць анатоксина. Реакцію можна ураховувати точніше за допомогою вимірювання мутності реакційної суміші на фотоелектроколориметрі.

Кільцепреципітація – якісна реакція преципітації. Проводиться у спеціальних тонких преципітаційних пробірках, куда спочатку наливають нерозведену преципітуючу сироватку, а зверху на неї нашаровують розчин антигена у зростаючих розведеннях, не допускаючи змішування двох шарів. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі розділу шарів сироватки і антигена спочатку з'являється слабка опалесценція, а потім чітке кільце білуватого кольору – преципітат. На відміну від аглютинації титр преципітуючої

сироватки визначається по титру антигена, тобто по тій найменшій кількості антигена, яка ще дає преципітат. Реакція кільцепреципітації дуже чутлива і специфічна і дозволяє виявляти антигени, розведені у тисячі і навіть мільйони разів. Кільцепреципітація використовується для визначення збудників хвороб по наявності певних антигенів, а також для визначення видової приналежності крові тварин за допомогою людських, курячих та інших сироваток.

Реакція термопреципітації Асколі – різновид реакції кільцепреципітації. Вона основана на тому, що преципітиногени проявляють значну стійкість до високої температури, витримують довготривале кип'ятіння, зберігаючи при цьому здатність реагувати з антитілами. Реакція термопреципітації Асколі використовується в основному для діагностики сибірської виразки (сибірки).

Реакції преципітації в гелі проводяться на щільних середовищах – на 1% агарі чи агарозі у чашках Петрі або на скляних пластинках. Вперше цей метод запропонував Дж. Оудін ще у 1946 р., встановивши, що антитіла сироваток можуть здійснювати дифузію в гелі та зв'язуватись прямо в ньому з антигенами. Іншими вченими були запропоновані модифікації методу преципітації в гелі. Деякі з них ми розглянемо нижче.

Зустрічна двомірна дифузія (метод Оухтерлоні) дозволяє аналізувати не одну пару “антиген – антитіло”, а складні суміші мікробних антигенів і різних білків сироватки. На чашках Петрі з агаром роблять невеличкі (діаметром 5-6 мм) лунки: одна – в центрі, інші – по периметру, на відстані 1-2 см від центральної. В центральну лунку вносять антиген, а в інші – різні сироватки (або навпаки). Антигени і антитіла здійснюють дифузію у гель і починають рухатись назустріч один одному. Через 1-3 доби інкубації при кімнатній температурі в місцях, де зустрічаються специфічні антиген і антитіло, в гелі утворюються білуваті дугоподібні смужки – лінії преципітації. Якщо лінії преципітації з'являються біля декількох лунок, то в досліджуваному матеріалі є декілька компонентів, що вступають в реакцію.

Проста радіальна імунодифузія (метод Манчині) використовується в лабораторній практиці для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) у сироватках людей. Радіальна імунодифузія проводиться у гелі на спеціальних скляних або полістиролових пластинах. Постановка реакції передбачає наявність стандартної сироватки з відомою концентрацією імуноглобулінів (для побудовання калібровочної кривої), а також моноспецифічних антисироваток проти IgM, IgG, IgA (для виявлення Ig у сироватці хворого). Антисироватку отримують шляхом імунізації тварини людськими імуноглобулінами певного класу (M, G чи A). Далі здійснюють очистку тваринної сироватки до такого стану, коли в ній залишаються антитіла тільки одного виду (наприклад, проти людських IgM).

Для постановки реакції завчасно готують гель на основі освітленого 1% агара (або агарози) з додаванням фізіологічного розчину (електроліта) і мертюлята (консерванта). У розплавлений гель при температурі 48°C вносять моноспецифічні антисироватки: в одну пробірку – антисироватку проти IgM, в другу – IgG, в третю – IgA. Кожний варіант геля наносять на окрему спеціальну пластину і підписують її. Після застигання геля в ньому роблять декілька горизонтальних рядів лунок з діаметром 2-3 мм. В них вносять по 20 мкл

передчасно розведених проб досліджуваної сироватки хворого і стандартної сироватки. На одній пластині можна одночасно проаналізувати декілька сироваток хворих на наявність Ig певного класу. Пластини утримують у вологій камері при кімнатній температурі 48 годин. Завдяки дифузії в агар навколо лунок з'являються кільця преципітації з різним діаметром в залежності від розведення сироваток. Іноді для покращення візуалізації зон преципітації гелі профарбовують амідом-чорним. Після відмивки барвника преципітати набувають синього кольору. Вимірюють діаметр кілець зразків стандартної сироватки і для кожного виду Ig будують свою калібровочну криву, відкладаючи на осі абсцис концентрацію імуноглобуліна в пробі, а на осі ординат – квадрат діаметра зони преципітації. Вимірявши діаметри преципітатів досліджуваної сироватки на трьох пластинах, можна визначити концентрацію імуноглобулінів трьох класів у даній сироватці.

Імуноелектрофорез – варіант імунопреципітації в гелі, в якому поєднані електрофорез і метод зустрічної дифузії Оухтерлоні. Цей метод дозволяє визначати склад багатокomпонентних сумішей розчинних антигенів (до 30 компонентів). Спочатку на агаровій пластині здійснюють розділення суміші антигенів в електричному полі. Потім у канавку, вирізану в гелі паралельно напрямку електрофоретичного розділення, наливають преципітуючу сироватку. В результаті уздовж канавки утворюються дугоподібні лінії преципітації. Кількість цих ліній відповідає кількості специфічних пар “антиген – антитіло”.

Імуноблотинг – один з варіантів електрофоретичного розділення антигенів у гелі, який супроводжується переносом фракціонованих антигенних білків з гелевої пластинки на лист нітроцелюлози (блотинг), де в подальшому здійснюють ідентифікацію антигенів за допомогою специфічних сироваток.

Електрофорез антигенних білків проводять у гелі з додаванням додецилсульфата натрію, що дозволяє розділяти сотні компонентів суміші, визначати їх розміри, виявляти подібність антигенів. Блотинг використовують у зв'язку з тим, що не всі антитіла здатні проникати у пори геля. При накладанні нітроцелюлозної мембрани на гель отримують так званий “сендвіч”. Його занурюють у буферний розчин, витримують декілька діб і завдяки градієнтній дифузії антигени з геля переходять у твердофазну пористу нітроцелюлозну мембрану. Таким чином отримують відбиток електрофореграми – блот (блотограму), на якому за допомогою специфічних сироваток ідентифікують певні антигени. Для виявлення комплексів “антиген-антитіло” використовують різні барвники, які здатні зв'язуватись з білками – амідом чорний 10 В, кумасі блакитний R-250, понсо S, швидкий зелений FCF та інші.

Спектр використання РП

- РП застосовують для визначення антигену при діагностиці інфекцій (сибірська виразка, менінгіт, туляремія, віспа та ін.), а також при вивченні антигенної структури деяких груп бактерій.
- У судовій медицині для визначення видової приналежності плям крові, сперми.
- У санітарній експертизі при встановленні фальсифікації продуктів (виявляють домішки молока одного виду тварини у молоці іншого виду,

добавляння штучного меду до натурального, фальсифікацію м'ясних, рибних, борошняних виробів і т. д.)

- У біології РП застосовують для встановлення генетичних зв'язків близьких між собою видів (філогенетичну спорідненість у тварин, рослин, мікроорганізмів).

Реакція нейтралізації

Реакція нейтралізації (РН) заснована на здатності АТ імунної сироватки нейтралізувати дію мікробів та вірусів і їх токсинів на клітини.

Ця група реакцій була введена в практику однією з перших, ще в кінці ХІХ століття, але до цих пір не втратила своєї актуальності. За допомогою реакцій нейтралізації можна виявляти наявність антитіл і оцінювати ефект їх дії, а також ідентифікувати мікроорганізми або фактори їх патогенності.

Особливістю реакцій цієї групи є використання для візуалізації результатів взаємодії антиген-антитіло живих тест-систем. Під цим терміном розуміють цілісний організм дорослої тварини, курячі ембріони, клітини тварин або людини, які підтримуються в культурі. Вибір тест-системи визначається, перш за все, властивостями антигенів, які використовуються в конкретній реакції. При відсутності шкідливої дії на тест-систему говорять про нейтралізуючу дію сироватки.

При відсутності ефекту суміші, яка ушкоджує, антитіл і мікробів чи їхніх токсинів на культуру кліток говорять про специфічність взаємодії комплексу антигенантитіло.

Спектр використання РН

Реакції нейтралізації можуть бути використані для ідентифікації патогенних мікроорганізмів і визначення їх кількості в аналізованих пробах. У цьому випадку необхідна наявність антисироваток або суспензій моноклональних антитіл, специфічних по відношенню до конкретних видів або штамів. Досліджувану рідину змішують з антитілами, витримують необхідний для взаємодії антиген-антитіло час, і вводять в живу тест-систему. В якості контролю використовують введення в таку ж тест-систему суміші нормальної сироватки і аналізованої проби. Порівнюючи стан тест-систем в досліді та контролі, роблять висновок про наявність чи відсутність нейтралізації і, відповідно, про видову або штамповану приналежність патогена.

Для деяких мікроорганізмів, зокрема, хвороботворних вірусів, реакції нейтралізації досі є фактично єдиним методом їх ідентифікації.

За схожим принципом здійснюються і реакції, що дозволяють досліджувати не мікроорганізми, а їх токсини і антитіла (антитоксини), що володіють антитоксичною дією.

До реакцій нейтралізації відносять і такі, в яких досліджують фактори патогенності бактерій, які не є токсинами, а ферментами (лецитиназа, гіалорунідаза, колагенази та ін.) А також специфічні по відношенню до них антитіла. Відмінною рисою цієї групи реакцій нейтралізації є те, що в них не використовуються живі тестсистеми, а для візуалізації результатів взаємодії антиген-антитіло досить перевірки впливу ферменту на його субстрат.

Реакції за участю комплементу або реакція зв'язування комплементу

Ще однією групою методів з покращеною візуалізацією результатів реакції антигенантитіло стали реакції з застосуванням комплементу. Як відомо, активація комплементу класичним шляхом ініціюється комплексами антиген-антитіло. У тих випадках, коли самі комплекси не можуть бути фіксовані візуально, можна оцінити їх наявність побічно, наприклад по загибелі або руйнуванню (лізису) клітин. Якщо в якості клітин-мішеней в таких реакціях використовуються еритроцити, лізис яких легко тестується по виходу гемоглобіну в розчин, говорять про реакції гемолізу. Прикладом реакції, в якій використовуються комплемент і еритроцити, є реакція зв'язування комплементу (скорочено РЗК) (рис. 14).

****Комплемент** – це термолабільний неспецифічний антибактеріальний фактор. Комплекс складних білків, постійно присутніх в крові.*

****Гемоліз** – це руйнування еритроцитів крові з виділенням в навколишнє середовище гемоглобіну. У нормі гемоліз завершує життєвий цикл еритроцитів (120 діб) і відбувається в організмі людини і тварин безперервно.*

Це складна двоетапна серологічна реакція, яка заснована на активації комплементу в результаті приєднання його до комплексу антиген-антитіл.

Реакція включає дві фази. У **I фазі реакції** (специфічній) зв'язування комплементу шуканий АГ (або АТ) реагує з діагностичною антисывороткою (або АГ-діагностикумом) і комплементом. Утворений комплекс АГ-АТ зв'язує комплемент.

****Сироватки імунні діагностичні (діагностичні антисыватки)** – імунні сироватки, які містять антитіла проти одного (моновалентні, моноспецифічні) чи декількох (полівалентні, поліспецифічні) антигенів.*

У **фазі II реакції** (індикаторна) визначають наявність вільного комплементу внесенням в реакційне середовище гемолітичної системи – еритроцитів барана і гемолітичної сироватки, що містить АТ до них. Якщо АГ і АТ не відповідають один одному і не утворюють імунних комплексів, то зв'язування комплементу не відбувається. В цьому випадку вільний комплемент взаємодіє з компонентами гемолітичної системи, фіксуючись на комплексі еритроцит-антиеритроцитарний АТ. Наслідок цього – це гемоліз індикаторних клітин (феномен «лакової крові») – реакцію вважають негативною

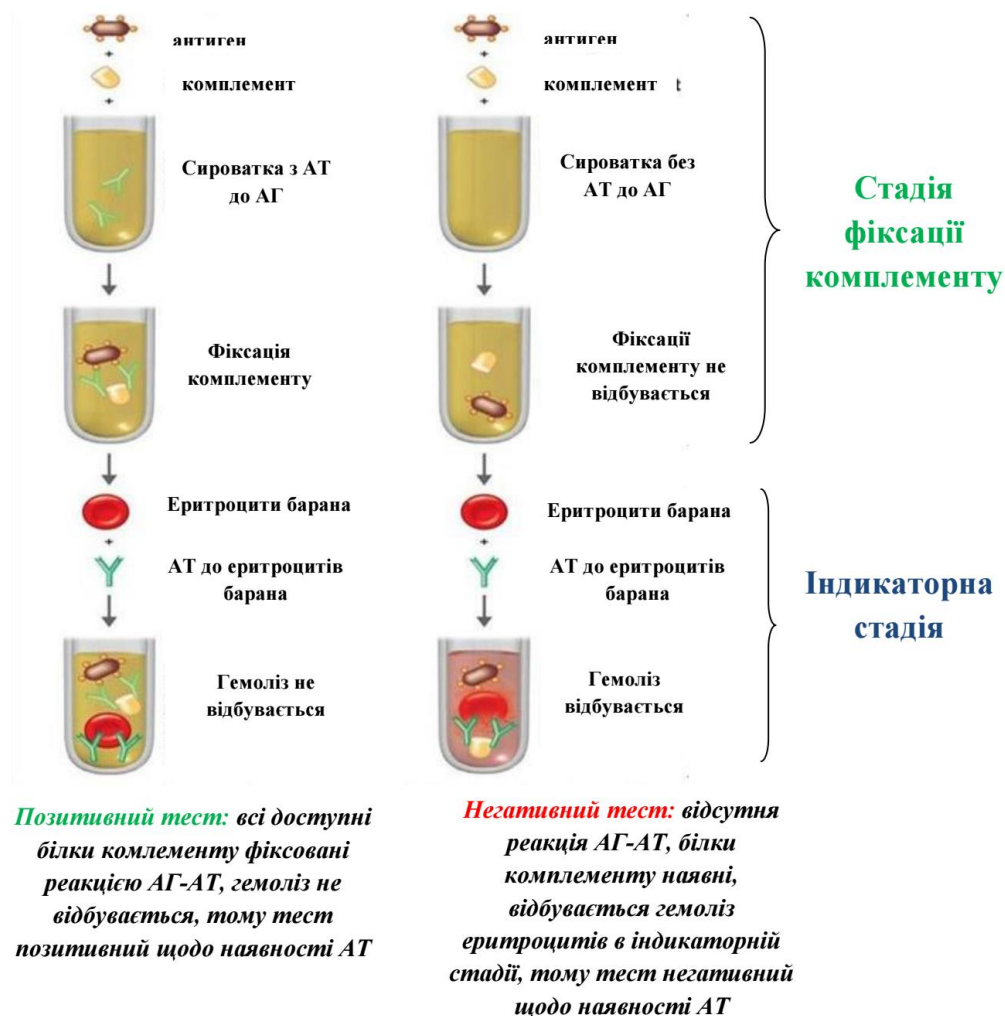


Рис. 14. Реакція зв'язування комплементу

Якщо у фазі I реакції АТ і АГ відповідають один одному, то утворюються імунні комплекси, що пов'язують комплемент, руйнування еритроцитів після внесення гемолітичної системи не спостерігають і реакцію вважають позитивною.

Спектр використання РЗК

Застосовується РЗК для діагностики інфекційних хвороб, зокрема, сифілісу. оскільки антитіла проти збудника цієї хвороби утворюються в організмі хворого в малих кількостях, і виявляти їх методами преципітації або аглютинації не вдавалося.

Практична частина

Тема. Постановка реакції дифузійної преципітації методом подвійної імунодифузії за Оухтерлони

Матеріали: антигени-преципітиногени (X_1 , X_2 , Y_1 , Y_2 , Z_1 , Z_2); преципітуюча антисироватка (X , Y , Z), агар або агароза, 0,01 М фосфатно-сольовий буфер рН 7,2, 1%-ий розчин азиду натрію, водяний насос, предметне скло розміром 2,5-7,5 см, 70%-ий розчин етилового спирту, дистильована вода.

Обладнання: штамп діаметром 4 мм; мікропіпетки; градуйовані та пастерівські піпетки; волога камера; термостат; вата; чашки Петрі.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть постановку реакції дифузійної преципітації методом подвійної імунодифузії за Оухтерлоні.

Принцип методу. Метод подвійної імунодифузії за Оухтерлоні базується на радіальній дифузії антигенів і антитіл з сусідніх лунок у шарі агарового/агарозного гелю. Коли зразки розчинних антигенів і антитіл поміщають у сусідні лунки в агарозному або агаровому гелі, вони дифундують радіально в гель і створюють два протилежні градієнти концентрації. Коли градієнти досягають оптимальної пропорції, відбувається взаємодія відповідних молекули (антигенів і антитіл), і утворюється лінія преципітації. Використовуючи таку методику, можна проаналізувати зв'язок між двома антигенами. Є чіткі патерни ліній преципітації, які утворюються навпроти однієї і тієї ж антисироватки залежно від того, чи епітопи досліджуваних антигенів є повністю ідентичним, частково ідентичними чи неідентичними взагалі. Реакцію Оухтерлоні також можна використовувати для визначення відносної концентрації антигену. Коли антиген має відносно вищу концентрацію, еквівалентна зона буде формується трохи осторонь від лунки з антигеном. Коли антиген має відносно нижчу концентрацію, еквівалентна зона утворюватиметься трохи ближче до лунки з антигеном.

Патерн ліній преципітації, які утворюються, можна інтерпретувати для визначення зв'язку між досліджуваними антигенами та антитілами.

Патерн ідентичності: X. Цей тип патерну виникає, коли антигени у двох лунках є ідентичними та специфічними для антитіла в антисироватці у третій лунці. При однаковій концентрації двох досліджуваних антигенів, їх швидкість дифузії буде однакою, що призведе до утворення плавної лінії преципітації. Отже, досліджувані антигени є імунологічно однорідними або ідентичними (рис. 1).

Патерн часткової ідентичності: Y. Даний тип патерну виникає, коли антигени у двох лунках мають спільні епітопи, які однакові для обох, але кожен з цих двох антигенів також має свої унікальні епітопи. У цьому випадку антисироватка містить поліклональні антитіла, специфічні для кожного епітопу. Коли деякі епітопи одного з антигенів виявляються спільними з іншим антигеном, поліклональні антитіла будуть реагувати по-різному з цими антигенами, і лінія преципітації, утворена для кожного антигену, буде різною.

Вважається, що «шпора» виникає через детермінанти, наявні в одному антигені, але відсутні в іншого антигену (рис. 1). Аналогічний патерн часткової ідентичності спостерігається, якщо антитіла виявляють крос-реактивність з епітопом на одному з антигенів, який схожий, але не ідентичний епітопу, що наявний на іншому антигені.

Патерн не ідентичності: Z. Цей різновид патерну виникає, коли антигени, які містяться у двох лунках абсолютно різні. Вони не мають спільних епітопів і не реагують перехресно. У цьому випадку антисироватка, що містить антитіла, є гетерогенною, оскільки одні антитіла реагують з антигеном, що міститься у першій лунці, а інші – реагують з антигеном наявним у другій лунці. Отже, антигени, що містяться у сусідніх лунках є імунологічно різнорідними (рис. 15).

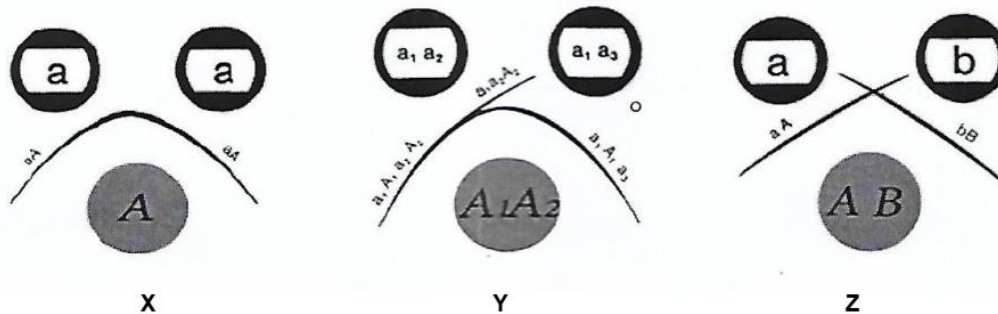


Рис. 15. Варіанти реакції між антигеном і антитілом при використанні методу подвійної імунодифузії за Оухтерлоні: X – патерн ідентичності, Y – патерн часткової ідентичності, Z – патерн не ідентичності

Клінічне значення. Реакція Оухтерлоні широко використовується в імунодіагностиці, дослідженнях специфічності антитіл, визначенні ступеня схожості антигенів та моніторингу імунних відповідей. Метод дозволяє оцінити кількісні та якісні параметри антиген-антитіло взаємодії, що має велике значення у вивченні імунопатологій та розробці біопрепаратів.

Хід роботи

1. Приготування гелю. Підготуйте 1% розчин агарози в 0,01 М фосфатно-сольовому буфері (рН 7,2) з додаванням 0,05% азиду натрію як консерванту. Нагрійте розчин до повного розчинення агарози, потім охолодіть до 55–60 °С.

2. Заливка гелю. Знежирте предметні скельця 70% етанолом, дайте висохнути. Налийте тонкий шар гарячого агарозного розчину на скельця, розміщені горизонтально. Дайте гелю полімеризуватись при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

3. Формування лунок. Розмістіть застигле скло на шаблоні з орієнтирами. За допомогою штампу діаметром 4 мм виріжте лунки на відстані 4 мм одна від одної. Видаліть агарозні пробки акуратно водяним насосом, уникаючи пошкодження країв лунок.

4. Внесення реагентів. До відповідних лунок внесіть по 10 мкл антигенів та антисироваток згідно зі схемою.

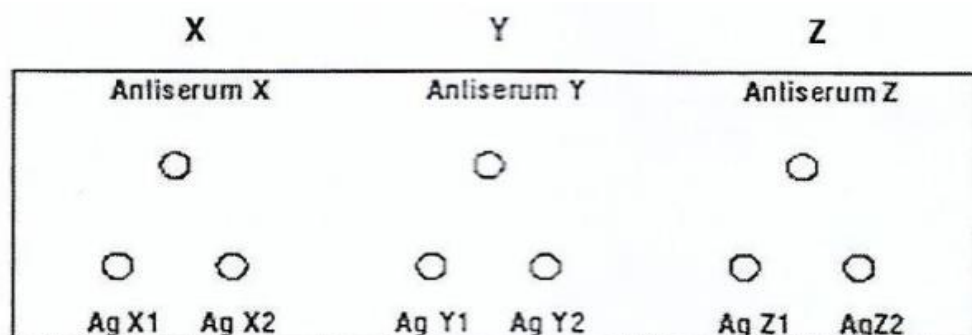


Рис. 16. Взірець додавання антисироватки і антигенів до відповідних лунок

5. Інкубація. Помістіть скельця у вологу камеру (наприклад, чашку Петрі з ватним тампоном, змоченим дистильованою водою). Інкубуйте при температурі 37 °С (або кімнатній температурі) протягом 18–24 годин.

6. Оцінка результату. Після інкубації спостерігайте утворення ліній преципітації при яскравому освітленні. За характером ліній визначте тип взаємодії між антигенами та антитілами (ідентичність, часткова ідентичність або неідентичність).

Завдання 2. Проаналізуйте утворені лінії преципітації. Визначте типи взаємодій (X, Y, Z) між антигенами та антитілами.

Інтерпретація результатів: Коли антиген і антитіло зустрічаються в оптимальних пропорціях, утворюється лінія преципітації. У випадку подвійної імунодифузії за Оухтерлоні можна спостерігати три варіанти реакції між антигеном і антитілом (рис. 3):

✓ *X – патерн ідентичності* – при взаємодії ідентичних антигенів із специфічними антитілами лінії преципітації зливаються, утворюючи дугу;

✓ *Y – патерн часткової ідентичності* – при частковій ідентичності лінії преципітації нагадують дугу із «шпорою», чим більшою є спорідненість антигенів, тим «шпора» менш виражена і розміщується ближче до дуги;

✓ *Z – патерн не ідентичності* – коли обидва антигени неідентичні (відсутність перехресної реакції між антигенами, тобто ці два антигени імунологічно не пов'язані) – лінії преципітації перехрещуються при умові, що антисироватка містить антитіла проти двох антигенів.



Рис. 17. Варіанти реакції між антигеном і антитілом при використанні методу подвійної імунодифузії за Оухтерлоні: X – патерн ідентичності, Y – патерн часткової ідентичності, Z – патерн не ідентичності (джерело: <https://courseware.cutm.ac.in/wp-content/uploads/2020/05/6.-Double-Immunodiffusion-Test.pdf>)

Таблиця 8. Результати подвійної імунодифузії за Оухтерлоні

№ зразка	Антигени в лунках	Антисироватка в центральній лунці	Опис преципітаційної лінії (візуальне спостереження)	Тип взаємодії (X – ідентичність, Y – часткова, Z – неідентичність)	Коментар/інтерпретація
1					
2					
3					

Пояснення до таблиці:

- **Антигени в лунках** — які саме антигени внесені в бічні лунки (наприклад, X1, X2).
- **Антисироватка** — яка антисироватка міститься в центральній лунці (X, Y, Z).
- **Опис преципітаційної лінії** — зафіксуйте, яку форму має лінія (дуга, дуга зі «шпорою», перехрещення).
- **Тип взаємодії** — визначте за зовнішнім виглядом (X, Y або Z).
- **Коментар/інтерпретація** — коротко поясніть, що це означає з точки зору імунології.

Завдання 3. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи була виявлена взаємодія антигенів з антитілами? Проаналізуйте наявність преципітаційних ліній у кожному зразку. Вкажіть, у яких парах антиген–антитіло спостерігалось утворення преципітату. Які це має імунологічні наслідки?

2. Як оцінити якість проведеної імунодифузії? Врахуйте чіткість ліній преципітації, симетричність дифузійних зон, відсутність фонових осадів, точність розташування лунок і рівномірність гелевого покриття. Оцініть, чи були виконані всі етапи методики коректно.

3. Яке біологічне значення має тип взаємодії антигенів з антитілами (X, Y, Z)? Опишіть, як визначення ідентичності, часткової ідентичності або повної відмінності між антигенами допомагає у дослідженні спорідненості епітопів, розробці вакцин, виявленні перехресної реактивності.

4. Які фактори могли вплинути на ефективність реакції Оухтерлоні? Проаналізуйте технічні аспекти: концентрацію реагентів, рівень гелю, об'єм внесеного зразка, швидкість дифузії, умови інкубації, якість антисироваток та антигенів.

5. Сформулюйте висновок щодо застосування методу подвійної імунодифузії в сучасній імунобіотехнології. Оцініть переваги цього методу як візуального інструменту для імунного аналізу. Які перспективи його застосування у клінічній діагностиці, виробництві імунопрепаратів, дослідженнях алергенів або серологічному скринінгу?

Контрольні питання

1. Що таке серологічна реакція і яка її основна діагностична мета?
2. Які основні фази характерні для серологічної реакції, та чим вони відрізняються між собою?
3. Як впливають фізико-хімічні умови (рН, температура, осмотичний тиск, сольовий склад) на ефективність реакції антиген–антитіло?
4. Поясніть поняття афінності та авідності антитіл. Як вони впливають на імунну відповідь?
5. Які типи серологічних реакцій належать до двокomпонентних і трикомпонентних? Наведіть приклади.
6. Чим відрізняється реакція аглютинації від преципітації за природою антигенів і результатом реакції?

7. У чому полягає принцип реакції нейтралізації та які тест-системи використовують для її проведення?
8. Опишіть механізм РЗК та як оцінюють її результат.
9. Назвіть варіанти проведення реакції преципітації в гелі. У чому полягає принцип методу Оухтерлоні?
10. Які галузі медицини, біотехнології та експертизи використовують серологічні методи, і з якою метою?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Серологічні реакції. Реакція аглютинації

Мета: ознайомитися з принципом та механізмом реакції аглютинації, вивчити основні типи аглютинаційних реакцій (пряма, непряма аглютинація, реакція гальмування гемаглютинації тощо), засвоїти методику проведення аглютинаційних тестів та їхнє застосування в лабораторній діагностиці; навчитися визначати групу крові за системою АВ0 за допомогою стандартних сироваток і моноклональних тест-реагентів анти-А та анти-В, а також оцінити переваги та обмеження цього методу.

Теоретичні відомості

1. Принцип та механізм реакції аглютинації.
2. Реакції, що ґрунтуються на феномені аглютинації та їх використання у дослідженнях та діагностиці.
3. Переваги і недоліки використання реакції аглютинації.

Принцип та механізм реакції аглютинації

Аглютинація (лат. agglutinatio – склеювання) – це склеювання в грудки і випадання в осад (з гомогенної суспензії) бактерій, еритроцитів та інших клітинних елементів. При позитивній РА утворюються пластівці (на предметному склі) або осад (в пробірці).

Фази аглютинації

1. Специфічна взаємодія активного центру антитіл з антигеном.
2. Утворення аглютинації.

Реакції, що ґрунтуються на феномені аглютинації

Розрізняють наступні реакції аглютинації:

- реакція аглютинації в пробірках (РА),
- реакція аглютинації на склі,
- реакція гемаглютинації (РГА),
- реакція непрямой (РНГА) або пасивної гемаглютинації (РПГА),
- реакція гальмування гемаглютинації (РГГА).

I. Реакція аглютинації в пробірках (РА). Аглютинація – це склеювання між собою мікробних або інших клітин при взаємодії з імунною сироваткою. Використовують для виявлення антитіл у сироватці крові хворого (рис. 18). Додавання суспензії убитих мікробів до сироватки хворого викликає утворення пластівчастого осаду (позитивна реакція склеювання мікробів антитілами). Практичне значення: діагностика черевного тифу, паратифів А і дала, туляремії, бруцельозу (реакція Райта), висипного тифу (реакція Вейля–Фелікса) В та ін.

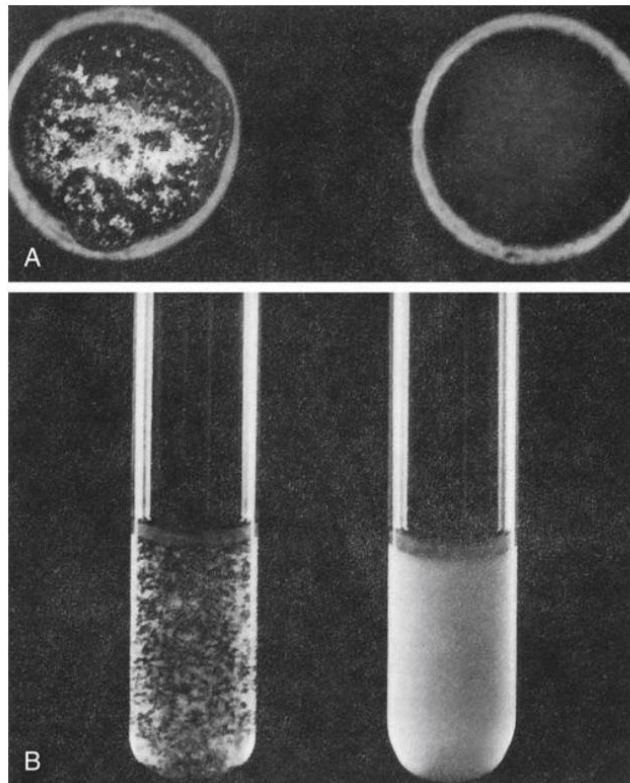


Рис. 18. Реакція аглютинації в пробірках

**Імунні сироватки – це препарати сироватки крові, що отримують шляхом імунізації тварин або людини, і використовуються для створення пасивного антитоксичного, антибактеріального або антивірусного імунітету.*

II. Реакція аглютинації на склі (рис.19). Орієнтовна реакція аглютинації використовується в основному при виділенні збудників черевного тифу, паратифів А і В, дизентерії, харчових токсикоінфекцій та інших кишкових інфекцій. Використовується для швидкого виявлення мікроорганізмів або їх антигенів у досліджуваному матеріалі.

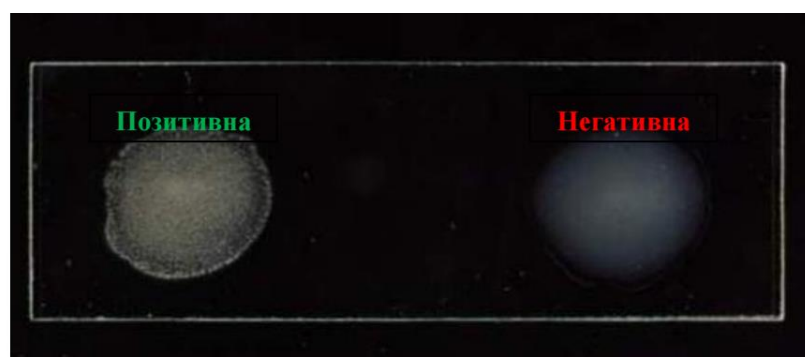


Рис. 19. Приклад реакції аглютинації на склі

III. Реакція гемаглютинації (РГА) – це феномен склеювання еритроцитів. Вона заснована на здатності еритроцитів (морської свинки, курки, собаки, людини з О групою крові) адсорбувати на своїй поверхні антиген (наприклад, вірус грипу) і внаслідок цього аглютинувати. Реакція позитивна, якщо утворюється осад еритроцитів, що вистилає донце пробірки у вигляді

"парасольки", реакція негативна, якщо осад еритроцитів має вигляд "гудзичка" (рис. 20).

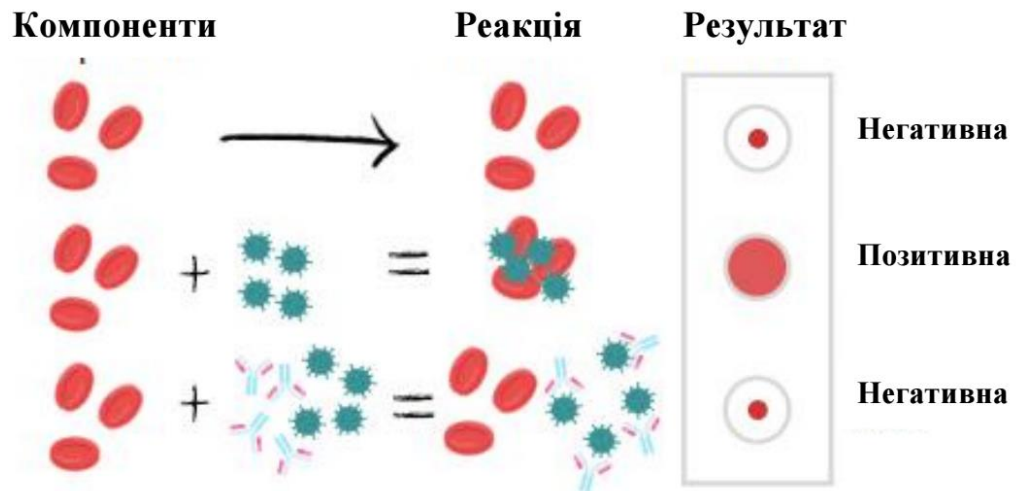


Рис. 20. Реакція гемаглютинації

IV. Реакція непрямой (пасивної) гемаглютинації (РНГА) заснована на тому, що еритроцити, на поверхні яких адсорбують розчинний антиген, набувають здатності аглютинувати при взаємодії з антитілами до адсорбованого антигену (рис. 21). До створення такого еритроцитарного антигену вдаються в тих випадках, коли на поверхні еритроцитів необхідно адсорбувати розчинний некорпускулярний антиген, який неможливо виявити у звичайній реакції аглютинації. Застосовується для діагностики захворювань, викликаних бактеріями (черевний тиф і паратифи, шигельоз, чума, туберкульоз, коклюш, менінгіт, бруцельоз, холера) і вірусами (грип, кліщовий енцефаліт, вірусний гепатит В, геморагічні лихоманки), рикетсіями (висипний тиф).

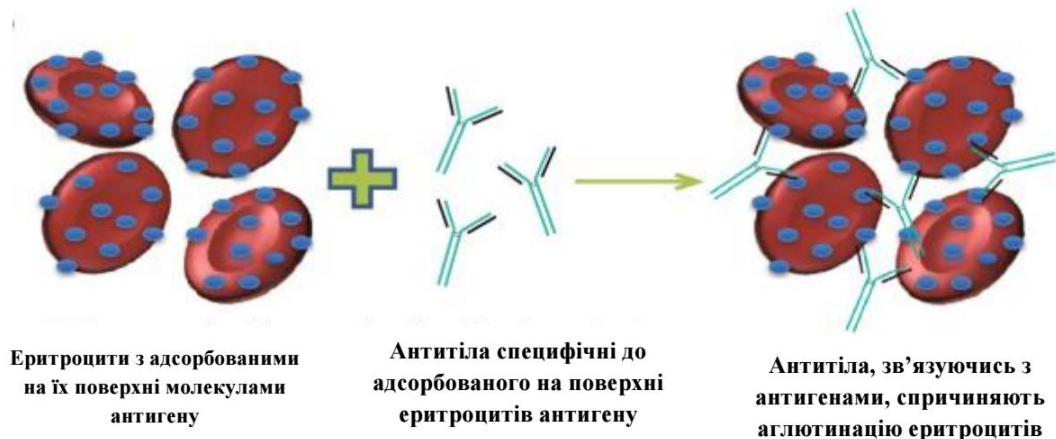


Рис. 21. Реакція непрямой гемаглютинації

V. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА) – це серологічна реакція, у якій специфічні противірусні антитіла, взаємодіючи з вірусом, нейтралізують його і позбавляють здатності аглютинувати еритроцити, тобто гальмують реакцію гемаглютинації (рис. 22). Застосовують при лабораторній діагностиці грипу, натуральної віспи, геморагічних лихоманок, енцефаліту, краснухи, кору, епідемічного паротиту та ін. РГГА використовується для

виявлення та типування вірусів (наприклад, вірусу грипу), антитіл у сироватці хворого.

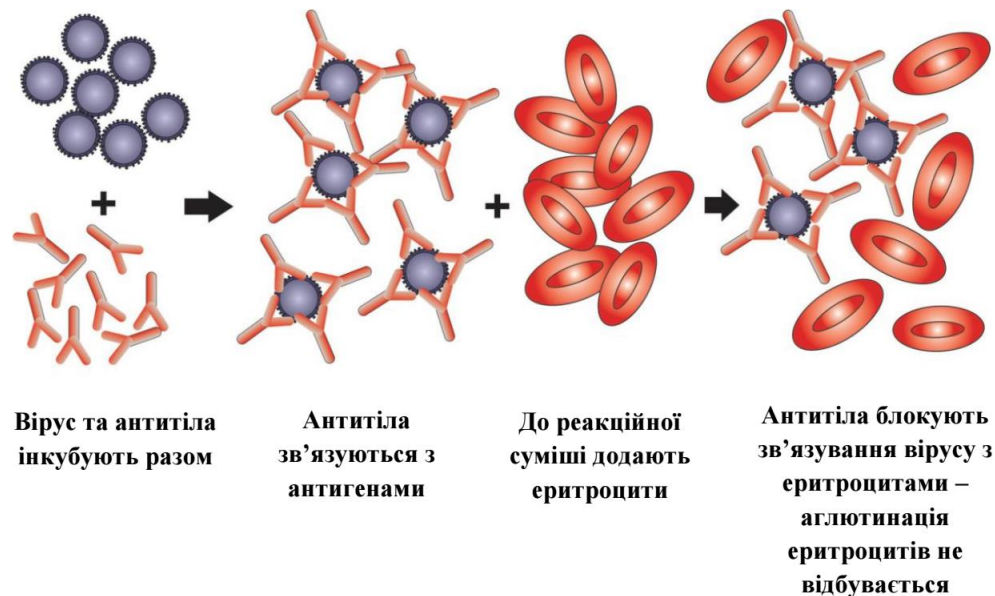


Рис. 22. Реакція гальмування гемаглютинації

Реакція Кумбса (антиглобулінова проба) – це імунологічна реакція для виявлення неповних антитіл до ауто- й ізоантигенів еритроцитів. Застосування: виявлення неповних антитіл, які утворюються при різних патологічних станах – резусконфлікті, аутоімунних захворюваннях (СКВ, поліартрит та інші колагенози), а також при серодіагностиці бруцельозу, аналізі груп крові.

Переваги і недоліки використання реакції аглютинації

Реакція аглютинації є одним із найпоширеніших методів у імунологічній та діагностичній практиці.

Переваги методу

1. *Висока чутливість і специфічність.* Аглютинаційні реакції здатні виявляти малі кількості антигенів або антитіл завдяки високій афінності антитіл.
2. *Швидкість.* Результати реакції аглютинації зазвичай отримують протягом декількох хвилин.
3. *Простота проведення.* Метод не потребує складного обладнання, що робить його зручним для використання в клінічних лабораторіях, польових умовах та експрес-діагностиці.
4. *Можливість якісного та напівкількісного аналізу.* Реакція може використовуватися як для встановлення наявності антигену/антитіла, так і для приблизної оцінки їх концентрації.
5. *Широкий спектр застосування.* Метод використовується для визначення групи крові, діагностики інфекційних захворювань, виявлення бактеріальних антигенів, визначення наявності імуноглобулінів тощо.

Недоліки методу

1. *Можливість неспецифічних реакцій.* За певних умов можуть виникати несправжні аглютинації через неспецифічні взаємодії або фізико-хімічні чинники.

2. *Необхідність стандартизації реагентів.* Для забезпечення точності результатів необхідні якісні та правильно зберігані діагностичні сироватки чи тест-реагенти.

3. *Обмеження чутливості при низькій концентрації антигену/антитіла.* У деяких випадках слабка аглютинація може бути важко інтерпретована або взагалі не виявлена.

4. *Вплив зовнішніх чинників.* На результати можуть впливати температура, рН, іонний склад середовища та час проведення реакції.

5. *Неможливість кількісної оцінки без додаткових методів.* Для точного кількісного визначення необхідно використовувати додаткові методи, такі як ІФА або флуоресцентна мікроскопія.

Практична частина

Тема. Визначення групи крові системи АВ0 за реакцією аглютинації еритроцитів

Матеріали: плазма або сироватка крові; 96% етиловий спирт, стандартні сироватки I, II, III груп крові, цоліклони анти-А і анти-В.

Обладнання: термостат, секундомір, спеціальні тарілки або планшети для визначення груп крові, скляні палички, шпатель, піпетки, хімічні пробірки, скарифікатори, вата.

Завдання

Завдання 1. Визначте групу крові людини за системою АВ0 за допомогою стандартних сироваток.

Принцип методу. Групи крові визначають за допомогою стандартних сироваток, що містять відомі аглютиніни.

Клінічне значення. Група крові встановлюється залежно від наявності аглютинації.

1. Якщо аглютинації немає у всіх трьох краплях сироваток, це свідчить про відсутність аглютиногенів в еритроцитах досліджуваної крові, отже, ця кров належить до 0 (I) групи.

2. Якщо аглютинація відбулася з сироватками I і III груп, то еритроцити містять аглютиноген А, кров належить до А (II) групи.

3. Якщо аглютинація відбулася з сироватками I і II груп, то еритроцити містять аглютиноген В, кров належить до В (II) групи.

4. Якщо аглютинація відбулася з сироватками I, II, III груп, то еритроцити містять як аглютиноген А так і аглютиноген В, кров належить до АВ (IV) групи.

Хід роботи

1. **Підготовка планшету.** Візьміть спеціальну лабораторну тарілку або планшет і чітко промаркуйте місця для внесення стандартних сироваток: анти-А (I), анти-В (II), анти-АВ (III).

2. **Нанесення сироваток.** За допомогою індивідуальних піпеток для кожної сироватки нанесіть по 0,1 мл відповідних стандартних сироваток у відповідні зони планшету.

3. **Отримання крові.** Проведіть обробку шкіри антисептиком, здійсніть прокол пальця стерильним скарифікатором (можна використовувати мочку вуха або венозну кров). Отримайте невелику краплю крові (близько 0,01 мл).

4. **Змішування з сироватками.** За допомогою окремих скляних паличок перенесіть кров у кожну з крапель сироватки. Акуратно перемішайте до рівномірного забарвлення. Залиште на 1–2 хвилини, після чого ще декілька разів перемішайте протягом 5 хвилин.

5. **Оцінка результату.** Оцініть реакції на наявність або відсутність аглютинації:

- **Позитивна реакція (аглютинація):** поява грудочок зі склеєних еритроцитів на знебарвленому тлі.

- **Негативна реакція:** рівномірне червоне забарвлення без ознак аглютинації.

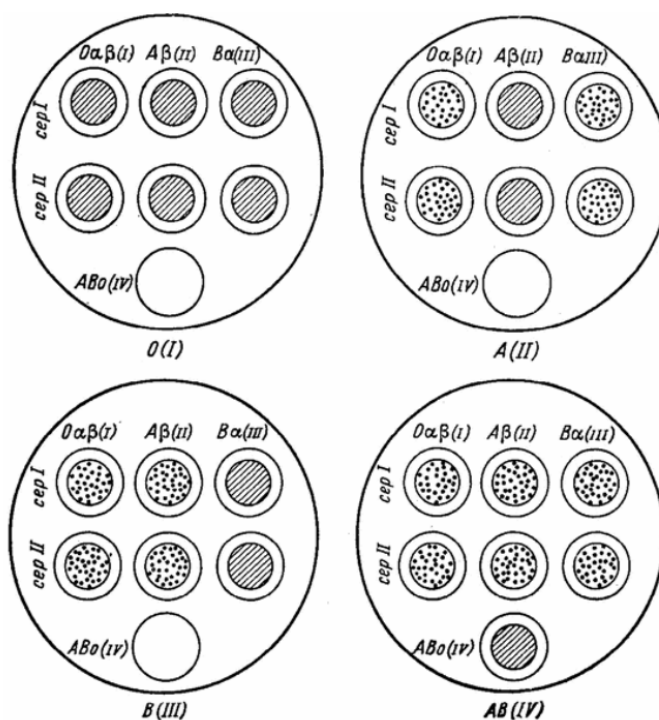


Рис. 23. Результати визначення груп крові за системою АВ0 за допомогою стандартних сироваток

6. **Оформлення результатів.** Оформіть протокол дослідження. У таблиці зазначте результати для кожної сироватки. Визначте групу крові за системою АВ0 на основі наявності/відсутності аглютинації з кожною сироваткою.

Таблиця 9. Результати визначення групи крові за системою АВ0

№ зразка	Анти-А (I)	Анти-В (II)	Анти-АВ (III)	Наявність аглютинації	Висновок (група крові)
	(+ / –)	(+ / –)	(+ / –)		

Позначення:

- (+) — аглютинація наявна,
- (–) — аглютинація відсутня.

Завдання 2. Визначте групу крові за системою АВ0 із застосуванням цоліклонів анти-А і анти-В.

Принцип методу. Цоліклони анти-А і анти-В призначені для визначення групи крові людини за системою АВ0. Визначення групи крові включає виявлення антигенів А і В в еритроцитах. Цоліклони анти-А і анти-В містять специфічні імуноглобуліни класу М, спрямовані проти групоспецифічних антигенів А і В людини.

Клінічне значення. 1. Аглютинації немає (–) ні з реагентом анти-А, ні з реагентом анти-В. Значить досліджувані еритроцити не містять антигенів А і В і кров належить до групи О (І). Це підтверджується наявністю аглютининів у плазмі досліджуваної крові за результатами позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами груп А (ІІ) і В (ІІІ)

2. Аглютинація (+) спостерігається тільки з тест-реагентами анти-А. Отже, досліджувані еритроцити містять тільки антиген А і кров належить до групи А (ІІ). Це підтверджується наявністю аглютининів β у досліджуваній (сироватці) плазмі за результатами позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами групи В (ІІІ).

3. Аглютинація (+) спостерігається тільки з тест-реагентами анти-В. Отже, досліджувані еритроцити містять тільки антиген В і кров належить до групи В (ІІІ). Це підтверджується наявністю аглютининів α в досліджуваній плазмі за результатами позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами групи А (ІІ).

4. Аглютинація (+) спостерігається, як з тест-реагентом анти-А, так і з тест-реагентом анти-В. Отже, досліджувані еритроцити містять обидва антигени (А і В) і кров належить до групи АВ (ІV). Це підтверджується відсутністю аглютининів α і β у досліджуваній плазмі за результатами реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами груп А (ІІ) і В (ІІІ).

У разі позитивної реакції аглютинації еритроцитів з обома тест-реагентами анти-А і анти-В необхідно провести додаткове контрольне дослідження даного зразка крові з фізіологічним розчином хлориду натрію. Для цього потрібно змішати одну краплю ізотонічного розчину з маленькою краплею досліджуваної крові в співвідношенні 10:1. Повторюють дослідження наявності антигенів А і В у цій контрольній краплі. При відсутності аглютинації і в цьому випадку можна бути впевненим, що кров належить до групи АВ (ІV).

Тест-реагенти анти-А забарвлені в рожевий колір, а анти-В – у блакитний.

Хід роботи

1. Підготовка реагентів. На чисту білу порцелянову тарілку або планшет нанесіть по одній краплі тест-реагентів цоліклон анти-А та анти-В під відповідними написами.

2. Додавання крові. Поруч із кожною краплею цоліклону додайте по одній маленькій краплі досліджуваної крові в співвідношенні приблизно 10:1 (реагент : кров).

3. Змішування. За допомогою окремих одноразових паличок (або крайкою чистого предметного скла) ретельно змішайте кров з реагентами до рівномірного забарвлення.

4. Інкубація. Проведіть спостереження за результатами реакції при легкому покойдуванні тарілки або планшета протягом 2,5 хвилин. Звертайте увагу на початок аглютинації, який зазвичай спостерігається вже через 3–5 секунд після змішування.

5. Оцінка результатів.

- При **позитивній реакції** спостерігається аглютинація еритроцитів у вигляді дрібних або великих червоних агрегатів (пластівців).
- При **негативній реакції** крапля залишається рівномірно забарвленою в червоний колір, без видимих згустків.

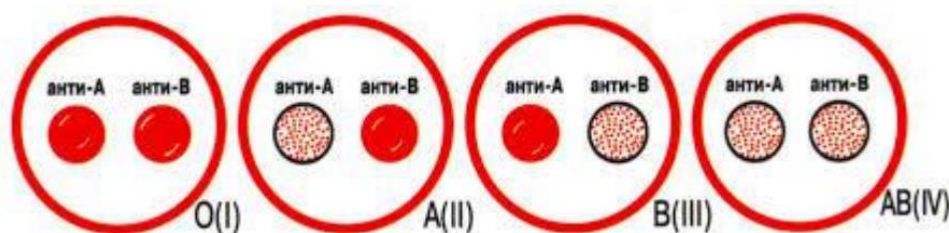


Рис. 24. Результати визначення груп крові за системою АВ0 за допомогою цоліклонів анти-А і анти-В.

6. Реєстрація результатів. Занесіть результати до таблиці, вказавши наявність або відсутність аглютинації в кожному випадку.

7. Визначення групи крові. Зробіть висновок щодо групи крові за системою АВ0 на основі отриманих результатів.

Таблиця 10. Результати визначення груп крові людини за допомогою цоліклонів

№ зразка	Цоліклон анти-А	Цоліклон анти-В	Наявність аглютинації	Визначена група крові
1	(+ / –)	(+ / –)		
2	(+ / –)	(+ / –)		
3	(+ / –)	(+ / –)		
4	(+ / –)	(+ / –)		
...	...	...		

Пояснення:

- У графі "Цоліклон анти-А" та "Цоліклон анти-В" студент зазначає результат реакції: + — аглютинація (позитивна реакція), – — відсутність аглютинації (негативна реакція).
- У графі "Наявність аглютинації" можна коротко описати: "лише з анти-А", "лише з анти-В", "з обома", "немає".
- У графі "Визначена група крові" студент вписує результат: **А (II), В (III), АВ (IV), 0 (I).**

Контрольні питання

1. Поясніть суть феномена аглютинації. Які клітинні структури найчастіше піддаються цій реакції?
2. Опишіть механізм реакції аглютинації. Які етапи вона включає?
3. Чим відрізняється пряма аглютинація від непрямой (пасивної) гемаглютинації? Наведіть приклади застосування.
4. Яке практичне значення має реакція аглютинації в пробірках у лабораторній діагностиці інфекційних захворювань?
5. Що таке РГГА і для чого вона використовується в діагностиці?
6. У яких випадках застосовується реакція Кумбса, та які патології вона дозволяє виявити?
7. Назвіть основні переваги реакції аглютинації як діагностичного методу.
8. Які недоліки можуть обмежувати точність і надійність реакції аглютинації?
9. Які чинники зовнішнього середовища можуть впливати на результати реакції аглютинації?
10. Чому важливо використовувати стандартизовані реагенти у проведенні аглютинаційних тестів?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Імуноферментний аналіз (ІФА)

Мета: ознайомитися з принципами ІФА, його різновидами та можливостями застосування в діагностиці й наукових дослідженнях; навчитися виконувати кількісне визначення загального імуноглобуліну Е (IgE) у біологічних рідинах з використанням ІФА-набору; опанувати навички роботи з мікропланшетним рідером, дотримання типового протоколу, а також обробки та інтерпретації результатів аналізу.

Теоретичні відомості

1. Поняття про ІФА та практичні аспекти його використання.
2. Класифікація ІФА.
3. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА.
4. Основні принципи постановки ІФА.

Поняття про ІФА та практичні аспекти його використання

Імуноферментний аналіз (ІФА, або, точніше, ферментний імуносорбентний аналіз; англ. enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) – це вид імуноаналізу, у якому утворення комплексу антиген-антитіло визначають за активністю мітки-ферменту. Метод широко використовується в науково-дослідній роботі та клінічній лабораторній діагностиці. Вперше ІФА був описаний у 1971 році. Розвиток даного методу визначили два відкриття.

Перше, різні ферменти можна ковалентно приєднувати до антигена або антитіла різними хімічними методами за умови збереження біологічної активності та імунологічної специфічності антигена, антитіл, ферментів.

Друге, більшість антигенів і антитіл мимовільно сорбується на поверхні пластику (полістиролу) і зберігає при цьому здатність до специфічного зв'язування відповідно антитіл та антигена.

Сорбцію антигена або антитіл на поверхні пластику називають **сенсibiliзацією.*

Сорбовані на пластику антиген та антитіло не змиваються буфером, що містить детергент, а не пов'язані антиген та антитіло легко видаляються відмиванням.

Пластик з сорбованими на ньому антитілами або антигеном отримав назву **імуносорбент.*

Досліджуваний зразок і стандартні реагенти інкубують в сенсibiliзованих лунках пластикових планшетів. При інкубації на поверхні лунок формуються імунні комплекси антиген-антитіло. Антиген та антитіло, що не зв'язались, видаляються відмиванням. Ця властивість визначає високу специфічність аналізу.

При утворенні імунних комплексів активний центр ферменту-мітки антигена або антитіла залишається вільним і доступним для субстрату. Інкубація ферменту з хромогенним субстратом супроводжується кольоровою реакцією. Реакцію зупиняють при досягненні стандартом певної оптичної щільності. Ступінь фарбування можна оцінювати візуально або за допомогою фотометрії.

Різноманітність об'єктів дослідження від низькомолекулярних сполук до вірусів і бактерій, а також надзвичайно широке коло завдань, пов'язаних з різноманітними умовами застосування ІФА, обумовлюють розробку надзвичайно великої кількості варіантів цього методу.

Будь-який варіант ІФА включає 3 обов'язкові стадії:

- 1) стадія впізнавання шуканої молекули/сполуки специфічними до неї антитілом, що призводить до утворення імунного комплексу;
- 2) стадія формування зв'язку кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;
- 3) стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

Практичні аспекти використання ІФА

ІФА має широке застосування в різних галузях медицини, біотехнології та науки завдяки своїй чутливості, специфічності та універсальності.

У **медичній діагностиці** ІФА використовується для виявлення вірусних, бактеріальних, паразитарних і грибкових інфекцій, таких як гепатити, ВІЛ, COVID-19, токсоплазмоз, сифіліс, ротавірусні інфекції. Метод також застосовується для діагностики аутоімунних захворювань, алергій, злоякісних новоутворень, а також для кількісного визначення гормонів, цитокінів, ферментів і різних класів імуноглобулінів.

У **ветеринарній практиці** ІФА дозволяє проводити ефективний скринінг тварин на наявність збудників інфекційних захворювань, таких як лейкоз великої рогатої худоби, хламідіоз, бруцельоз та інші патології.

У сфері **біотехнології та фармації** ІФА є важливим інструментом для контролю якості біологічних препаратів, а також для виявлення залишкових кількостей антибіотиків і гормонів у продуктах харчування.

В епідеміології та системі громадського здоров'я метод використовується для моніторингу поширення інфекційних захворювань, а також для оцінки імунної відповіді після вакцинації або природного інфікування.

У наукових дослідженнях ІФА застосовується для вивчення механізмів імунної відповіді, дослідження клітинної сигналізації, а також для аналізу експресії біомаркерів, що дозволяє глибше зрозуміти фізіологічні та патологічні процеси в організмі.

Класифікація ІФА

В основу класифікації методів ІФА покладено кілька підходів.

✓ За типом реагентів, наявних на першій стадії ІФА, розрізняють конкурентний і неконкурентний методи. У конкурентному ІФА на першій стадії в системі знаходяться одночасно аналізована молекула/сполука та його аналог, мічений ферментом, який конкурує за центри специфічного зв'язування з аналізованим антигеном або антитілами. Для неконкурентних методів характерна наявність в системі на першій стадії тільки аналізованої молекули/сполуки і специфічних до неї сорбованих антигенів або антитіл.

✓ Всі методи ІФА поділяються на гомогенні і гетерогенні. Якщо всі три стадії ІФА проходять у розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів відділення імунних комплексів, що утворилися, від компонентів, які не прореагували, метод відноситься до групи гомогенних. Для гетерогенних методів характерно проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язкова стадія відділення (відмивання) імунних комплексів від компонентів, що не прореагували, і які знаходяться в різних фазах (імунні комплекси, що утворилися знаходяться на твердій фазі, а ті, що не прореагували – у розчині). Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії відбувається на твердій фазі, називають твердофазним методами. Зараз у клініко-діагностичних лабораторіях використовують твердофазний ІФА.

Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА

Ферменти. Ферментні мітки володіють надзвичайно потужною каталітичною дією: одна молекула ферменту може реагувати з великою кількістю молекул субстрату. Таким чином, фермент, наявний в незначних кількостях, можна виявити і кількісно визначити за утворенням продуктів, в реакції яку він каталізує. Інша перевага застосування ферментів як міток обумовлена наявністю в молекулі численних функціональних груп (сульфгідрильних, карбоксильних, залишків тирозин та інших), через які можна ковалентне приєднати його молекули до антигенів або антитіл.

Ферментні маркери, які використовуються в ІФА, повинні мати наступні властивості:

- ✓ наявність економічно доступних джерел отримання ферменту;
- ✓ висока активність і стабільність ферменту в умовах аналізу в кон'югаті з антитілами або антигеном;
- ✓ наявність економічно доступних субстратів і простота методу визначення продуктів або субстратів ферментативної реакції;
- ✓ можливість адаптації систем фермент-субстрат до подальшого посилення;

✓ відсутність ферменту і його інгібіторів в досліджуваній біологічній рідині. Вищеназваним вимогами найбільш відповідають пероксидаза хрому (ПХ) та лужна фосфатаза (ЛФ). Обидва ферменти стабільні і каталізують високочутливі реакції. Крім того, продукти, одержувані в результаті реакцій, що каталізуються цими ферментами, в залежності від використовуваного субстрату, можуть виявлятися не тільки колориметричними методами, але також флюоресцентними.

Субстрати. Поряд з ферментативною активністю кон'югату, великий вплив на чутливість аналізу має тип субстрату. Продукт ферментативного перетворення субстрату повинен володіти новим фізико-хімічними параметром, що дозволяє детектувати його з високою чутливістю. Такими параметрами є: поглинання світла у видимій області (хромофорні субстрати), флюоресценція у видимій області (флюоресцентні субстрати) і хемілюмінесценція (хемілюмінесцентні субстрати).

Хромофорні субстрати. Як хромофорні субстрати можуть бути використані індивідуальні речовини і суміші речовин, що вступають у послідовні реакції один з одним і утворюють, в кінцевому результаті, забарвлений продукт. Використання таких субстратів дає можливість проводити як інструментальний, так і візуальний облік результатів аналізу.

Флюоресцентні субстрати. До флюоресцентних субстратів відносяться речовини, які стають флюорохромами після ферментативного перетворення. Всі флюоресцентні субстрати забезпечують більш високу чутливість аналізу порівняно з хромофорними і, незважаючи на неможливість візуального обліку результатів аналізу, вони набувають в останні роки все більшого поширення.

Хемілюмінесцентні субстрати. Хемілюмінесцентними субстратами, які найбільш широко застосовуються в ІФА, є люмінол та ізолуінол. На стадії вимірювання ферментативної активності вони окислюються перекисом водню за наявності кон'югатів з пероксидазою. Випромінювання світла в результаті люмінолпероксидазної реакції може бути посилене в кілька сотень разів завдяки використанню підсилювачів хемілюмінесценції, якими є 6-гідроксибензотіазол, п-іодфенол, пфенілфенол, 1-бром-2-нафтол та ін. Цей підхід забезпечує значне посилення хемілюмінесценції і відповідне підвищення чутливості аналізу.

Основні вимоги до субстрату:

✓ забезпечення високої чутливості методу при виявленні ферменту в кон'югаті;

✓ субстрат повинен бути безпечним, дешевим, доступним і зручним для застосування.

Для ПХ використовують 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (англ. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) та 3,3'-діамінобензидин (англ. 3,3'-diaminobenzidine, DAB).

Для ЛФ – Р-нітрофенілфосфат та 5-бром-4-хлоро-3-індоліл фосфат. Хромогенні субстрати під дією ферментів утворюється фарбований продукт, інтенсивність фарбування розчину прямо пропорційна активності ферменту.

Одним з найбільш важливих компонентів в ІФА є антитіла. Чутливість ІФА залежить від концентрації, активності та специфічності використовуваних антитіл. Використовувані антитіла можуть бути полі – або моноклональними,

різного класу (IgG або IgM) та підкласу (IgG1, IgG2), антиалотипічними або антиідіотипічними. При низькій афінності антитіл розпад комплексу антиген-антитіло призводить до видалення зв'язаного антигену з системи. Чутливість і специфічність методу підвищується при використанні моноклональних антитіл. У цьому випадку з'являється можливість виявляти низькі концентрації антигену у випробовуваних зразках.

Кон'югат. Надійний кон'югат повинен володіти наступними властивостями:

- ✓ високим антитільним титром і високою афінністю до антигену, щоб його можна було використовувати у великому розведенні, і таким чином, зменшити неспецифічне зв'язування;
- ✓ достатньою специфічністю в робочому розведенні;
- ✓ переважанням мономерних форм над полімерними, тому що полімерні форми мають тенденцію до неспецифічної адгезії на пластику, що призводить до високого фоновому рівня реакції;
- ✓ оптимальним молярним співвідношенням між ферментом і антитілами (оптимальне співвідношення становить близько 1:1);
- ✓ достатньою ферментативною активністю. Ця властивість визначається головним чином умовами кон'югації і співвідношенням молекул ферменту і антитіл у кон'югаті.

Тверда фаза. Як тверду фазу для проведення ІФА можна використовувати різні матеріали: полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен тощо. Твердою фазою можуть служити стінки пробірки, 96-лункові та інші планшети, кульки, а також нітроцелюлозні та інші мембрани, що активно сорбують білки.

Формування імуносорбенту. Імунохімічні методи ґрунтуються на використанні попередньо адсорбованих «пасткових» (англ. capture) антитіл для імобілізації антигену або антитіл. Антиген, імобілізований імунохімічно, в 10 разів активніший, ніж пасивно адсорбований антиген. Можуть використовуватися лектини або імуноглобулін – зв'язуючи білки бактерій, які легко адсорбуються на пластику або інших гідрофобних поверхнях, наприклад конканавалін А (Кон А) або стафілококовий білок А. Кон А здатний імобілізувати gp 120 – білок вірусу ВІЛ.

Вільні сайти на поверхні твердої фази, не пов'язані з агентом, можуть фіксувати в ході тесту інші молекули, у тому числі і кон'югати, що призводить до підвищення фоновому сигналу. Для запобігання неспецифічного зв'язування після імобілізації на тверду фазу основного матеріалу проводять обробку нейтральними речовинами. Найбільш популярні блокуючі агенти – бичачий сироватковий альбумін (БСА), казеїн і ін. Вибір блокуючого агента і умови проведення цього етапу залежать від типу твердої фази, чутливості системи.

Вимірювання ферментативної активності. Останнім компонентом специфічного комплексу на твердій фазі є кон'югат. Його ферментативна активність, а, отже, і концентрація, буде пропорційна концентрації решти компонентів комплексу, один з яких підлягає визначенню. Визначення проводять з урахуванням кінетичних особливостей ферменту-мітки. На величину ферментативної активності впливає рН, температура (температурний оптимум лужної фосфатази 37°C, для пероксидази – 15°C), концентрація

субстрату та конформаційні зміни ферменту. Інтенсивність перемішування розчину навколо твердої фази, як на цій стадії, так і на інших розглянутих стадія ІФА, відіграє дуже важливу роль.

Інтерпретація результатів ІФА. Залежність величини ферментативної активності специфічного комплексу з ферментної міткою від кількості будь-якого компоненту комплексу відображається у вигляді кривої «доза-відповідь», де на осі ординат відкладена інтенсивність сигналу субстрату після його ферментативного перетворення, виміряна в момент часу t , а по осі абсцис – концентрація реагенту, що визначається в пробі. Під чутливістю аналізу розуміється та мінімальна концентрація реагенту, що визначається, при якій помітна відмінність сигналу для цієї концентрації та нульового стандарту, тобто зразка, що свідомо не містить визначуваного реагенту. Ця різниця у величинах сигналів повинна становити 2-3 величини стандартного відхилення.

Основні принципи постановка ІФА

Широке розповсюдження отримали різні варіанти твердофазного імуноферментного аналізу (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Твердофазний ІФА був запропонований у 1971 році.

Основні принципи твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, полягають в наступному.

1. На 1 етапі адсорбують антиген або антитіла на твердій фазі. При цьому не зв'язані з твердою фазою реагенти легко видаляються відмиванням.

2. У сенсibilізованих лунках інкубують досліджуваний зразок. У лунках з позитивним контролем – стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

3. При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з імобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії із субстратом. Інкубація субстрату в лунках з імобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, ступінь фарбування можна оцінити візуально або по оптичній щільності.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу – процедура відмивання від незв'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі та трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу – вошер або вручну за допомогою багатоканальної піпетки.

Для проведення ІФА необхідні:

- ✓ полістироловий планшет або інші варіанти твердої фази, що використовуються;
- ✓ відмиваючий розчин;
- ✓ кон'югат (мічені ферментної міткою антигени або антитіла);
- ✓ суміш використовуваних субстратів;
- ✓ розчин, що зупиняє реакцію (стоп-реагент – розчин для зупинення реакції);

- ✓ зразки, що використовуються для позитивного та/або негативного контролю;
- ✓ стандартний антиген (для побудови калібрувальної кривої);
- ✓ одно - і багатоканальні піпетки;
- ✓ вошер (промивач);
- ✓ оптичний прилад для визначення оптичної щільності досліджуваного розчину (ІФА-зчитувач, який послідовно фотометрирує всі лунки);
- ✓ 5-100 мкл досліджуваного біологічного матеріалу.

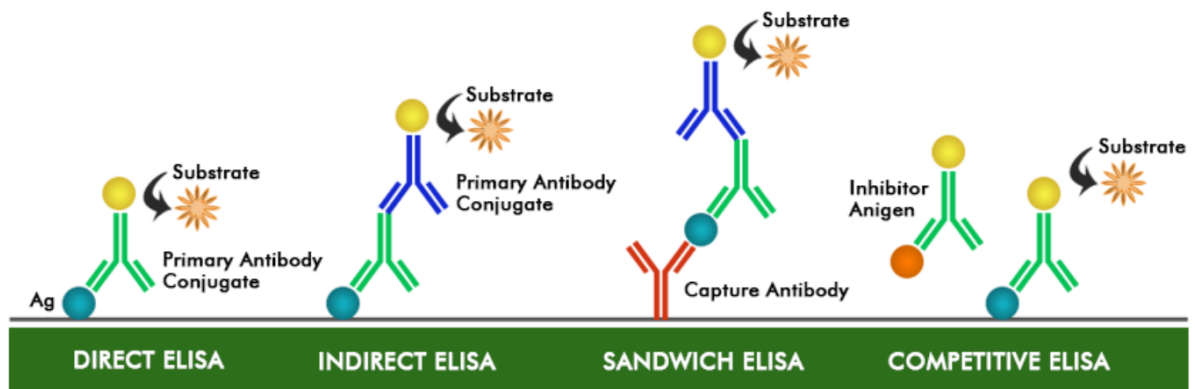


Рис. 25. Загальна схема різних типів ІФА

*Примітки: Ag - антиген, Substrate - субстрат, Primary Antibody Conjugate – первинні антитіла кон'юговані з міткою, Capture Antibody – «пасткові антитіла», Inhibitor Antigen – інгібіторний антиген, Direct ELISA – прямий ІФА, Indirect ELISA – непрямий ІФА, Sandwich ELISA – ІФА типу «сэндвич», Competitive ELISA – конкурентний ІФА (джерело URL: <https://www.geeksforgeeks.org/what-is-elisa-introduction-procedure-types-applications/>)

Прямий ІФА

i. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла. Вище зазначалося, що антигени істотно розрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїдів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, імобілізований на твердій фазі, це клітини та інші корпускулярні антигени. Як контролі використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься шуканий антиген, і негативним контрольним зразком, що свідомо не містить досліджуваного антигену. При наявності очищеного стандартного антигену реакцію проводять у кількох розведеннях, так щоб можна було побудувати калібрувальну криву

ii. Блокують вільні місця зв'язування, що залишилися на твердій фазі, за допомогою бичачого сироваткового альбуміну (БСА), казеїну та ін. (для запобігання неспецифічній сорбції кон'югату на твердій фазі).

iii. В лунки вносять антигенспецифічні мічені поліклональні антитіла (кон'югат), інкубують. Зв'язування кон'югату з твердою фазою буде відбуватися лише у випадку комплементарності обох компонентів системи. Після інкубації з кон'югатом лунки відмивають, видаляючи, таким чином, частину кон'югату, яка не зв'язалась.

iv. Потім в лунки вносять субстрат, специфічний для використовуваного ферменту, і інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем, ферментативну реакцію зупиняють.

v. Облік реакції. Спочатку результати реакції вираховують візуально. Для більш точного обліку результатів інтенсивність фарбування оцінюють на ІФА-зчитувачі з відповідним світлофільтром.

Непрямий ІФА для визначення антитіл. Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл різних класів

Цей варіант ІФА використовують звичайно для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують із зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.). Специфічні антитіла, зв'язавшись з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату. Залежно від мети аналізу використовують різні антиглобулінові реагенти, що виявляють антитіла всіх ізотипів, або специфічні до окремих класів і підкласів імуноглобулінів. Основна перевага методу полягає в універсальності кон'югату. Один і той же кон'югат може служити для виявлення антитіл людини до найрізноманітніших антигенів у будь-яких зразках. Реакція методично проста.

Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл. Схема постановки непрямого ІФА залежить від класу антитіл, які визначають. Схема виконання ІФА при визначенні антиген-специфічних IgG.

i. Імуносорбент готовий, містить антиген відомого збудника

ii. В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують, проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять проби з позитивним і негативним контролем.

iii. Додають анти-IgG кон'югат в робочому розведенні, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.

iv. Вносять субстрат, інкубують. По досягненні оптимального рівня забарвлення в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють, додаючи стопрозчин.

v. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-зчитувачі. За оптимальних умов проведення аналізу метод високоспецифічний і чутливий. Він дозволяє виявляти нанограмові кількості антитіл у сироватках досліджуваних хворих. Для отримання задовільних результатів необхідна стандартизація реагентів і методичних прийомів.

Цей варіант ІФА може також використовуватися для тестування моноклональних антитіл.

Визначення антиген-специфічних IgM та IgA. Для визначення цього класу імуноглобулінів використовується схема ІФА з фіксованими анти-антитілами або «пастками для антитіл». Метод засновано на тому, що на твердофазному носії фіксуються моноклональні антитіла миші, що реагують специфічно з людськими антитілами певного класу, тобто вторинні антитіла до Fc μ – IgM, Fc α – IgA, Fc γ – IgG. У результаті інкубації тестованої сироватки антитіла відповідного класу зв'язуються з імуносорбентом. Наявність серед них антитіл, специфічних для будь-якого антигену (наприклад, трепонеми), виявляється в ході інкубації з цим антигеном, міченим ферментом. При інкубації

з субстратом в тому випадку, коли в досліджуваному зразку були присутні специфічні антитіла, розвивається фарбування розчину. За допомогою цієї ж схеми можна визначати інші класи антитіл при умові, що «пастки» будуть представлені, наприклад, моноклональними анти-IgA-антитілами при визначенні IgA.

Схеми ІФА для виявлення антигенів. «Сендвич» – варіант ІФА для виявлення антигенів. Основні етапи аналізу

Розрізняють одно- та двохстадійний «сендвич» ІФА.

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати як мінімум два епітопи, здатних зв'язувати антитіла, або мати просторово розділені епітопи з однаковою специфічністю. При проведенні цього варіанту ІФА моноклональні антитіла, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуванним зразком і кон'югатом моноклональних антитіл з пероксидазою хрому. Після процедури відмивання в лунки вносять зразок, інкубують, відмивають і додають кон'югат моноклональних антитіл з пероксидазою, інкубують, відмивають і вносять субстрат. Реакцію зупиняють до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції. Так як паратоми моноклональних антитіл зв'язують різні епітопи у антигену, то конкуренція виключається. Інтенсивність фарбування пропорційна кількості антигену.

Основною перевагою методу є висока чутливість, що перевершує можливості інших схем ІФА. Ця схема ІФА використовується при визначенні вмісту гормонів – фолікулостимулюючий, лютеїнізуючий та гормон, пролактин, хоріонічний гонадотропін, тиреоглобулін, маркері пухлин – загальний простат-специфічний антиген; вільний простат-специфічний антиген, а також альфа-фетопротеїн та IgE.

Ця схема ІФА також використовується для визначення тиреотропного гормону та антигену лямблій у екстракті фекалій.

Конкурентний ІФА

Конкурентний ІФА відрізняється від неконкурентного, як правило, більшою специфічністю за рахунок того, що в якості конкурента в реакцію вводять реагент, що пройшов спеціальний строгий відбір на специфічність.

Основні етапи аналізу для виявлення антигену.

i. На твердій фазі іммобілізують специфічні для виявлення антигену моноклональні антитіла.

ii. В лунки панелей вносять у відомій концентрації антиген, мічений ферментом, і досліджуваний зразок. Проводять інкубацію і відмивання. Паралельно в сусідніх лунках ставлять позитивний і негативний контролі. Для побудови калібрувальної кривої використовують стандартний немічений антиген в різних розведеннях.

iii. Додають субстрат, інкубують, зупиняють реакцію при розвитку оптимального забарвлення в лунках з позитивним контролем.

iv. Облік реакції на ІФА-зчитувачі. У цьому випадку кількість антигену в досліджуваному зразку обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі.

За такою схемою ІФА визначають: вільний тироксин, загальний тироксин, вільний трийодтиронін, загальний трийодтиронін, кортизон, оксипрогестерон, естрадіол, дегідроепіандростерон сульфат, мікроальбумін.

Один з варіантів конкурентного ІФА для визначення антитіл до ВІЛ випускається фірмою Wellcome. Як конкуруючий реагент використовують поліклональні анти-ВІЛ антитіла, кон'юговані з ферментом. На тверду фазу сорбують антигени ВІЛ. Випробувані проби змішують з конкуруючим реагентом і суміш вносять у лунки з антигеном. Після відмивання видаляються незв'язані антитіла до не ВІЛ та частина незв'язаних мічених анти-ВІЛ антитіл конкуруючого реагенту. Після додавання субстрату сильне забарвлення розвивається тільки в лунках, у які внесли сироватки, що не містять анти-ВІЛ антитіл.

Якщо у випробуваної пробі була деяка кількість анти-ВІЛ антитіл, то розвинеться слабке або нульове забарвлення. Результат бажано реєструвати кількісно за допомогою вертикального спектрофотометра. При визначенні антитіл цей варіант аналізу заснований на конкуренції мічених (кон'югат) і немічених (досліджуваних) антитіл за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі.

Кількість ферменту, який приєднався до твердої фази, зменшиться пропорційно вмісту в суміші вільних антитіл. Конкурентний метод вимагає мінімального числа операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований. При проведенні конкурентного ІФА для виявлення антитіл краще використовувати мічені моноклональні антитіла, тоді конкуренція кон'югату з досліджуваним зразком відбувається за єдиний епітоп адсорбованого на твердій фазі антигену.

Цей варіант ІФА застосовується для визначення різних сполук, таких як імуноглобуліни людини, раковомембрональний антиген, інсулін, а також гормони небілкової природи. Він дозволяє виявляти антитіла до діагностично значимих епітопів інфекційних агентів.

В Україні виготовлення тест-систем для ІФА здійснює підприємство "ДіапрофМед" (URL: <https://www.diaproph.com/>).

Практична частина

Тема. Кількісне визначення концентрації загального IgE в біологічних рідинах за допомогою ІФА

Матеріали: мікропіпетки (100–1000 мкл), наконечники, мікроплашетний рідер (450 нм)

Обладнання: набір Vitrotest® Total-IgE (реагенти в наборі: мікроплашет, стандарти, контрольні зразки, кон'югат, ТМВ-субстрат, стоп-реагент, буфер для промивання), дистильована вода, сироватка крові пацієнта.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть кількісне визначення концентрації загального IgE в сироватці крові за допомогою набору Vitrotest® Total-IgE (<https://vitrotest.ua/en/products/elisa/allergy/vitrotest-total-ige-3/>) або аналогічного набору.

Принцип методу. Vitrotest® Total-IgE – це «сендвіч»-ІФА, в якому специфічні антитіла до IgE іммобілізовані на твердій фазі (лунках мікропланшета). Досліджуваний зразок сироватки додається до лунок, і IgE зразка зв'язується з антитілами. Після промивання додається друге антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому (ПХ або англ. horseradish peroxidase, HRP). Після додавання субстрату ТМВ розвивається кольорова реакція. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації IgE.

Хід роботи

1. Підготовка реагентів. Усі реагенти довести до кімнатної температури (18–25°C). Розвести концентрований буфер для промивання відповідно до інструкції.

2. Внесення зразків. Додати по 100 мкл кожного стандарту, контролю та досліджуваних зразків до відповідних лунок мікропланшета (всі зразки – у подвійному повторі). Інкубувати 30 хвилин при 37°C.

3. Промивання. Промити лунки 5 разів промивним буфером (300 мкл на лунку), ретельно видаляючи залишки рідини після кожного промивання.

4. Додавання кон'югату. Додати по 100 мкл кон'югату HRP до всіх лунок. Інкубувати 30 хвилин при 37°C.

5. Промивання. Повторити промивання, як описано вище.

6. Додавання субстрату. Додати по 100 мкл ТМВ-субстрату до кожної лунки. Інкубувати в темряві при кімнатній температурі 15 хв.

7. Зупинка реакції. Додати по 50 мкл стоп-реагенту (сірчаної кислоти H₂SO₄). Забарвлення змінюється з синього на жовтий.

Завдання 2. За допомогою мікропланшетного рідера проведіть вимірювання оптичної щільності (англ. optical density, OD) зразків (стандартів, контролів та біологічних проб пацієнтів) при довжині хвилі 450 нм у двох повторях для кожного зразка.

Завдання 3. Розрахуйте середні значення OD для кожного стандарту, контрольного зразка та зразків пацієнтів. Внесіть результати у таблицю.

Таблиця 10. Результати вимірювання оптичної щільності (OD₄₅₀)

Лунка	Зразок	OD ₁	OD ₂	Середнє OD	Концентрація (МО/мл)
A1/A2	Стандарт 1 (0 МО/мл)				
B1/B2	Стандарт 2 (25 МО/мл)				
C1/C2	Стандарт 3 (50 МО/мл)				
D1/D2	Стандарт 4 (100 МО/мл)				
E1/E2	Стандарт 5 (200 МО/мл)				
F1/F2	Стандарт 6 (400 МО/мл)				
G1/G2	Контроль позитивний				
H1/H2	Контроль негативний				
...	Зразок пацієнта 1				
...	Зразок пацієнта 2				

Завдання 4. Побудуйте калібрувальну криву за даними стандартів (X-вісь – концентрація, МО/мл; Y-вісь – середнє OD). Визначте тип залежності (лінійна, логарифмічна, сигмоїдна) відповідно до інструкції набору. Підпишіть:

"Калібрувальна крива для визначення концентрації загального IgE методом ІФА".

Завдання 5. Використовуючи калібрувальну криву або формулу з набору, розрахуйте концентрацію загального IgE (МО/мл) у зразках пацієнтів.

Завдання 6. Порівняйте результати пацієнтів з референтними значеннями (< 100 МО/мл – нормальний рівень IgE; 100 МО/мл – підвищений рівень, що може вказувати на алергічний процес) і зробіть висновок щодо можливих змін імунного статусу або патологічного процесу.

Завдання 7. Проаналізуйте точність виконаного тесту за значеннями позитивного і негативного контролю. Поясніть, які чинники могли вплинути на результати (температура, інкубація, точність дозування тощо).

Контрольні питання

1. Поясніть основний принцип ІФА.
2. Які основні етапи включає будь-який варіант ІФА та яка функціональна роль кожного з них?
3. Чим відрізняються прямий, непрямий, сендвич і конкурентний ІФА за механізмом виконання та застосуванням? Наведіть приклади для кожного типу.
4. Які ферменти найчастіше використовуються як мітки у ІФА? Поясніть, чому саме ці ферменти є найбільш поширеними.
5. Які типи субстратів використовуються в ІФА? Чим відрізняються хромогенні, флуоресцентні та хемілюмінесцентні субстрати між собою?
6. Які переваги надає використання моноклональних антитіл в ІФА порівняно з поліклональними? У яких випадках це особливо важливо?
7. Опишіть призначення та принцип дії блокуючих агентів у постановці ІФА. Які речовини використовують для блокування?
8. Як правильно інтерпретуються результати ІФА? Що таке калібрувальна крива і як вона використовується для кількісного аналізу?
9. Які галузі медицини, науки та промисловості найбільш активно використовують ІФА? Наведіть конкретні приклади його застосування.
10. Які фактори можуть вплинути на чутливість, специфічність та достовірність результатів ІФА? Як їх можна контролювати?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Методи ELISpot і FluoroSpot

Мета: ознайомитися з імунологічними методами *ELISpot* і *FluoroSpot*, їх принципами, діагностичним та дослідницьким застосуванням; дослідити імунну відповідь на віруси герпесу типу 1 і 2 (*HSV1* і *HSV2*) за допомогою методу *ELISpot* та навчитися аналізувати якісні й кількісні результати активації клітин імунної системи.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика методів *ELISpot* і *FluoroSpot*.
2. Типові протоколи для проведення аналізу методами *ELISpot* і *FluoroSpot*.
3. Застосування методів *ELISpot* і *FluoroSpot*.

Загальна характеристика методів ELISpot і FluoroSpot

ELISpot (англ. enzyme-linked immunosorbent spot) – це тип тесту, що дозволяє кількісно визначити частоту секреції цитокінів окремими клітинами. ELISpot також належить до методів імунофарбування, оскільки є технікою, що використовує антитіла для виявлення певного білкового аналіту, де термін **аналіт** означає будь-яку біологічну або хімічну речовину, яку ідентифікують або вимірюють.

FluoroSpot-аналіз є варіацією методу ELISpot. У цьому методі для виявлення використовують флуоресценцію, що дозволяє одночасно аналізувати кілька аналітів, тобто визначати секрецію більш ніж одного типу білків.

Сесіл Черкінскі (Cecil Czerkinsky) вперше описав метод ELISpot у 1983 році як новий спосіб кількісного визначення продукції специфічного до антигену імуноглобуліну гібридомними клітинами. У 1988 році Черкінскі розробив варіант аналізу ELISpot, який дозволяв визначати секрецію лімфокіну Т-лімфоцитами. У тому ж році вперше було поєднано двоколірний ELISpot із комп'ютерною обробкою зображень, що дало змогу кількісно оцінювати та аналізувати осередки (плями, англ. spots). У 1988 році також вперше використали планшети із мембранним дном для проведення цих тестів.

Типові протоколи для проведення аналізу методами ELISpot і FluoroSpot

Проведення аналізу методом ELISpot

1. Покриття лунок антитілами. Метод ELISpot передбачає поетапне внесення та видалення реагентів у лунки планшета, які зазвичай розміщені на багатолунковій ПЛР-панелі (від 16 до 100 лунок). На першому етапі до лунок вносять моноклональні антитіла, специфічні до певного цитокіну. Ці антитіла адсорбуються на стінках лунок, формуючи тверду фазу для наступного зв'язування з цільовим білком. Моноклональні антитіла мають високу специфічність, оскільки продукуються однією лінією В-лімфоцитів і розпізнають лише один епітоп антигену. На відміну від них, поліклональні антитіла здатні розпізнавати декілька епітопів того самого антигену.

2. Інкубація клітин. Далі до лунок додаються клітини, які є об'єктом дослідження. У частині лунок може бути присутній специфічний стимул для індукції секреції цитокінів. Протягом інкубації (зазвичай 18–24 год) клітини секретують цитокіни, які фіксуються на поверхні лунок за рахунок зв'язування з іммобілізованими антитілами. Для забезпечення життєздатності клітин під час дослідження необхідно дотримуватись стандартів біологічної безпеки та оптимальних умов культивування: підтримання температури 37°C, контроль вологості, уникнення механічного стресу, а також попередня обробка зразків крові (розведення PBS, усунення гранулоцитів, відпочинок після розморожування для кріоконсервованих зразків тощо).

3. Захоплення цитокінів. Секретовані клітинами цитокіни зв'язуються зі специфічними моноклональними антитілами, іммобілізованими на стінках лунок, за рахунок специфічної взаємодії з епітопом.

4. Детекція за допомогою антитіл. Після інкубації планшет промивається для видалення клітин та інших нерелевантних компонентів. У лунках

залишаються лише комплекси антитіло–антиген. Наступним етапом є внесення біотинільованих антитіл, специфічних до того ж цитокіну, які зв'язуються з іншим епітопом цитокіну, утворюючи "сендвич"-структуру.

5. Внесення стрептавідин-ензимного кон'югату. Далі додається кон'югат стрептавідину з ферментом (наприклад, пероксидазою хрому – HRP або лужною фосфатазою – ALP), який специфічно зв'язується з біотином на детекторних антитілах. Це забезпечує високу чутливість і стабільність сигналу.

6. Додавання субстрату. На завершальному етапі до лунок додається субстрат, який каталізується відповідним ферментом. Це призводить до утворення локалізованого нерозчинного осаду у вигляді дискретних плям (англ. spots) на дні лунок. Тип субстрату залежить від використаного ферменту:

- для ALP використовують BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-індолілфосфат/нітросиній тетразолій),
- для HRP — ТМВ (тетраметилбензидин).

Інтенсивність плям корелює з кількістю клітин, що секретують досліджуваний цитокін.

7. Аналіз результатів. Отримані плями аналізують вручну за допомогою стереомікроскопа або зчитують автоматично за допомогою ELISpot-рідера. На основі кількості плям розраховують частоту клітин, які продукують певний цитокін, що дозволяє кількісно оцінити імунну відповідь на рівні окремих клітин.

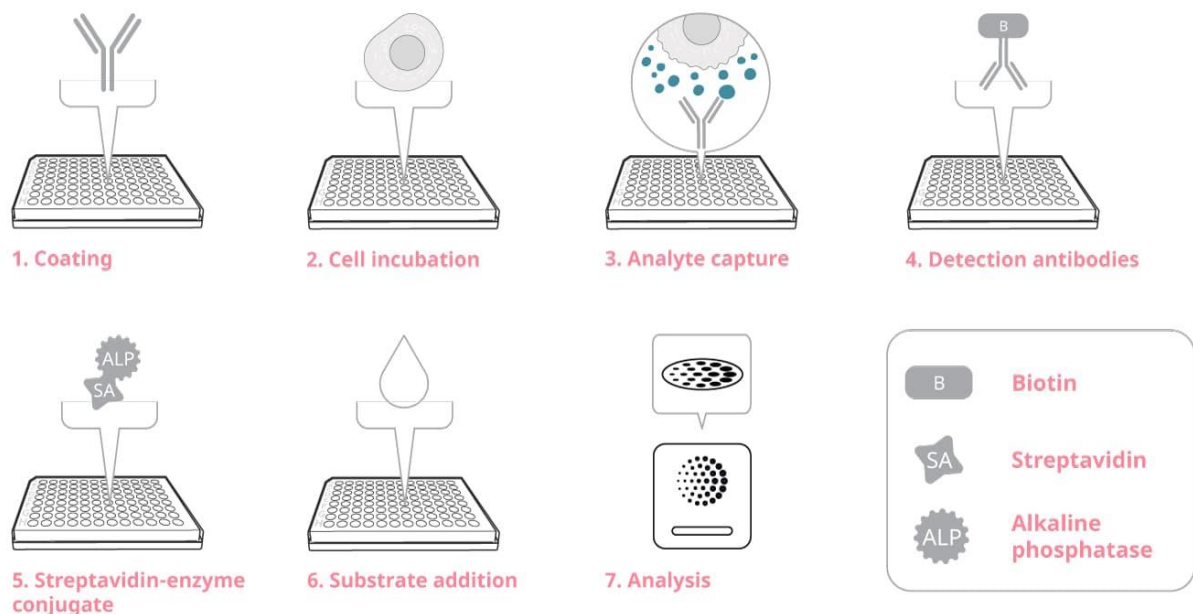


Рис. 26. Схема проведення ELISpot-аналізу (джерело: <https://www.mabtech.com/knowledge-hub/our-fluorospot-products>)

Проведення аналізу методом методом FluoroSpot

FluoroSpot є варіацією методу ELISpot і за своєю методологією має багато спільного з ним. Основна відмінність полягає у тому, що FluoroSpot дозволяє одночасно виявляти кілька аналітів (наприклад, різні типи цитокінів) у межах однієї планшетки, тоді як класичний ELISpot аналізує лише один аналіт за раз. Це досягається шляхом використання флуоресцентної мітки замість

ензиматичної реакції, що дозволяє розділити сигнали різних аналізованих речовин за допомогою спектральних фільтрів.

1. Покриття лунок антитілами. Як і в ELISpot, на першому етапі у лунки планшета вносять моноклональні антитіла, специфічні до відповідних цитокінів. Для уникнення контамінації та викривлення результатів, планшети перед використанням обробляють етанолом. У методі FluoroSpot застосовують суміш антитіл, специфічних до кількох аналітів, які іммобілізують в одній лунці. Методика обробки етанолом залежить від типу планшета. Наприклад, для планшетів MSIP або IPFL додають по 15 мкл 35% етанолу на кожну лунку, витримують 1 хв і видаляють. Для планшетів MAIPSWU додають по 50 мкл 70% етанолу, витримують 2 хв. Після цього лунки промивають стерильною водою по 200 мкл п'ять разів. Лише після такої підготовки додають цитокін-специфічні моноклональні антитіла для захоплення аналітів.

2. Інкубація клітин. Клітини, що досліджуються, додають у лунки планшета та інкубують у присутності або відсутності специфічного стимулу, який здатен викликати секрецію відповідних білків. Клітини, активовані стимулом, починають виділяти аналіти (наприклад, цитокіни).

3. Захоплення аналітів. Секретовані білки зв'язуються з відповідними захоплюючими антитілами, іммобілізованими на дні лунок.

4. Детекторні антитіла. Після промивання планшета з метою видалення клітин та нецільових компонентів, вносять біотинільовані детекторні антитіла, специфічні до одного з аналітів. Для аналізу кількох аналітів додаються детекторні антитіла з мітками (тегами, англ. tag), кожен з яких відповідає окремому типу аналіту.

5. Кон'югати з флуорофорами. На відміну від ELISpot, де для візуалізації використовують ензиматичну реакцію, у FluoroSpot застосовують флуорофор-марковані антитіла проти тегів, а також стрептавідин-флуорофорні кон'югати. Для підсилення флуоресцентного сигналу додається буфер-підсилювач. Саме завдяки цим флуоресцентним міткам можлива одночасна детекція кількох аналітів в одному зразку.

6. Аналіз результатів. Після завершення інкубації проводять зчитування флуоресцентного сигналу за допомогою автоматичного зчитувача FluoroSpot, обладнаного відповідними фільтрами для кожного типу флуорофору. Вибір фільтрів здійснюється згідно зі спектральними характеристиками використовуваних флуоресцентних барвників, що забезпечує точну і селективну реєстрацію сигналу.

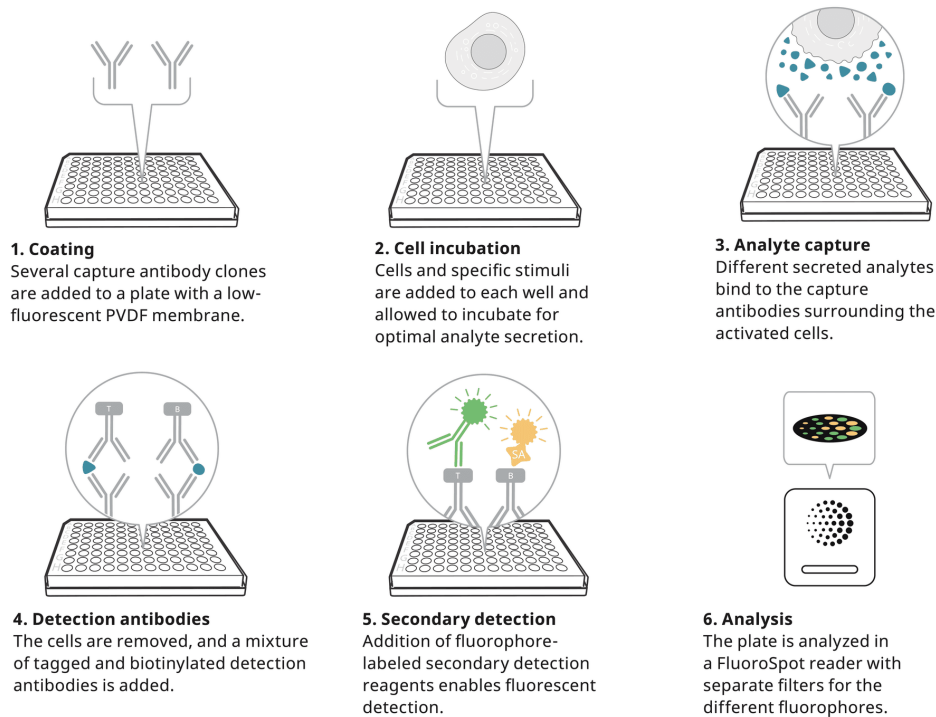


Рис. 27. Схема проведення FluoroSpot-аналізу (джерело: <https://www.mabtech.com/knowledge-hub/our-fluorospot-products>)

Феномен "capture effects". Через можливість одночасного виявлення кількох аналітів у одній лунці, існує ризик впливу одного аналіту на секрецію іншого – так званий ефект захоплення (англ. capture effect). Такий вплив може бути як позитивним, так і негативним: секреція другого аналіту може зростати або знижуватися. Для компенсації цього ефекту може бути використана ко-стимуляція – додавання другого антитіла, що посилює продукцію того ж аналіту.

Застосування методів ELISpot та FluoroSpot

Методи ELISpot і FluoroSpot знайшли широке застосування в різних напрямках біомедичних досліджень, зокрема у розробці вакцин, онкології, алергології, ветеринарній медицині, імунології, дослідженні моноцитів, макрофагів і дендритних клітин, а також при аналізі аполіпропротеїнів. Метод ELISpot дозволяє досліджувати антиген-специфічні цитокінові відповіді, виявляти клітини, що секретують специфічні антитіла, імунну відповідь на пухлинні антигени, секрецію гранзиму В та перфोरину Т-лімфоцитами, ефективність вакцин, здійснювати картування епітопів, оцінювати цитотоксичну активність Т-клітин, визначати рівень IL-4, IL-5, IL-13, антитіло-індуковану відповідь після вакцинації та виявляти В-клітини пам'яті, специфічні до певного антигену.

Зокрема, T-cell ELISpot використовується для характеристики субпопуляцій Т-лімфоцитів, оскільки дозволяє детектувати продукцію цитокінів IFN- γ , IL-2, TNF- α (характерні для Th1-клітин), а також IL-4, IL-5 і IL-13 (характерні для Th2-клітин). Вимірювання Т-клітинної відповіді на рівні секреції цитокінів є ключовим для оцінювання ефективності вакцинації.

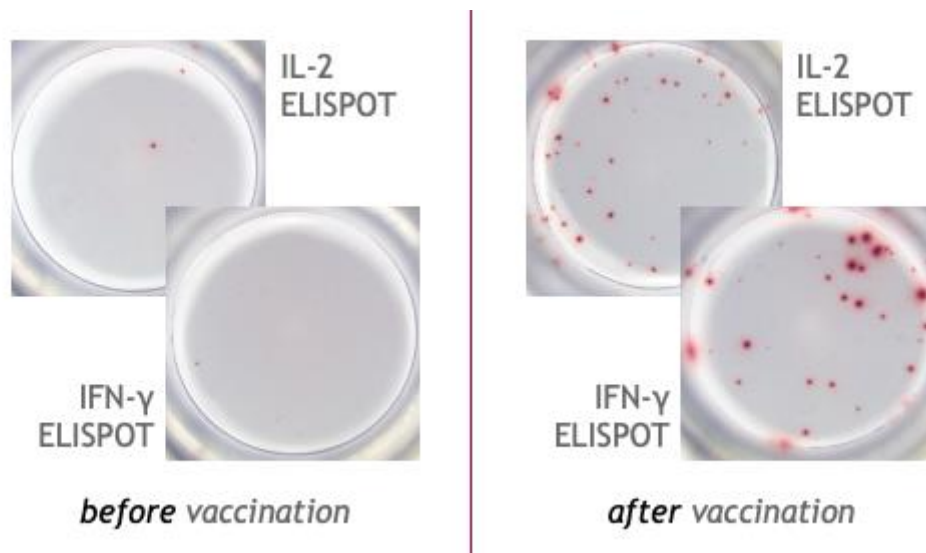


Рис. 28. Приклад аналізу Т-клітин людини за методом ELISpot (джерело: <https://www.ucytech.com/t-cell-elispot-assay>)

На зображенні представлено специфічні плями IFN- γ та IL-2, що утворюються Т-клітинами з мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) людини. Донор отримав бустерну дозу мРНК-вакцини проти COVID-19 шляхом внутрішньом'язового введення. До та після вакцинації PBMC стимулювали пулом пептидів SARS-CoV-2 і інкубували протягом 24 годин у лунках планшету ELISPOT

T-cell FluoroSpot дозволяє досліджувати пухлино-інфільтруючі лімфоцити (англ. tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), а також аналізувати секрецію IFN- γ і гранзиму В, що є важливими маркерами цитотоксичної активності Т-клітин. Ці параметри мають значне значення для онкологічних досліджень.

FluoroSpot-аналіз В-клітин застосовується для оцінювання ефективності вакцинації шляхом кількісного визначення секреції імуноглобулінів класів IgG, IgA та IgM до і після введення вакцини. Метод флуоресцентної детекції, що лежить в основі FluoroSpot, дозволяє паралельно аналізувати секрецію кількох типів імуноглобулінів в одному зразку.

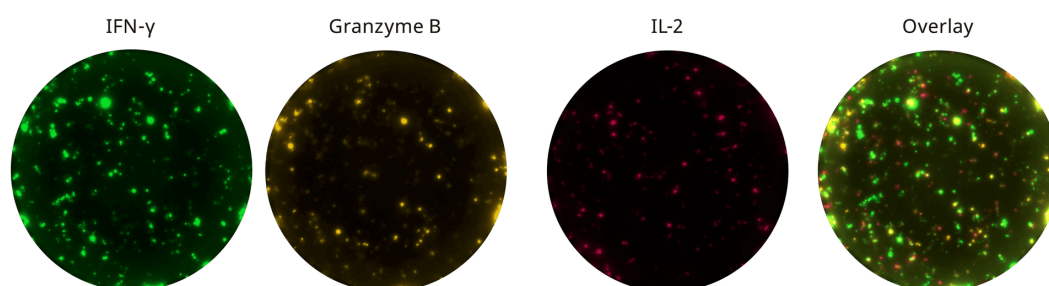


Рис. 29. FluoroSpot-аналіз: представлено три окремі зображення з однієї лунки, отримані з використанням різних флуоресцентних фільтрів, а також композитне зображення, що відображає накладення сигналів із усіх трьох каналів (джерело: <https://www.mabtech.com/knowledge-hub/our-fluorospot-products>)

Завдяки високій чутливості та мультиплексному підходу, ELISpot і FluoroSpot є універсальними інструментами для фундаментальних і прикладних досліджень в імунології, біотехнології, інфектології та інших галузях біомедицини.

Таблиця 12. Порівняльна таблиця основних характеристик методів ELISpot і FluoroSpot

Параметр	ELISpot	FluoroSpot
Принцип виявлення	Імуноферментна реакція з утворенням нерозчинного осаду (візуальні плями)	Флуоресцентна детекція з використанням мічених антитіл та специфічних фільтрів
Кількість аналізованих аналітів	Один аналіт на лунку	Два і більше аналітів одночасно в одній лунці
Тип мічення	Фермент (найчастіше пероксидаза хрому (HRP) або лужна фосфатаза (ALP))	Флуорофори (наприклад, Alexa Fluor, Cy3, FITC)
Необхідність додавання субстрату	Так (наприклад, TMB, AEC, BCIP/NBT)	Ні (використовується флуоресцентне зчитування)
Кількість етапів	Базові: покриття, інкубація, виявлення, субстрат, аналіз	Аналогічно, але з додатковими флуоресцентними міченнями та етапом підсилення флуоресценції
Аналіз результатів	Візуалізація плям за допомогою ELISpot-рідера або мікроскопа	Зчитування флуоресценції за допомогою автоматизованого FluoroSpot-рідера з мультиспектральними фільтрами
Чутливість методу	Висока	Дуже висока
Можливість мультиплексування	Немає	Є (виявлення декількох білків у тій самій клітині)
Застосування	Аналіз секреції цитокінів, виявлення пам'яті В/Т-клітин, оцінка ефективності вакцин	Одночасний аналіз кількох цитокінів, дослідження імунного профілю клітин, онкологічні/вірусні дослідження

Практична частина

Тема. Виявлення імунної відповіді на віруси герпесу типу 1 і 2 (HSV1 і HSV2) за допомогою методу ELISpot

Матеріали: комерційний набір для ELISpot-аналізу на HSV-1/HSV-2; мононуклеарні клітини периферичної крові людини (англ. PBMC); HSV-1/HSV-2 специфічні пептидні антигени; середовище для клітинної культури (наприклад, RPMI-1640 з 10% FBS); PBS (фосфатно-сольовий буфер); пластини ELISpot із PVDF-мембраною; стрептавідин-кон'югований фермент (наприклад, ALP або HRP); хромогенний субстрат (BCIP/NBT або AEC); фіксуєчий розчин.

Обладнання: ламінарна шафа для асептичної роботи, CO₂-інкубатор (37°C, 5% CO₂), центрифуга, мікропіпетки та наконечники, вода для ін'єкцій або деіонізована, витратні матеріали: пробірки, планшети, стерильні серветки; стереомікроскоп або ELISpot рідер для підрахунку спотів.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть виявлення імунної відповіді на віруси герпесу типу 1 і 2 (HSV-1 і HSV-2) за допомогою комерційного набору для ELISpot-аналізу HSV-1/2 peptide pool або аналогічного набору.

Принцип методу. ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) дозволяє кількісно оцінити клітини, що секретують певний цитокін (наприклад, IFN- γ) у відповідь на специфічний антиген. Після інкубації PBMC із HSV-1/HSV-2 антигенами, клітини, що виділяють IFN- γ , формують плями (споти) на мембрані планшета. Кожен спот відповідає одній клітині, що продукує цитокін у відповідь на стимуляцію.

Клінічне значення. Метод ELISpot є високочутливою платформою для визначення специфічної клітинної імунної відповіді на віруси герпесу. Застосовується в діагностиці, контролі імунного статусу, імуномоніторингу після вакцинації або у пацієнтів із вірусними рецидивами. Особливо корисний для оцінки активності CD4⁺ або CD8⁺ Т-клітин.

Хід роботи

1. Підготовка клітин. Виділити PBMC із зразку периферичної крові за допомогою градієнтної центрифугації (наприклад, Ficoll-Paque). Відмити клітини в PBS та суспендувати в RPMI-1640 з 10% FBS.

2. Підготовка планшета. Попередньо активувати PVDF-мембрану 70% етанолом. Промити планшет PBS і додати фіксовану кількість антитіл для захоплення IFN- γ . Інкубувати при 4°C протягом ночі або 2 год при кімнатній температурі.

3. Стимуляція клітин. Додати PBMC до лунок планшета (наприклад, 2×10⁵ клітин/лунка). Додати HSV-1 або HSV-2 пептидні антигени відповідно до інструкції набору. Інкубувати 18–24 год при 37°C, 5% CO₂.

4. Виявлення. Видалити клітини та промити планшет PBS. Додати біотинмічені антитіла проти IFN- γ , потім стрептавідин-кон'югат. Додати хромогенний субстрат до розвитку плям. Зупинити реакцію та промити планшет дистильованою водою.

Завдання 2. Оцінка результатів ELISpot-аналізу на визначення імунної відповіді до HSV-1 та HSV-2.

Хід роботи

1. Візуалізація результатів. Після завершення інкубації з субстратом та промивання планшета спостерігайте на дні лунок характерні темні плями (споти), кожен з яких відповідає окремій імунокомпетентній клітині, яка секретує IFN- γ у відповідь на HSV-антиген.

✓ **Колір плям:** зазвичай темно-фіолетовий (для BCIP/NBT) або червоно-коричневий (для AEC).

✓ **Форма плям:** має бути чіткою, круглою, діаметром до 1 мм.

✓ **Фон:** низький, без дифузного забарвлення.

2. Підрахунок спотів. Використовуйте ELISpot-reader або оптичний стереомікроскоп. Порахуйте кількість спотів в кожній лунці (середнє з двох або трьох повторів). Обов'язково порівняйте з негативним контролем (без антигену) — фонові споти повинні бути ≤10% від експерименту.

Таблиця 13. Результати ELISpot-аналізу на HSV-1 та HSV-2

№ зразка	Антиген	Кількість спотів (лунка 1)	Кількість спотів (лунка 2)	Кількість спотів (лунка 3)	Середнє значення спотів	Кількість спотів у контрольній лунці	Індекс стимуляції (Середнє / Контроль)	Висновок
1	HSV-1							
1	HSV-2							
2	HSV-1							
2	HSV-2							

Пояснення до таблиці:

- ✓ **№ зразка** – умовне позначення досліджуваного зразка.
- ✓ **Антиген** – HSV-1 або HSV-2.
- ✓ **Кількість спотів (лунка 1-3)** – запишіть кількість виявлених спотів у кожній повторній лунці.
- ✓ **Середнє значення спотів** – середнє арифметичне з трьох лунок.
- ✓ **Кількість спотів у контрольній лунці** – лунка без антигену (фонова активність).
- ✓ Індекс стимуляції = середнє значення тестових лунок / контрольна.

Висновок:

- ✓ Якщо індекс стимуляції $\geq 2 \rightarrow$ позитивна специфічна відповідь
- ✓ Якщо індекс $< 2 \rightarrow$ відсутність специфічної відповіді

3. Оцінка специфічної імунної відповіді. Високий рівень спотів у лунках із HSV-1/HSV-2 антигеном свідчить про наявність сенсibilізованих Т-клітин, які активуються при повторному контакті з вірусним антигеном.

Критерій позитивного результату: якщо кількість спотів у тестовій лунці як мінімум у 2 рази перевищує кількість у негативному контролі.

4. Побудова графіка. Побудуйте стовпчасту діаграму: вісь Х – варіанти проб (контроль, HSV-1, HSV-2), вісь Y – середня кількість спотів. Оцініть порівняльну імунну відповідь на HSV-1 і HSV-2.

5. Формулювання висновків. Який тип відповіді був сильнішим – на HSV-1 чи HSV-2? Чи можна за результатами зробити припущення про перенесене або хронічне інфікування? Яке клінічне значення може мати дане дослідження для пацієнтів?

Контрольні питання

1. У чому полягає принцип дії методу ELISpot і які молекули він дозволяє виявляти?
2. Чим відрізняються методи ELISpot і FluoroSpot з точки зору детекції аналітів і кількості досліджуваних речовин у зразку?
3. Опишіть основні етапи проведення ELISpot-аналізу та поясніть роль кожного з них у формуванні результату.
4. Які особливості підготовки планшетів до проведення FluoroSpot-аналізу залежно від їх типу, і чому ця підготовка є важливою?

5. Як забезпечується специфічність виявлення цитокінів у методі ELISpot, і яку роль відіграють моноклональні антитіла?
6. У чому полягає феномен “capture effect” у FluoroSpot-аналізі та як можна мінімізувати його вплив на результати?
7. Яким чином аналіз результатів ELISpot і FluoroSpot забезпечує кількісну оцінку імунної відповіді на рівні окремих клітин?
8. Наведіть приклади практичного застосування ELISpot і FluoroSpot в сучасних біомедичних дослідженнях.
9. Які типи клітин та які цитокіни можуть бути об'єктами аналізу за допомогою T-cell ELISpot і T-cell FluoroSpot?
10. Чому метод FluoroSpot є особливо цінним у дослідженнях, пов'язаних із вакцинацією, імунною пам'яттю та онкологією?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Імунохроматографічний аналіз (ІХА)

Мета: ознайомитися з принципами імунохроматографічного аналізу (ІХА), його різновидами, перевагами та обмеженнями, вивчити особливості підготовки зразків, проведення експрес-аналізу та інтерпретації результатів; засвоїти методику виконання імунохроматографічного тесту на виявлення антигену вірусу SARS-CoV-2, оцінити специфічність та наочність результатів, а також розглянути перспективи використання ІХА в біомедичній діагностиці.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика ІХА.
2. Різновиди ІХА.
3. Підготовка зразків та проведення ІХА.
4. Інтерпретація результатів.
5. Застосування ІХА.
6. Переваги. Недоліки і перспективи ІХА.

Загальна характеристика ІХА

Імунохроматографічний аналіз (ІХА) — це потужна аналітична методика, що поєднує простоту, високу швидкість отримання результату та достатньо високу чутливість. Він широко використовується для швидкої, якісної та напівкількісної діагностики різноманітних захворювань, а також для виявлення забруднювачів у харчових продуктах, зразках навколишнього середовища, біологічних рідинах людини та тварин. Аналіз здійснюється за допомогою спеціалізованих пристроїв — тест-смужок, касет або панелей, що не потребують складного лабораторного обладнання для проведення дослідження.

Такі тести також відомі під назвами "тести бічного потоку" (англ. lateral flow test (LFT), lateral flow device (LFD), lateral flow immunochromatographic assay або просто rapid test). Вони представляють собою прості у використанні одноразові пристрої, призначені для виявлення цільової речовини (**аналіту**) в рідкому зразку без потреби в складній підготовці чи обслуговуванні.

ІХА базується на принципах тонкошарової хроматографії в поєднанні з високоспецифічною імунохімічною реакцією між антигеном та специфічним антитілом, іммобілізованим на мембрані тест-смужки. Коли зразок наноситься

на тест-смужку, він починає рухатись завдяки капілярним силам по волокнистій матриці. Якщо в зразку присутній аналіт, він вступає у специфічну реакцію з міченими антитілами або з імунними компонентами, закріпленими на тестовій ділянці, внаслідок чого утворюється видима забарвлена або флуоресцентна смуга.

Різновиди ІХА

Прямий (сендвич) метод

У прямому (або сендвич) варіанті ІХА використовується мічений кон'югат антитіло-мітка, зазвичай попередньо нанесений у відповідну зону тест-смужки (рис. 30).

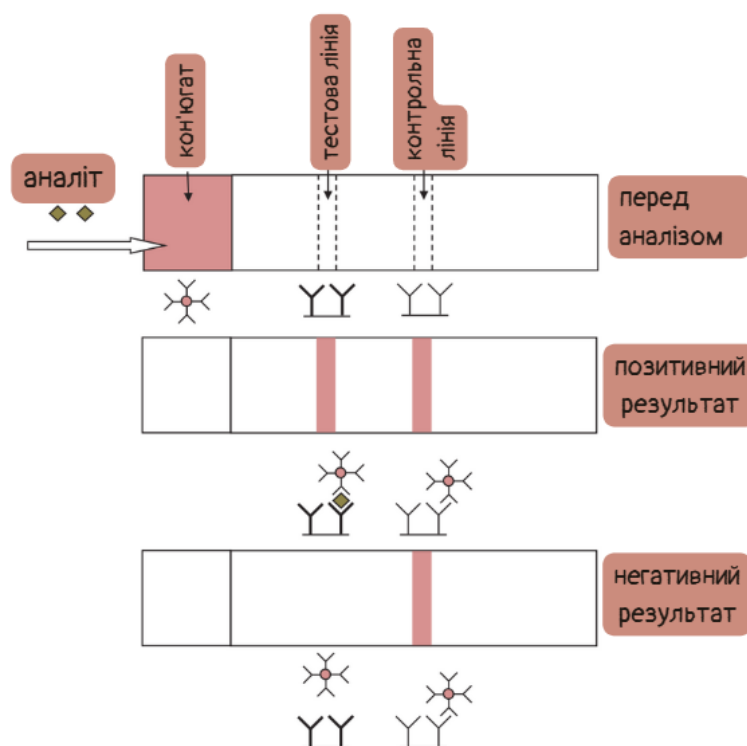


Рис. 30. Схематичне зображення прямого (сендвич) методу ІХА

У тестовій лінії іммобілізовані антитіла, специфічні до аналіту, що досліджується. У контрольній лінії іммобілізовані антивидові антитіла, які взаємодіють з міченими антитілами незалежно від наявності аналіту.

При нанесенні зразка, що містить аналіт, відбувається зв'язування аналіту з міченим антитілом, утворюючи імунний комплекс. Цей комплекс переміщується до тестової зони, де фіксується за допомогою другого антитіла, утворюючи "сендвич" (АТ-АГ-АТ-мітка). Надлишок кон'югату, що не зв'язався з аналітом, захоплюється у контрольній зоні антивидовими антитілами.

Поява двох забарвлених ліній — у тестовій і контрольній зонах — вказує на позитивний результат. При відсутності аналіту у зразку в тестовій зоні не утворюється забарвлення, а у контрольній з'являється одна лінія.

Прямий ІХА застосовується для виявлення високомолекулярних речовин, таких як віруси (включно з ВІЛ), гормони (наприклад, хоріонічний гонадотропін у тестах на вагітність), а також бактеріальні антигени.

Непрямий конкурентний метод

У конкурентному ІХА механізм базується на конкуренції між вільним аналітом, присутнім у зразку, і іммобілізованим аналітом, зв'язаним з білком-носієм, за зв'язування зі специфічними міченими антитілами (рис. 31).

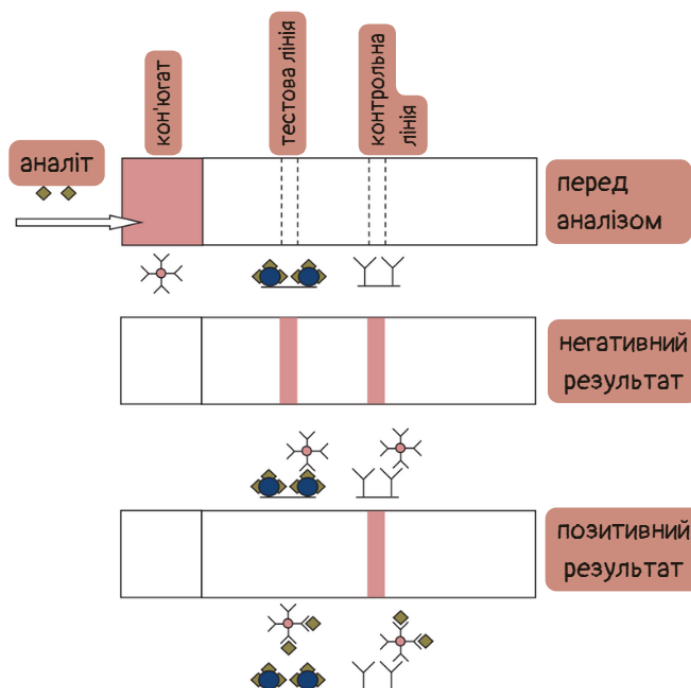


Рис. 31. Схематичне зображення непрямих конкурентних ІХА

У цьому варіанті на тестовій зоні іммобілізовані кон'югати аналіт-білок-носії, які специфічно взаємодіють з вільними антитілами.

Якщо у зразку присутній аналіт, він вступає у взаємодію з міченими антитілами ще до досягнення тестової зони. У такому разі активні центри антитіл вже зайняті, тому фіксація в тестовій зоні не відбувається.

У контрольній зоні відбувається зв'язування з антивидовими антитілами, що дає одну забарвлену лінію — позитивний результат.

У разі відсутності аналіту в зразку частина мічених антитіл залишаються вільними та зв'язуються з іммобілізованим кон'югатом аналіт-білок-носії у тестовій зоні — з'являється друга лінія. Таким чином, дві лінії означають негативний результат.

Цей метод застосовується для визначення низькомолекулярних речовин, зокрема метаболітів наркотичних сполук, токсинів, залишків пестицидів тощо.

Кількісні тести

Хоча більшість імунохроматографічних тестів мають якісну або напівкількісну природу, сучасні підходи дозволяють досягати повноцінної кількісної оцінки аналіту.

Для цього використовуються портативні зчитувачі бічного потоку, що працюють з технологіями CMOS або CCD (рис. 32).



Рис. 32. Зчитувачі бічного потоку (А) IUL launches iPeak+ і (В) Lateral Flow Tester LFT 100

Вони забезпечують детекцію тестових ліній при певних довжинах хвиль, а алгоритми цифрової обробки зображення дозволяють перетворювати інтенсивність сигналу на числові значення концентрації аналіту.

Прикладом таких рішень є пристрої компанії Detekt Biomedical L.L.C.

Крім того, існують альтернативні кількісні технології, наприклад магнітний імуноаналіз (МІА), що забезпечує реєстрацію сигналу на основі зміни магнітного поля.

Мітки, які використовуються в ІХА

ІХА-тести можуть містити різні типи міток, кожен з яких виконує функцію візуалізації або реєстрації результату:

- **Барвникові мітки:** найчастіше використовуються наночастинки колоїдного золота (червоного кольору), вуглецю або латексу, пофарбованого в синій або інші кольори. Вони забезпечують просту візуальну інтерпретацію та використовуються в мультианалізах.

- **Флуоресцентні, фосфоресцентні та біоломінісцентні мітки:** ковалентно зв'язані з латексними частинками та потребують використання спеціалізованих зчитувачів. Найбільш популярні флуоресцентні мітки.

- **Парамагнітні мітки:** використовуються в поєднанні з пристроями, що реєструють магнітне поле. Дають змогу автоматизувати та підвищити чутливість аналізу.

- **Ферментні мітки:** аналогічні до тих, що застосовуються у класичному ІФА. Результат проявляється після реакції з відповідним субстратом.

- **Ліпосомальні мітки:** інкапсують різні типи сигнальних речовин — барвники, ферменти, флуорофори, що розширює можливості мультиплексного аналізу.

Підготовка зразків та проведення аналізу

Проведення імунохроматографічного аналізу потребує ретельної підготовки зразків та дотримання встановленої процедури, що забезпечує достовірність і відтворюваність результатів.

На першому етапі здійснюється **збір біологічного матеріалу**, який може включати цільну кров, сироватку, плазму, сечу, слину або мазки з носоглотки, ротоглотки чи інших біологічних поверхонь. Тип зразка обирається відповідно до призначення тесту та специфікацій, зазначених у інструкції виробника. Для прикладу, у разі тестів на вагітність або виявлення наркотичних речовин зазвичай використовують сечу, тоді як для виявлення вірусних антигенів підходять мазки з носоглотки або слина.

Зібраний зразок повинен бути **свіжим або належно збереженим** відповідно до вимог конкретного набору (наприклад, використання консерванту, охолодження або заморожування). При роботі з кров'ю важливо уникати гемолізу, який може спотворити результати аналізу. У разі використання мазків, проба переноситься у транспортне середовище, рекомендоване виробником тест-системи.

Після підготовки зразка переходять до **активації тест-системи**. Тест-смужку або касету обережно виймають із герметичного пакування безпосередньо перед використанням. Слід уникати доторкання до мембранної ділянки пристрою руками або будь-якими предметами, щоб не забруднити аналітичну зону. Тестовий пристрій розміщують на чистій, горизонтальній та стабільній поверхні в умовах кімнатної температури, які відповідають рекомендаціям виробника.

На наступному етапі **вносять зразок** до спеціально призначеної зони на тест-смужці або у відповідне віконце касети. Об'єм зразка суворо регламентується (наприклад, 2–3 краплі), тому для внесення зразка зазвичай використовують піпетку або одноразову крапельницю, що входить до комплекту. У деяких випадках додається буфер або реагент для попередньої обробки зразка — з метою забезпечення оптимального рН або вивільнення аналіту.

Після нанесення зразка **починається капілярна міграція** рідини по мембрані. В цей час відбувається специфічна взаємодія аналіту з міченими антитілами або іншими компонентами, розташованими на тест-смужці. Стандартний час інкубації зазвичай становить від 5 до 20 хвилин, однак точна тривалість визначається інструкцією до конкретного тесту. Протягом цього періоду тестовий пристрій повинен залишатись нерухомим.

Після завершення інкубації **проводиться зчитування результату**. Візуальна інтерпретація передбачає спостереження за появою однієї або кількох забарвлених смуг у тестовій та контрольній зонах. У разі використання тестів із флуоресцентними або іншими непрямими мітками, результат фіксується за допомогою спеціального зчитувального пристрою (наприклад, флуориметра або сканера). У кількісних ІХА інтенсивність сигналу автоматично порівнюється із калібрувальною кривою або реєструється відповідним програмним забезпеченням.

Важливо враховувати, що результат вважається достовірним лише за наявності **контрольної лінії**, яка підтверджує правильність проведення аналізу. У випадку її відсутності результат вважається недійсним, що може свідчити про порушення умов зберігання тесту, некоректне нанесення зразка або використання зіпсованих реагентів.

Інтерпретація результатів

Правильна інтерпретація потребує уважності, особливо при використанні напівкількісних або кількісних тестів.

Інтерпретація результатів є завершальним і надзвичайно важливим етапом імунохроматографічного аналізу, який потребує уважності, знання типу тесту та чіткого дотримання інструкцій виробника. Точність клінічного або прикладного висновку безпосередньо залежить від коректності цього етапу.

Позитивний результат. У більшості класичних ІХА позитивний результат свідчить про наявність цільового аналіту у зразку. Він візуалізується появою двох чітко виражених ліній — однієї в контрольній зоні (що підтверджує правильність проведення тесту) та однієї в тестовій зоні, яка вказує на виявлення аналіту. Інтенсивність тестової лінії може варіюватися залежно від концентрації аналіту, особливо у напівкількісних тестах.

У деяких варіантах ІХА, зокрема у конкурентному форматі, позитивний результат проявляється лише як одна лінія — в контрольній зоні, тоді як тестова зона залишається незабарвленою. Це обумовлено особливостями принципу конкурентного зв'язування, при якому наявність аналіту у зразку запобігає утворенню забарвлення в тестовій зоні. Таким чином, інтерпретація результату повинна проводитися з урахуванням типу тест-системи.

Негативний результат. Негативний результат вказує на відсутність або концентрацію аналіту нижче межі чутливості тесту. У більшості тестів він проявляється лише у вигляді однієї забарвленої лінії у контрольній зоні, при відсутності забарвлення в тестовій зоні. Це свідчить про те, що специфічна взаємодія між аналітом і антитілами не відбулася, і аналіт не був виявлений.

У випадку конкурентного формату негативний результат супроводжується появою двох ліній — в контрольній та тестовій зонах, оскільки мічені антитіла не зайняті аналітом і зв'язуються з іммобілізованим кон'югатом у тестовій зоні.

Недійсний результат. Відсутність забарвлення в контрольній зоні незалежно від наявності або відсутності лінії в тестовій зоні вказує на некоректне проведення тесту або несправність тест-системи. Такий результат вважається недійсним і не може бути інтерпретований з аналітичною або клінічною метою. Причинами можуть бути:

- недостатній або надлишковий об'єм зразка;
- порушення послідовності дій;
- використання простроченого або зіпсованого реагенту;
- неправильне зберігання тест-смужки;
- технічний дефект мембрани.

У разі отримання недійсного результату аналіз слід повторити, використовуючи нову тест-смужку та нову пробу (за потреби).

Загальні зауваження. Для напівкількісних і кількісних тестів (наприклад, із флуоресцентною або магнітною детекцією), інтерпретація результатів базується не лише на візуальному спостереженні, а й на кількісному зчитуванні сигналу за допомогою відповідного приладу та програмного забезпечення. У таких випадках важливо враховувати інтенсивність сигналу, порівняння з калібрувальною кривою, а також межі виявлення, встановлені виробником.

Правильна інтерпретація результатів — ключовий чинник достовірності ІХА. Вона потребує як технічної точності при проведенні аналізу, так і професійного підходу до оцінки отриманих даних, особливо при використанні мультианалітичних або напівкількісних систем.

Застосування ІХА

ІХА завдяки своїм унікальним характеристикам — швидкості, простоті використання, доступності та високій специфічності — знайшов широке застосування у різних галузях біомедицини, сільського господарства, екології та безпеки.

Медична діагностика. ІХА є ефективним інструментом для експрес-діагностики вірусних та бактеріальних інфекцій, зокрема грипу, COVID-19, ВІЛ, гепатитів А, В і С, ротавірусів, аденовірусів, а також стрептококової та стафілококової інфекцій. Тест-системи можуть бути орієнтовані як на виявлення антигенів збудників, так і на антитіла, що свідчать про перенесену або поточну інфекцію.

Крім того, ІХА застосовується для гормональної діагностики, зокрема визначення рівня хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ) у тестах на вагітність, моніторингу рівнів ФСГ, ЛГ, ТТГ та інших гормонів.

В онкології імунохроматографічні тести використовуються для виявлення онкомаркерів, таких як простатспецифічний антиген (PSA), раково-ембріональний антиген (СЕА), альфа-фетопротейн (AFP) та інші.

Ветеринарія. У ветеринарній медицині ІХА активно застосовується для виявлення патогенів у домашніх і сільськогосподарських тварин, таких як віруси сказу, парвовірус собак, вірус лейкозу котів, сальмонели, мікоплазми тощо. Метод дозволяє швидко оцінити стан здоров'я тварин, забезпечити біобезпеку фермерських господарств і вчасно виявляти потенційні загрози зоонозного характеру.

Агропромисловий сектор. ІХА-тести застосовуються для контролю якості та безпеки харчових продуктів. Вони дають змогу виявляти залишки пестицидів, мікотоксини (афлатоксин, охратоксин), антибіотики, а також харчові алергени (наприклад, глютен, лактозу, білки горіхів тощо). Застосування ІХА в харчовій промисловості дозволяє проводити швидкий скринінг без необхідності тривалого лабораторного аналізу.

Екологічний моніторинг. У галузі екології ІХА дозволяє оперативно визначати забруднення навколишнього середовища, зокрема наявність важких металів, пестицидів, гербіцидів, мікробіологічних забруднювачів у зразках води, ґрунту чи повітря. Це особливо актуально для контролю джерел питної води, водойм поблизу промислових об'єктів, зон використання агрохімікатів.

Тестування на наркотики. Імунохроматографічні тести активно застосовуються для експрес-аналізу біологічних рідин (сеча, слина, кров) на наявність психоактивних речовин, метаболітів наркотиків (морфіну, кокаїну, амфетамінів, канабіноїдів, барбітуратів та ін.). Їх використовують у медицині, поліції, спорті, а також на підприємствах для профілактичного контролю.

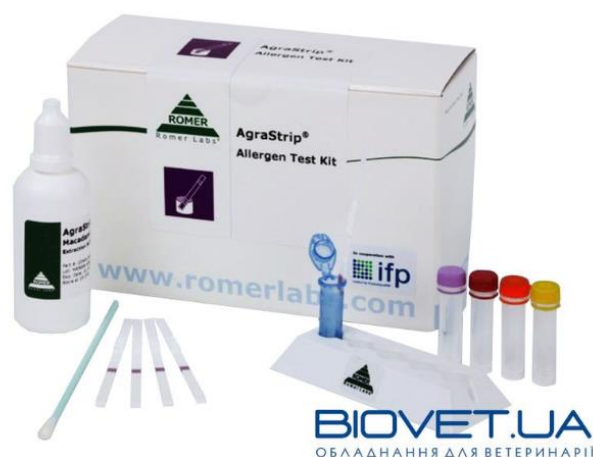


Рис. 33. Приклади тестів: (А) експрес-тест на ВІЛ 1/2, (В) тест-смужки AgraStrip®Allergen для виявлення алергенів, (С) IDEXX SNAPduo ST Plus Test – тести для виявлення залишкових концентрацій антибіотиків у молоці

Переваги, недоліки і перспективи ІХА

ІХА має ряд переваг, які визначають його практичну цінність у різних сферах застосування:

- **Швидкість отримання результату** — в середньому від 5 до 30 хвилин, що дає змогу оперативно приймати рішення.

- **Простота виконання** — не потребує спеціалізованого лабораторного обладнання, навичок або складної підготовки персоналу.
- **Портативність** — завдяки компактності тестів, їх легко застосовувати у віддалених регіонах, польових умовах, на кордонах, у медичних пунктах швидкого реагування.
- **Висока чутливість і специфічність** — сучасні тести здатні виявляти аналіти у дуже низьких концентраціях, аж до нанограм на мілілітр.
- **Доступність і економічність** — тест-системи є відносно недорогими у порівнянні з класичними лабораторними методами (ІФА, ПЛР), що робить їх оптимальними для масового скринінгу.

Попри численні переваги, ІХА має певні обмеження, які слід враховувати при його використанні:

- **Нижча аналітична точність** у порівнянні з лабораторними методами, зокрема ІФА та ПЛР.
- **Можливість хибнопозитивних і хибнонегативних результатів**, особливо у разі порушення правил зберігання або проведення тесту, недостатньої концентрації аналіту, перехресних реакцій.
- **Обмеження у визначенні дуже низьких концентрацій аналіту**, що потребує використання приладового зчитування для підвищення чутливості.
- **Висока залежність від правильності виконання аналізу**, умов зберігання, температурного режиму та точного дотримання інструкції виробника.

На сучасному етапі розвитку аналітичної діагностики імунохроматографічні методи продовжують активно вдосконалюватися. Основні напрямки їх розвитку включають:

- **Підвищення чутливості, точності та відтворюваності** за рахунок удосконалення реагентів, мембран, міток та форматів зчитування.
- **Розширення переліку визначуваних біомаркерів**, що дозволить використовувати ІХА у складніших діагностичних алгоритмах, включаючи багатофакторні захворювання.
- **Інтеграція з цифровими технологіями**: поєднання ІХА з мобільними пристроями (наприклад, смартфонами), автоматизованими сканерами та програмним забезпеченням для обробки результатів.
- **Мініатюризація платформ** для персоналізованої медицини та використання в домашніх умовах.
- **Використання новітніх міток і наноматеріалів**, включаючи магнітні, люмінесцентні, квантові точки та ліпосомальні носії, що дозволить покращити мультиплексний аналіз і підвищити точність реєстрації сигналу.

Таким чином, імунохроматографічний аналіз продовжує залишатися актуальним і перспективним напрямом в аналітичній діагностиці та має потенціал для подальшої адаптації до потреб точного, доступного й мобільного тестування.

Практична частина

Тема. Проведення експрес-тесту на виявлення антигену коронавірусу COVID-19 (SARS-CoV-2)

Матеріали: експрес-тест STANDARD Q COVID-19 Ag Test (або аналогічний сертифікований набір), що містить тест-касети (в індивідуальних упаковках), стерильні тампони для збору зразків, пробірки з буферним розчином (екстракційним буфером), кришки-дозатори, інструкція виробника; засоби індивідуального захисту (ЗІЗ): медичні рукавички, одноразовий халат або медичний костюм, захисна маска або респіратор, захисні окуляри або щиток.

Обладнання: контейнер для збору використаних матеріалів (клінічних відходів), штатив для пробірок (за потреби), таймер або секундомір; стіл з покриттям, придатним для санітарної обробки, освітлення достатньої яскравості для візуального зчитування результату, блокнот або журнал для запису результатів, дезінфекційний засіб для обробки поверхонь.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть експрес-діагностику на виявлення антигену SARS-CoV-2 у зразку біоматеріалу за допомогою комерційного набору для IHA STANDARD Q COVID-19 Ag Test або аналогічного тесту.

Принцип методу. IHA – це швидкий метод якісного або напівкількісного визначення специфічних молекул (антигенів або антитіл) у біологічних рідинах, що базується на реакції імунного комплексу та руху по твердій фазі (мембрані). У випадку виявлення антигену SARS-CoV-2 у зразку (мазок із носоглотки), він зв'язується з кон'югованими з золотом або латексом антитілами. Утворений комплекс мігрує по мембрані та захоплюється фіксованими специфічними антитілами в тестовій зоні (Т), утворюючи кольорову смугу. Контрольна смуга (С) свідчить про правильність проведення тесту. Наявність обох смуг означає позитивний результат, лише контрольної – негативний, а її відсутність – недійсний результат.

Клінічне значення. IHA дозволяє швидко і без використання лабораторного обладнання виявити наявність антигену SARS-CoV-2 у пацієнта на ранніх етапах захворювання. Метод широко використовується для скринінгу, епідагляду та попередньої діагностики COVID-19 у клінічних і позаклінічних умовах.

Хід роботи

1. Підготовка матеріалів та реагентів. Перевірити термін придатності тест-системи. Довести всі компоненти тест-набору до кімнатної температури (18–25°C). Витягнути тест-касету з герметичного пакування безпосередньо перед використанням.

2. Збір зразку. За допомогою стерильного тампону відібрати мазок з носоглотки або носа відповідно до інструкції виробника.

3. Екстракція антигену. Помістити тампон у пробірку з буфером-екстрактантом. Добре перемішати, стискаючи тампон об стінки пробірки, щоб екстрагувати зразок. Залишити на 1 хвилину, потім викинути тампон, стискаючи краї пробірки.

4. Нанесення зразку. Нанести 3–4 краплі екстрагованого зразка у зразкове віконце (S) тест-касети.

5. Інкубація. Зачекати 15–20 хвилин (залежно від інструкції набору).

Завдання 2. Оцініть результат тестування згідно з інструкцією до набору:

✓ **Позитивний:** з'явилися обидві лінії – контрольна (C) і тестова (T).

✓ **Негативний:** з'явилася лише контрольна лінія (C).

✓ **Недійсний:** відсутність контрольної лінії (C), незалежно від наявності тестової (T).

Вкажіть, який результат Ви отримали у своєму тесті (позначити). У разі позитивного результату – поясніть, що це означає в контексті діагностики COVID-19. Якщо результат недійсний – наведіть можливі причини.

Завдання 3. На основі отриманих результатів коротко сформулюйте висновки щодо: правильності виконання етапів експрес-тестування; надійності отриманого результату; можливостей використання ІХА для швидкої діагностики інфекційних захворювань.

Застереження:

- не використовувати тест повторно,
- дотримуватись правил біобезпеки при роботі з потенційно інфікованими зразками,
- інтерпретацію слід проводити лише у зазначений час (не раніше 15 і не пізніше 30 хвилин).

Контрольні питання

1. У чому полягає принцип дії ІХА та як забезпечується специфічність виявлення аналіту?

2. Чим відрізняється прямий (сендвич) метод ІХА від непрямого конкурентного методу за механізмом реакції та інтерпретацією результатів?

3. Які типи міток використовуються в ІХА, та які їхні особливості й вимоги до візуалізації результатів?

4. Які етапи включає підготовка зразка до проведення ІХА та які фактори можуть вплинути на достовірність результату?

5. Що вказує на недійсність результату ІХА та які можливі причини цього?

6. Які сучасні технології дозволяють проводити кількісну інтерпретацію результатів ІХА і в чому полягає їх принцип?

7. Для яких завдань у медичній, ветеринарній, екологічній та агропромисловій сферах ІХА є найбільш ефективним? Наведіть приклади.

8. Які переваги ІХА роблять його привабливим для використання у польових та позалабораторних умовах?

9. Назвіть основні недоліки ІХА як діагностичного методу та поясніть, як вони можуть впливати на інтерпретацію результатів.

10. Які перспективні напрями розвитку ІХА окреслюють його майбутнє як інструменту персоналізованої діагностики?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Імунофлюоресценція (ІФ)

Мета: ознайомитися з основними принципами, різновидами та практичними аспектами використання імунофлюоресценції (ІФ), засвоїти методику її проведення, проаналізувати переваги та обмеження методу; сформувати розуміння значення ІФ у біомедичних дослідженнях шляхом перегляду демонстраційного відео та участі в груповому обговоренні на тему «Потенціал використання імунофлюоресценції у сучасних біомедичних дослідженнях».

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика і принцип методу імунофлюоресценції.
2. Різновиди і методика проведення імунофлюоресценції.
3. Переваги та обмеження методу.

Загальна характеристика і принцип методу імунофлюоресценції

Імунофлюоресценція (ІФ, англ. *immunofluorescence*, IF) — це метод світлової мікроскопії, що забезпечує детекцію та локалізацію широкого спектра цільових біомолекул у клітинах або тканинах на кількісному рівні. Ця методика ґрунтується на специфічній взаємодії між антитілами та антигенами. Специфічна ділянка антигену, яку розпізнає антитіло, називається епітопом. Різні антитіла можуть розпізнавати один і той самий епітоп, однак відрізнятися між собою за спорідненістю зв'язування. Антитіло з вищою спорідненістю до певного епітопу буде переважати у зв'язуванні над антитілами з нижчою спорідненістю.

Для візуалізації цільової біомолекули антитіло кон'югують із флуорофором. Положення мішені визначається шляхом збудження флуорофора та реєстрації випромінювання у певному спектральному діапазоні за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Важливо, щоб зв'язування флуорофора до антитіла не порушувало імунологічну специфічність антитіла або його здатність зв'язуватись із відповідним антигеном.

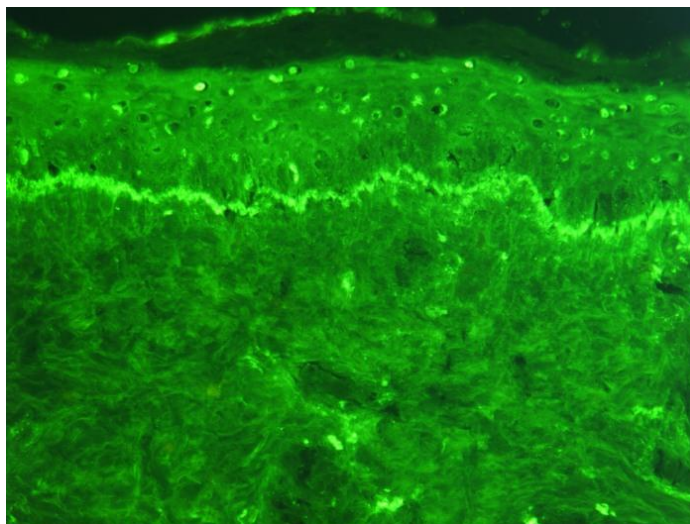


Рис. 34. Фотознімок гістологічного зрізу шкіри людини, підготовленого для прямої ІФ з використанням антитіл проти IgG

Зразок шкіри отримано від пацієнта із системним червоним вовчаком і демонструє відкладання IgG у двох ділянках: перша — стрічкоподібне відкладання вздовж базальної мембрани епідермісу (тест "вовчакової стрічки" позитивний); друга — у ядрах клітин епідермісу (антиядерні антитіла)

ІФ є широко застосовуваним прикладом імуофарбування (тобто використання антитіл для мічення білків) та специфічним прикладом імуногістохімії, що передбачає використання взаємодії антиген-антитіло у тканинах. На відміну від інших форм імуногістохімії, де застосовуються хромогенні реакції або радіоактивне мічення, імуофлуоресценція базується переважно на використанні флуорофоров для візуалізації антитіл.

Концепція імуофлуоресцентної техніки із застосуванням мічених антитіл була вперше запропонована у 1940-х роках Альбертом Г. Кунсом (Albert H. Coons). Сьогодні імуофлуоресценція активно використовується як у фундаментальних наукових дослідженнях, так і в клінічній діагностиці, демонструючи свою універсальність при аналізі різноманітних біологічних об'єктів — гістологічних зрізів, культур клітин або окремих клітин. Зокрема, її застосовують для дослідження розподілу білків, гліканів, малих біологічних і небіологічних молекул, а також для візуалізації субклітинних структур, наприклад, філаментів проміжного розміру.

У випадках, коли топологія клітинної мембрани недостатньо відома, епітопи можуть бути інженерно інтегровані в структури білків, що дозволяє з використанням імуофлуоресценції дослідити організацію мембранних компонентів. Крім того, ІФ може застосовуватись як напівкількісний метод, що дозволяє оцінити рівні та локалізаційні патерни, наприклад, метилювання ДНК. Метод також може поєднуватися з іншими флуоресцентними техніками, які не базуються на антитілах, наприклад, з використанням DAPI для забарвлення ДНК.

Різновиди і методика проведення імуофлуоресценції

Аналіз зразків, підготовлених за методом ІФ, може здійснюватися за допомогою різних типів мікроскопії, включаючи епіфлуоресцентну мікроскопію, конфокальну мікроскопію, а також широкопольову флуоресцентну мікроскопію, що дозволяє обрати оптимальну техніку відповідно до цілей дослідження.

Підготовка до флуоресцентного фарбування

Для проведення імуофлуоресцентного фарбування необхідно здійснити кон'югацію (мічення) флуорофора з антитілом. Процедури фарбування можуть застосовуватись як для внутрішньоклітинних білків після фіксації та проникнення реагентів у клітину, так і для антигенів на поверхні клітин у живих клітинах. Існують два основних підходи до імуофлуоресцентного аналізу: прямий (direct) та непрямий (indirect), які розрізняються за способом мічення антитіл.

Прямий (англ. primary, direct) імуофлуоресцентний метод

Прямий імуофлуоресцентний метод (англ. *Direct Immunofluorescence, DIF*) передбачає використання одного антитіла, безпосередньо кон'югованого з флуорофором. Це антитіло специфічно розпізнає цільову молекулу (антиген) та зв'язується з її епітопом — унікальною ділянкою на поверхні антигену. Після

зв'язування флуорофор збуджується світлом певної довжини хвилі та випромінює флуоресцентний сигнал, який фіксується за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

Однією з переваг прямого методу є спрощення процедури підготовки зразка — зменшується кількість інкубаційних і промивних кроків, що економить час та знижує ризик виникнення неспецифічного фону. Крім того, такий підхід зменшує ймовірність перехресної реактивності антитіл або помилок під час багатоетапного фарбування.

Однак недоліком методу є нижча чутливість. Це пов'язано з тим, що кожен антиген зазвичай зв'язує лише одне мічене антитіло, внаслідок чого кількість флуорофорів на одиницю цільової молекули є обмеженою. Такий підхід не дозволяє ефективно виявляти білки, присутні в низьких концентраціях. У подібних випадках кращою альтернативою є непрямий метод, який забезпечує вищу чутливість.

Непрямий (англ. secondary, indirect) імунофлуоресцентний метод

Непрямий імунофлуоресцентний метод (англ. *Secondary or Indirect Immunofluorescence, SIF*) передбачає використання двох типів антитіл. У цьому підході первинне антитіло не мічене — воно зв'язується безпосередньо зі специфічним епітопом на цільовій молекулі. Після цього до зразка додається вторинне антитіло, яке вже містить флуорофор і розпізнає первинне антитіло (зазвичай за його Fc-фрагментом).

Однією з ключових переваг непрямой ІФ є її вища чутливість порівняно з прямою. Це зумовлено тим, що до одного первинного антитіла може приєднатися декілька мічених вторинних антитіл, що підвищує кількість флуорофорів на один епітоп і, відповідно, підсилює інтенсивність флуоресцентного сигналу.

Для подальшого підвищення співвідношення флуорофор-антиген можуть бути використані спеціалізовані методи, зокрема:

- **Avidin-Biotin Complex (ABC)** — метод, заснований на сильній взаємодії авідину та біотину;
- **Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB)** — варіант із застосуванням стрептавідин-біотинового комплексу, міченого флуорофором.

Ці підходи дозволяють отримати ще потужніший сигнал і використовуються в ситуаціях, коли аналіт присутній у низьких концентраціях або потрібна висока роздільна здатність.

Переваги та обмеження методу

Переваги. ІФ є одним із найчутливіших та найінформативніших методів у сучасній імунології, гістології, клітинній біології та біомедичних дослідженнях. Вона ґрунтується на специфічній взаємодії антитіла з антигеном і дозволяє виявляти мішені з високою точністю за допомогою флуоресцентних міток. Основні переваги методу:

Висока чутливість і специфічність. Завдяки використанню антитіл, які специфічно зв'язуються з цільовими молекулами, метод забезпечує високу точність виявлення навіть невеликих кількостей антигенів у клітині або тканині.

Просторове локалізування мішені. ІФ дозволяє не лише підтвердити наявність антигену, а й візуалізувати його точну локалізацію в клітині, тканині або субклітинній структурі (ядро, мембрана, цитоплазма тощо).

Можливість багатокомпонентного аналізу (мультиплекс). Завдяки використанню різних флуорохромів можна одночасно виявляти кілька мішеней у межах одного зразка, що значно підвищує інформативність аналізу.

Швидкість отримання результатів. Процедура може бути завершена за кілька годин, що робить метод особливо цінним для швидкої діагностики або скринінгових досліджень.

Сумісність з іншими методами мікроскопії. ІФ можна поєднувати з фазово-контрастною, конфокальною, електронною мікроскопією та іншими техніками для отримання комплексної інформації про зразок.

Відсутність потреби у маркуванні антигену. На відміну від деяких інших методів, ІФ не потребує попереднього генетичного або хімічного маркування цільової молекули — маркується антитіло.

Підходить для in situ аналізу. Метод дозволяє досліджувати антигени у незруйнованих клітинах або тканинах, зберігаючи їх морфологію та контекст оточення.

Завдяки цим перевагам ІФ широко використовується в діагностиці інфекційних, аутоімунних та онкологічних захворювань, а також у фундаментальних дослідженнях клітинної диференціації, сигналіngu та регуляції експресії генів.

Обмеження. ІФ має низку обмежень, які необхідно враховувати при її застосуванні в клітинній біології. Зокрема, метод є обмеженим щодо використання на живих клітинах, особливо при дослідженні внутрішньоклітинних структур. Це пов'язано з тим, що антитіла, як великі білкові молекули, зазвичай не проникають крізь інтактні клітинні або субклітинні мембрани живих клітин. Отже, щоб візуалізувати внутрішньоклітинні структури, необхідно зафіксувати зразок, забезпечивши стабільне збереження антигенного матеріалу у його природному розташуванні.

Для дослідження структур у живих клітинах можливе використання альтернативного підходу — введення у клітини рекомбінантних білків, що містять флуоресцентні домени, таких як зелений флуоресцентний білок (англ. GFP). Методика GFP передбачає генетичну модифікацію клітин, у результаті якої експресується мічений флуоресцентним білком цільовий білок, що дозволяє спостерігати його локалізацію та динаміку в реальному часі.

Основні проблеми, пов'язані з імунофлуоресценцією

Одним із суттєвих обмежень методу є **фотодеградація флуорофорів** (фотозгасання, або фотоблічінг) — явище незворотної втрати здатності флуорофора випромінювати світло після тривалого збудження. Щоб мінімізувати цей ефект, використовують такі підходи:

- зменшення інтенсивності або тривалості світлового впливу, що знижує кількість циклів збудження-випромінювання;
- збільшення концентрації флуорофорів у системі;
- використання флуорофорів з підвищеною стійкістю до фотозгасання, таких як Alexa Fluor, Seta Fluor або DyLight Fluor.

Окрім фотозгасання, до поширених проблем, що можуть виникнути під час проведення імуофлуоресцентного аналізу, належать:

- **аутофлуоресценція** — це природна здатність зразка (тканини або клітини) випромінювати флуоресцентний сигнал без додавання флуорофорів, що може спотворювати результати,
- **спектральне перекриття** — виникає, коли два флуорофори мають широкі та частково накладені спектри випромінювання, що призводить до появи хибних сигналів у каналах детекції,
- **неспецифічне фарбування** — спостерігається, коли антитіло з флуорофором зв'язується з небажаними мішенями, які мають подібні або хрест-реактивні епітопи. Це може стати причиною **хибнопозитивних результатів** і ускладнити інтерпретацію даних.

Сучасні досягнення в імуофлуоресцентному аналізі

Сучасний розвиток ІФ значною мірою зосереджений на модифікації флуорофорів та вдосконаленні оптичної мікроскопії. Зокрема, флуорофори можуть бути хімічно змінені для покращення яскравості, фотостабільності, проникності в клітину, при збереженні бажаних спектральних характеристик.

Особливе значення має розвиток надроздільної флуоресцентної мікроскопії (англ. super-resolution fluorescence microscopy), яка дозволяє отримувати зображення з роздільною здатністю, що перевищує дифракційний ліміт світла. Це дає змогу деталізовано вивчати ультраструктурні елементи клітини, які раніше неможливо було розрізнити стандартними методами.

Надроздільна мікроскопія також дозволяє зменшити ефект спектрального перекриття, завдяки здатності контролювати флуоресценцію суміжних міток і підвищувати селективність сигналу.

Серед новітніх методів надроздільної флуоресцентної мікроскопії виділяють:

- **STED (Stimulated Emission Depletion microscopy)** — метод стимульованого виснаження випромінювання;
- **SSIM (Saturated Structured Illumination Microscopy)** — насичена структурно-освітлювальна мікроскопія;
- **FPALM (Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy)** — локалізаційна мікроскопія на основі фотоактивації флуоресценції;
- **STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)** — стохастична оптична реконструкція.

Ці технології істотно розширюють можливості ІФ у фундаментальних дослідженнях клітинної архітектури, просторової організації білкових комплексів і молекулярних механізмів у нормі та патології.

Практична частина

Тема. Перегляд демонстраційного відео про ІФ. Групове обговорення на тему: «Потенціал використання імуофлуоресценції у сучасних біомедичних дослідженнях»

Матеріали: демонстраційне відео з проведення реакції імуофлуоресценції (пряма та непряма ІФ); інформаційні довідки щодо принципу дії ІФ, типів флуоресцентних міток та областей застосування

методу; роздаткові матеріали для групової роботи (картки з прикладами клінічних або наукових ситуацій); таблиця для аналізу переваг, обмежень та сфер використання ІФ; доступ до мережі Інтернет (для уточнення інформації або перегляду додаткових матеріалів).

Обладнання: комп'ютер з підключенням до Інтернету; мультимедійний проектор для демонстрації відео; фліпчарти або маркерна дошка для презентації результатів обговорення; маркери для роботи в групах; зошити або блокноти для індивідуальних записів; роздруковані листки з аналітичними завданнями або кейсами.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з теоретичним матеріалом.

1. Ознайомтеся з принципами дії реакції імунофлюоресценції (ІФ), її видами (пряма, непряма), типами флуорохромів і сферами використання методу (вірусологія, гістологія, онкологія, клітинна біологія тощо).

2. Перегляньте демонстраційне відео, звертаючи увагу на послідовність виконання методики, особливості підготовки зразків, використання міток та результати аналізу.

Завдання 2. Групове обговорення.

1. Об'єднайтесь у малі групи (3–5 осіб).

2. Заповніть таблицю під час обговорення:

Таблиця 14. Переваги, обмеження та сфери застосування РІФ у біомедичних дослідженнях

Аспект	Пояснення / приклади
Переваги ІФ	...
Обмеження ІФ	...
Сфери застосування	...
Приклади біомедичних досліджень, де використовується РІФ	...

3. Обговоріть у групі:

- У яких галузях біомедицини ІФ є незамінним методом?
- Як використання флуоресцентних міток покращує точність і специфічність діагностики?
- Які обмеження методу варто враховувати при плануванні дослідження?

4. Підготуйте коротку усну презентацію результатів групового обговорення (до 5 хвилин) з узагальненням висновків.

Завдання 3. Узагальнення та рефлексія.

1. Проведіть спільне обговорення на теми:

- Яке значення має метод імунофлюоресценції для розвитку персоналізованої медицини?
- Як метод ІФ впливає на точність лабораторної діагностики інфекційних, онкологічних та аутоімунних захворювань?
- У чому полягає перевага використання флуоресцентних методів над традиційними серологічними реакціями?

Завдання 4. Зробіть індивідуальні висновки (запишіть письмово).

1. Які переваги і недоліки ІФ ви вважаєте найбільш суттєвими з погляду сучасних біомедичних досліджень?
2. У яких ситуаціях доцільно обирати метод ІФ серед інших імунологічних методів?
3. Як, на вашу думку, може змінитися роль імунофлюоресценції з розвитком флуоресцентних технологій та штучного інтелекту?

Контрольні питання

11. Що таке імунофлюоресценція та який принцип лежить в основі цього методу?
12. Яку роль відіграє епітоп у взаємодії антитіла з антигеном при проведенні імунофлюоресценції?
13. У чому полягає відмінність між прямим і непрямим імунофлюоресцентним методами?
14. Які переваги має непряма імунофлюоресценція порівняно з прямою?
15. Для чого використовують флуорофори у методі імунофлюоресценції, і які вимоги до них висуваються?
16. Які типи мікроскопії застосовуються для візуалізації результатів імунофлюоресценції?
17. У яких випадках імунофлюоресценція може застосовуватись як напівкількісний метод аналізу?
18. Назвіть основні переваги імунофлюоресценції як методу дослідження біомолекул.
19. Які проблеми можуть виникнути при використанні імунофлюоресценції та як їх можна мінімізувати?
20. Що таке надроздільна флуоресцентна мікроскопія та які її переваги в порівнянні зі звичайною флуоресцентною мікроскопією?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Імуногістохімія (ІГХ)

Мета: ознайомитися з основними теоретичними принципами імуногістохімічного аналізу (ІГХ) як методу виявлення експресії специфічних білків у тканинних зрізах за допомогою антитіл; засвоїти етапи підготовки гістологічного матеріалу для ІГХ-дослідження, включаючи фіксацію, депарафінізацію, антигенну детекцію та блокування неспецифічного зв'язування; ознайомитися з методами візуалізації та інтерпретації результатів, а також з можливостями автоматизації ІГХ у клінічній діагностиці; набутти практичних навичок проведення імуногістохімічного фарбування на прикладі визначення експресії білка p53, що має важливе значення для діагностики та прогнозу онкологічних захворювань.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика імуногістохімічного аналізу.
2. Підготовка зразків для проведення ІГХ.
3. Сфери застосування ІГХ.

4. Автоматизація імуногістохімічного аналізу.

Загальна характеристика імуногістохімічного аналізу

Імуногістохімія (ІГХ або англ. immunohistochemistry, ІНС) є різновидом імунофарбування, що базується на селективному виявленні антигенів у клітинах та тканинах за допомогою специфічного зв'язування антитіл з відповідним антигенами у біологічних структурах. Принцип методу полягає у використанні високоспецифічної взаємодії антитіл з епітопами білкових молекул, які локалізовані в тканинах.

Історично, розробка методу імунофлуоресценції Альбертом Г'юветтом Кунсом (Albert Hewett Coons), Ернестом Берлінером (Ernest Berliner), Норманом Джонсом (Norman Jones) і Г'ю Крічем (Hugh J. Creech) у 1941 році стала основою для подальшого розвитку імуногістохімії як методу візуалізації антигенів у тканинах.

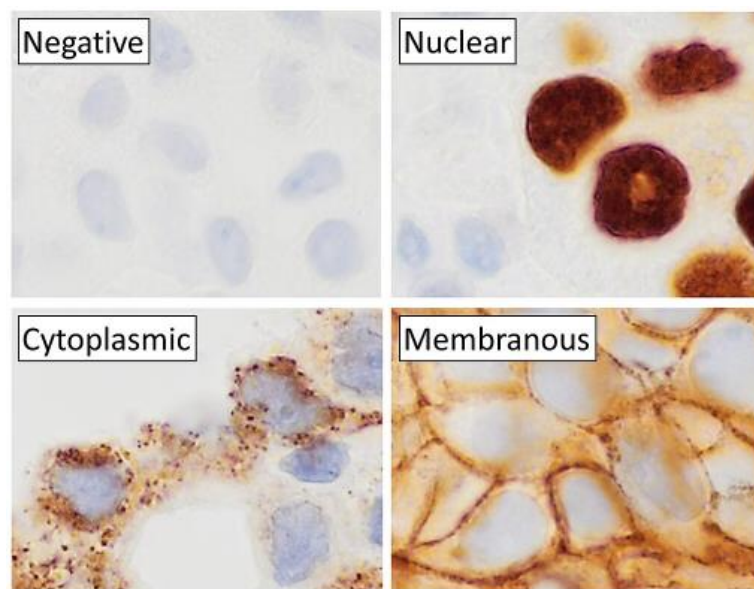


Рис. 35. Основні типи забарвлення в імуногістохімії, включаючи негативне, ядерне, цитоплазматичне та мембранне фарбування (джерело: https://en.wikipedia.org/wiki/Immunohistochemistry#/media/File:Main_staining_patterns_on_immunohistochemistry.jpg)

Підготовка зразків для проведення ІГХ

Імуногістохімічне фарбування може проводитись як на парафінових зрізах, що отримані після фіксації тканини та її включення в парафін, так і на заморожених зрізах, які зберігались при низькій температурі. Метод підготовки зразка залежить від способу консервації тканини, однак у загальному вигляді включає етапи фіксації, відновлення антигенів, інкубації з первинним антитілом, а потім — з вторинним антитілом.

Фіксація тканини. Фіксація має критичне значення для збереження морфології тканини та структури клітин. Тип фіксатора, співвідношення фіксатор/тканина та тривалість фіксації суттєво впливають на результати фарбування. Найбільш поширеним фіксатором є 10% нейтральний буферний формалін, який забезпечує стабілізацію білкових структур шляхом утворення хімічних поперечних зв'язків. Оптимальна тривалість фіксації за кімнатної

температури становить приблизно 24 години, а співвідношення фіксатор:тканина може варіюватися від 1:1 до 1:20. Після фіксації тканина може бути залита у парафін для подальшого мікротомного нарізання.

У випадку заморожених зрізів фіксація часто виконується після зрізування (особливо якщо використовуються нові, не протестовані антитіла). Як фіксатори можуть застосовуватись ацетон або формалін.

Нарізання тканини. Нарізання тканини здійснюється за допомогою мікротому. Для парафінових блоків оптимальна товщина зрізів складає 4 мкм, для заморожених зразків — 4–6 мкм. Товщина зрізу має істотне значення для якості ІГХ: занадто тонкі зрізи можуть не містити всіх структур, тоді як занадто товсті — ускладнюють проникнення антитіл та зменшують чіткість зображення.

Перед фарбуванням парафінові зрізи повинні бути депарафінізовані — видалені залишки парафіну за допомогою ксилолу або його замінників, після чого проводиться градуйована регідратація у низці спиртів зі зменшенням концентрації.

Відновлення антигенів (англ. antigen retrieval). Фіксація тканини формаліном призводить до утворення метиленових містків або поперечних зшивок між аміногрупами, що можуть маскувати епітопи, роблячи їх недоступними для зв'язування з антитілами. Процедура відновлення антигенів дозволяє руйнувати ці зшивки, таким чином відновлюючи антигенність тканини.

Найчастіше антигенну детекцію покращують за допомогою теплового відновлення у буферному розчині, що виконується шляхом інкубації мікроскопічних предметних скелець у мікрохвильовій печі, автоклаві, водяній бані або на нагрівальній пластині. Для більшості формалін-фіксованих парафінових зрізів цей етап є обов'язковим. Для заморожених зрізів зазвичай не потрібне відновлення антигенів, однак, якщо вони були додатково фіксовані ацетоном або формаліном, ця процедура може підсилити імуногістохімічний сигнал.

Блокування неспецифічного зв'язування. Неспецифічна взаємодія антитіл з небажаними білками може призводити до фонового фарбування. Хоча антитіла мають високу специфічність, вони можуть слабо або частково зв'язуватися зі схожими за структурою білками. Щоб мінімізувати фонову реакцію, тканину інкубують із нормальною сироваткою того виду, з якого було отримано вторинне антитіло.

Також можуть застосовуватись комерційні універсальні блокуючі буфери, що містять компоненти, здатні блокувати неспецифічні місця зв'язування. Серед інших поширених блокуючих розчинів — нормальна сироватка, знежирене сухе молоко, білок BSA або желатин.

Ще однією причиною фонового фарбування є ендогенна активність ферментів (наприклад, пероксидази), яка може імітувати позитивний сигнал. Для її блокування зразки обробляють розчином перекису водню (H_2O_2).

Мічення зразка. Після підготовки тканинного зразка в імуногістохімії здійснюється мічення цільової молекули за допомогою антитіл, зв'язаних із репортерними молекулами — флуорофорами, металами або ферментами. Залежно від обраної стратегії, застосовують прямі або непрямі методи мічення, які відрізняються за складністю, чутливістю та варіантами детекції.

Типи антитіл. У методах імуногістохімічної детекції використовуються поліклональні або моноклональні антитіла, кожен тип з яких має свої переваги та специфіку виробництва.

- *Поліклональні антитіла* отримують шляхом імунізації лабораторних тварин (морських свинок, кроликів, мишей, щурів, кіз) антигеном інтересу. У відповідь на імунізацію утворюється суміш антитіл, які розпізнають різні епітопи того самого антигену. Поліклональні антитіла ізолюють із сироватки крові і використовують, коли потрібно забезпечити високу чутливість і надійність зв'язування навіть при варіабельності антигену.

- *Моноклональні антитіла* утворюються шляхом отримання однієї клональної В-лімфоцитарної лінії, яка синтезує антитіло проти єдиного епітопу. Після імунізації тварини В-клітини, що продукують потрібне антитіло, ізолюють (зазвичай із селезінки) та зливають із клітинами мієломи для утворення гібридом. Такий підхід забезпечує високу специфічність і відтворюваність.

Пряме і непряме мічення. Залежно від використання антитіл, розрізняють два основні методи імуногістохімічного мічення: прямий та непрямий.

Прямий метод (англ. direct labeling). У прямому методі застосовується одне антитіло, мічене репортерною молекулою, яке безпосередньо зв'язується з антигеном у тканині. Цей метод є простим, швидким і мінімізує кількість етапів аналізу. Проте, через відсутність ампліфікації сигналу, він має нижчу чутливість у порівнянні з непрямыми методами.

Непрямий метод (англ. indirect labeling). Непрямий метод передбачає використання неміченого первинного антитіла, яке зв'язується з цільовим антигеном, та вторинного антитіла, яке розпізнає IgG первинного антитіла. Вторинне антитіло містить репортерну мітку або сполуку, яка здатна зв'язати мітку (наприклад, біотин).

Переваги непрямого методу:

- Підвищена чутливість за рахунок того, що кілька вторинних антитіл можуть зв'язуватись із кожним первинним антитілом, забезпечуючи ампліфікацію сигналу.

- Універсальність: один тип міченого вторинного антитіла може використовуватись для багатьох первинних антитіл, отриманих з одного виду. Наприклад, мічене вторинне антитіло до кролячого IgG підходить для будь-якого первинного антитіла, отриманого в кролика.

- Економічність: немає потреби мітити кожне первинне антитіло окремо.

Репортерні молекули. Тип репортерної молекули визначає характер візуалізації сигналу. Найпоширенішими є:

- *хромогенні системи:* антитіло кон'югується з ферментом (наприклад, пероксидазою хрому (HRP) або лужною фосфатазою (ALP)), який каталізує кольорову реакцію у присутності субстрату (наприклад, діамінобензидину (DAB)). Отриманий забарвлений продукт видно під звичайним світловим мікроскопом.

- *флуоресцентні системи:* антитіло кон'югується з флуорофором, таким як: ізотіоціанат флуоресцеїну (FITC), ізотіоціанат тетраметилродаміну (TRITC), аміноетилкумарин (AMCA), Cyanine5.

Широко застосовуються також синтетичні флуорохроми серії Alexa Fluor, які відзначаються високою яскравістю та стабільністю.

Візуалізація здійснюється за допомогою флуоресцентної або конфокальної мікроскопії.

Для обох типів візуалізації (флуоресцентної та хромогенної) можливе денситометричне або спектрофотометричне визначення інтенсивності сигналу, що дозволяє отримати напівкількісні або кількісні дані про рівень експресії або локалізацію білка.

Контрзабарвлення. Після імуногістохімічного фарбування специфічного антигену часто проводиться контрзабарвлення, яке допомагає візуалізувати морфологію тканини та забезпечує контрастність, що полегшує інтерпретацію результатів.

Найпоширенішим контрбарвником є гематоксилін, який забарвлює ядра клітин у синьо-фіолетовий колір. Це дає змогу оцінити архітектуру тканини, розташування клітин, орієнтацію зрізу та співвіднести специфічне фарбування з анатомічними структурами.

Усунення проблем при проведенні ІГХ. Під час імуногістохімічного фарбування існує багато критичних етапів, які можуть призвести до виникнення різноманітних проблем. Серед найпоширеніших є сильне фонове фарбування, слабе забарвлення цільового антигену або поява артефактів. Щоб досягти надійних і відтворюваних результатів, необхідно ретельно контролювати якість антитіл і оптимізувати всі етапи методики.

Сильне фонове фарбування може бути спричинене наявністю ендogenous біотину в тканинах, активністю репортерних ферментів або перехресною реакцією первинного або вторинного антитіла з неспецифічними білками. Слабе або повністю відсутнє забарвлення зазвичай виникає внаслідок неправильної фіксації тканини або через низький рівень експресії антигену.

Для усунення фону доцільно зменшити концентрацію первинного або вторинного антитіла, змінити тривалість чи температуру інкубації, або скористатися іншою системою детекції чи іншим антитілом. У процесі оптимізації важливо систематично перевіряти усі параметри, що впливають на якість забарвлення.

Обов'язковою частиною контролю якості є використання позитивного контролю (тканини з відомою експресією антигену), негативного контролю (тканини без антигену) та зразка без первинного антитіла або з його попередньо абсорбованим варіантом. Це дозволяє чітко визначити джерело потенційних похибок.

Сфери застосування ІГХ

Клінічна діагностика. ІГХ широко застосовується у клінічній діагностиці, зокрема для виявлення патологічно змінених клітин, таких як пухлинні клітини. У злоякісних новоутвореннях часто спостерігається експресія специфічних пухлинних антигенів, що робить можливим їхнє ідентифікування. Метод дозволяє не лише підтвердити наявність пухлини, а й уточнити її гістогенез і прогноз.

Діагностичні імуногістохімічні маркери. ІГХ є високочутливою та просторово специфічною методикою виявлення білків, що дозволяє точно визначити їх локалізацію у тканинах. Завдяки цій здатності метод став одним із найважливіших інструментів у нейробіології, де дослідники можуть вивчати експресію білків у конкретних ділянках головного мозку. ІГХ також широко застосовується в гістопатології для діагностики пухлин.

Головним недоліком методу є те, що, на відміну від таких методів, як імуноблотинг, ІГХ не дозволяє підтвердити, що забарвлення відповідає саме шуканому білку за молекулярною масою. Тому критично важливо, щоб усі первинні антитіла були попередньо валідовані методом вестерн-блот або подібними підходами.

У хірургічній патології імуногістохімія є незамінною при фенотипуванні пухлин. Наприклад, визначення експресії Е-кадгерину дозволяє розрізняти протокову карциному *in situ* (позитивне фарбування) від лобулярної карциноми *in situ* (відсутність фарбування). Останнім часом ІГХ також активно застосовується в диференціальній діагностиці новоутворень слинних залоз, голови та ший.

У діагностичній практиці застосовуються сотні різних імуногістохімічних маркерів. У великих клініко-діагностичних лабораторіях зазвичай використовується понад 200 антитіл, які мають діагностичне, прогностичне або предиктивне значення.

Ось приклади деяких поширених імуногістохімічних маркерів:

- **BrdU (бромдезоксіуридин)** — маркер проліферуючих клітин, використовується для ідентифікації клітин, що діляться, як у дослідженнях пухлин, так і в нейронауці.
- **Цитокератини** — використовуються для виявлення епітеліальних пухлин (карцином), хоча іноді експресуються і в саркомах.
- **CD15 та CD30** — маркери, що застосовуються при діагностиці хвороби Годжкіна.
- **Альфа-фетопротейн (AFP)** — специфічний для пухлин жовткового мішка та гепатоцелюлярної карциноми.
- **CD117 (KIT)** — використовується при діагностиці гастроінтестинальних стромальних пухлин (GIST) та пухлин огрядних клітин.
- **CD10 (CALLA)** — маркер для діагностики нирково-клітинного раку та гострого лімфобластного лейкозу.
- **Простат-специфічний антиген (PSA)** — ключовий маркер раку передміхурової залози.
- **Рецептори естрогену (ER) та прогестерону (PR)** — використовуються як для діагностики пухлин молочної залози та жіночої репродуктивної системи, так і як прогностичні та предиктивні маркери відповіді на гормональну терапію.
- **CD20** — специфічний маркер В-клітинних лімфом.
- **CD3** — маркер Т-клітинних лімфом.
- **Коктейль PIN-4 (p63, CK5, CK14, AMACR/P504S)** — використовується для розмежування аденокарциноми передміхурової залози від доброякісної тканини.

Фундаментальні біомедичні дослідження. Також ІГХ активно використовується у фундаментальних біомедичних дослідженнях для аналізу локалізації, розподілу та експресії біомаркерів, а також різноманітних протеїнів у різних ділянках тканини. Це дозволяє досліджувати тканинну специфічність білкових комплексів, молекулярні сигнатури хвороб і шляхи клітинної сигналізації.

Побудова карти експресії білків. ІГХ також активно використовується для загального білкового профілювання, за умов наявності добре валідованих антитіл. Важливою ініціативою є Human Protein Atlas — глобальна база даних, що демонструє локалізацію білків у тканинах нормальних органів і пухлин людини.

Поєднання ІГХ з тканинними мікрочіпами (англ. tissue microarrays) дає змогу аналізувати експресію великої кількості білків у різних типах тканин. Такий підхід активно застосовується при дослідженні найпоширеніших форм людських пухлин, дозволяючи створити детальну карту тканинної експресії з потенційним діагностичним, прогностичним або терапевтичним значенням.

Автоматизація імуногістохімічного аналізу

Автоматизація ІГХ аналізу є важливим етапом у підвищенні стандартизації, відтворюваності та ефективності діагностичних і дослідницьких процедур. У сучасній лабораторній практиці автоматизовані системи дозволяють виконувати повний цикл ІГХ-аналізу — від депарафінізації до візуалізації результату — з мінімальним втручанням оператора.

Автоматичні імуногістостайнери (наприклад, Ventana BenchMark, Dako Autostainer, Leica Bond) здійснюють точне дозування реагентів, контроль температури, часу інкубації та промивання, що суттєво знижує ризик людської помилки. Такі системи підтримують різноманітні протоколи і дають змогу паралельно обробляти десятки зразків, що значно пришвидшує обробку біоматеріалу у великих діагностичних центрах.

Автоматизація також сприяє уніфікації результатів, що критично важливо для клінічної діагностики, особливо при оцінці експресії біомаркерів (наприклад, HER2, p53, Ki-67, PD-L1). У поєднанні з цифровою патологією та програмами з аналізу зображень автоматизовані системи дають змогу проводити кількісну оцінку рівня експресії маркерів та формувати об'єктивні діагностичні висновки.

Таким чином, автоматизація ІГХ підвищує ефективність, точність і масштабованість досліджень, водночас покращуючи якість діагностики та зменшуючи витрати часу і ресурсів.

Практична частина

Тема. Проведення імуногістохімічного дослідження експресії білка p53

Матеріали: гістологічні зрізи парафінових блоків тканин (людських або тваринних); первинні антитіла до білка p53 (моноклональні або поліклональні, наприклад, clone DO-7); вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому (HRP); буфер PBS; блокуючий розчин (5% BSA або нормальна сироватка тварин у PBS); субстрат для пероксидази (наприклад, DAB); гематоксилін для контрастного

фарбування; монтажне середовище; дистильована вода, спирти різної концентрації, ксилол.

Обладнання: водяна баня; мікромом; термостат або сушильна шафа; мікроскопічні предметні і покривні скельця; світловий мікроскоп; піпетки з наконечниками; ємності для фарбування; ЗІЗ: халат, рукавички, окуляри.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть ІГХ-аналізу на білок р53.

Принцип методу. Імуногістохімія – це метод, що базується на специфічному зв'язуванні антитіл із білками-мішенями у тканинах. Візуалізація здійснюється за допомогою вторинних антитіл, мічених ферментами (HRP), які каталізують реакцію утворення кольорового продукту (наприклад, з DAB), або флуорофорами. Метод дозволяє локалізувати білок у контексті клітинної структури.

Клінічне значення. ІХА дозволяє швидко і без використання лабораторного обладнання виявити наявність антигену SARS-CoV-2 у пацієнта на ранніх етапах захворювання. Метод широко використовується для скринінгу, епідагляду та попередньої діагностики COVID-19 у клінічних і позаклінічних умовах.

Хід роботи

1. Підготовка зрізів. Нарізати парафінові блоки на зрізи товщиною 4–5 мкм. Нанести зрізи на предметні скельця та висушити при 60°C.

2. Депарафінізація та регідратація. Обробити зрізи ксилолом (2×5 хв). Провести дегідратацію у низхідному ряді спиртів (100%, 96%, 70%). Промити у дистильованій воді.

3. Антигенна демаскація. Проводити у цитратному буфері (рН 6.0) у водяній бані або мікрохвильовій печі.

4. Блокування ендогенної пероксидазної активності. Інкубувати зрізи з 3% розчином H₂O₂ (10 хв при кімнатній температурі).

5. Блокування неспецифічного зв'язування. Інкубувати з 5% BSA або нормальною сироваткою (20 хв при кімнатній температурі).

6. Інкубація з первинними антитілами. Нанести анти-р53 (у відповідному розведенні) на зрізи та інкубувати 1 год при кімнатній температурі або ніч при +4°C.

7. Промивання. 3×5 хв у PBS.

8. Інкубація з вторинними HRP-кон'югованими антитілами. Інкубувати 30 хв, потім промити PBS.

9. Візуалізація. Нанести субстрат DAB, інкубувати до появи бурого забарвлення (2–10 хв), промити водою.

10. Контрастне фарбування. Обробити гематоксиліном (1–2 хв), промити, дегідратувати та змонтувати.

Завдання 2. Оцінка результатів

✓ Провести мікроскопічне дослідження зрізів.

- ✓ Визначити наявність та інтенсивність забарвлення ядра клітин.
- ✓ Заповнити таблицю результатів.

Таблиця 15. Результати оцінки експресії білка p53 у досліджуваних зразках

Зразок	Інтенсивність забарвлення	Локалізація білка p53	Коментар
1			
2			
3			

Пояснення до таблиці:

• **№ зразка** – порядковий номер досліджуваного гістологічного препарату (наприклад, контроль, патологічна тканина 1, тканина з підозрою на пухлину тощо).

• **Інтенсивність забарвлення** – оцінюється візуально під мікроскопом:

- (–) – немає забарвлення (експресія відсутня)
- (+) – слабка експресія
- (++) – помірна експресія
- (+++) – висока експресія

• **Локалізація білка p53** – вказати, де саме виявлено сигнал:

- Ядерна (основна локалізація для p53)
- Цитоплазматична (може свідчити про порушення транспорту)
- Відсутня

Коментар – власні зауваження студента щодо можливих особливостей, артефактів, додаткова інтерпретація (наприклад, "підозра на неопластичний процес", "неоднорідне забарвлення", "можлива деградація").

Завдання 3. Формулювання висновків

На основі мікроскопічного аналізу та таблиці результатів:

- Порівняти експресію p53 у різних зразках.
- Зробити висновки щодо можливих змін у тканинах (наприклад, гіперплазія, неоплазія, контрольна тканина).
- Оцінити застосовність ІГХ як інструменту в патоморфологічній діагностиці.

Контрольні питання

1. У чому полягає принцип імуногістохімічного аналізу і яка роль антитіл у цьому процесі?
2. Які типи зразків використовують для проведення ІГХ і які етапи включає їх підготовка?
3. Яка мета етапу відновлення антигенів у формалін-фіксованих тканинах і якими методами його здійснюють?
4. Що таке блокування неспецифічного зв'язування і які реагенти використовуються для цього етапу?
5. Порівняйте прямий і непрямий методи імуногістохімічного мічення за чутливістю, специфічністю та складністю.
6. Які типи антитіл (поліклональні vs моноклональні) застосовуються в ІГХ і які їх переваги в різних типах досліджень?

7. Які репортерні молекули найчастіше використовуються в ІГХ і якими є методи візуалізації сигналу?
8. Назвіть типові причини фонові реакції або слабкого забарвлення у ІГХ та способи їх усунення.
9. Яке значення має контрзабарвлення у ІГХ і який барвник застосовується найчастіше для цієї мети?
10. У чому полягають переваги автоматизації ІГХ-аналізу для діагностичної практики та наукових досліджень?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Імуноцитохімія (ІЦХ)

Мета: ознайомитися з теоретичними основами імуноцитохімічного аналізу, принципами специфічної взаємодії антитіл з антигенами та методами візуалізації білків у клітинах; засвоїти правила підготовки зразків до ІЦХ-дослідження, включаючи фіксацію, пермеабілізацію та інкубацію з антитілами; опрацювати практичні навички виявлення специфічних білків у зрізах рослинних тканин за допомогою ІЦХ-методу, а також навчитися інтерпретувати результати мікроскопічного аналізу; поглибити розуміння застосування ІЦХ у біомедичних і біотехнологічних дослідженнях, зокрема у діагностиці, аналізі клітинного складу та вивченні локалізації білків.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика імуноцитохімічного аналізу.
2. Підготовка зразків до проведення імуноцитохімічного аналізу.
3. Методика і техніка проведення імуноцитохімічного аналізу.
4. Приклади застосування імуноцитохімічного аналізу.

Загальна характеристика імуноцитохімічного аналізу

Імуноцитохімія (ІЦХ або англ. immunocytochemistry, ICC) — це поширений лабораторний метод, який використовується для анатомічної візуалізації локалізації певного білка або антигену в клітинах шляхом застосування специфічного первинного антитіла, що зв'язується з ним. Візуалізація білка здійснюється за допомогою вторинного антитіла, кон'югованого з флуорофором, яке зв'язується з первинним антитілом, що дає змогу дослідити зразок під флуоресцентним мікроскопом. ІЦХ дозволяє дослідникам оцінити, чи експресують клітини досліджуваного зразка відповідний антиген. У разі виявлення позитивного імунного сигналу метод також дає змогу визначити, у яких субклітинних компартментах відбувається експресія даного антигену.

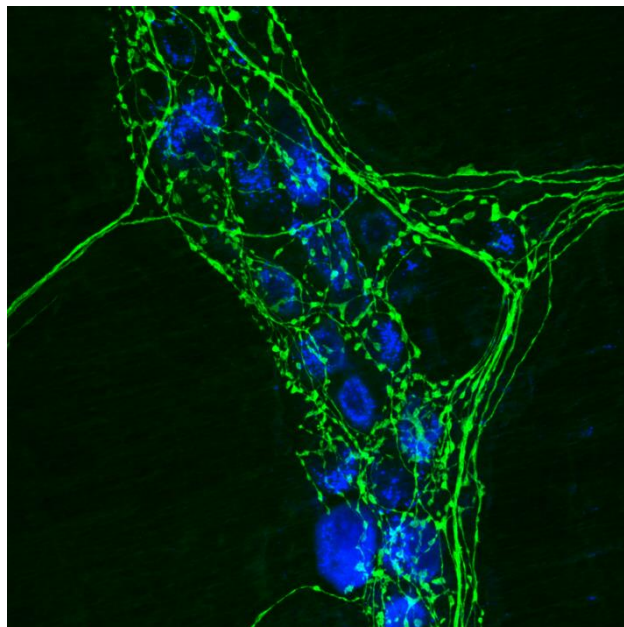


Рис. 36. Імуноцитохімічне маркування тирозингідроксилази (ТН, зелений колір) в аксонах симпатичних автономних нейронів у складі місентерального ганглія миші (джерело: <https://en.wikipedia.org/wiki/Immunocytochemistry>)

Зображення отримане за допомогою лазерного сканувального конфокального мікроскопа. Синій флуоресцентний сигнал відповідає автофлуоресценції постгангліонарних нейронів у ультрафіолетовому діапазоні.

ІЦХ vs. ІГХ. ІЦХ відрізняється від ІГХ тим, що проводиться на зразках інтактних клітин, з яких було видалено більшість або всю позаклітинну матрицю. До таких зразків належать індивідуальні клітини, ізольовані з твердих тканин, клітини, вирощені в культурі, клітини, осаджені з суспензії, або клітини зі змащених препаратів. Натомість об'єктом ІГХ є зрізи біологічних тканин, у яких кожна клітина зберігає своє мікрооточення, включаючи міжклітинний матрикс та інші клітини, характерні для даної тканини.

ІЦХ — це метод виявлення наявності специфічного білка або антигену в клітинах (у культурі, суспензіях), що базується на зв'язуванні специфічного антитіла з цільовим антигеном і подальшій візуалізації під мікроскопом. Цей метод є цінним інструментом для аналізу клітинного складу окремих клітин.

Підготовка зразків до проведення імуноцитохімічного аналізу

До типових зразків, придатних для ІЦХ, належать мазки крові, аспірати, змиви, культури клітин і клітинні суспензії. Існує багато методів підготовки клітин до ІЦХ, і кожен із них має свої переваги та особливості. Вибір методу залежить від типу зразка та цілей дослідження.

Клітини, які підлягають фарбуванню, можуть бути зафіксовані на твердому носії для полегшення наступних етапів обробки. Це може бути досягнуто кількома способами: адгезивні клітини вирощують на предметних скельцях, покривних скельцях або на прозорих пластикових поверхнях. Клітини із суспензій можна осадити центрифугуванням на скло (цитоспін), зафіксувати хімічними лінкерами або, в окремих випадках, досліджувати у вигляді суспензії.

Концентровані клітинні суспензії в середовищах з низькою в'язкістю придатні для приготування мазків. Розбавлені суспензії краще готувати за допомогою цитоспінування, а високов'язкі суспензії — методом взяття мазків тампоном. Незалежно від методу, клітини наносяться повністю, зберігаючи свою структуру. Для забезпечення реакції між імуноглобулінами та внутрішньоклітинними антигенами необхідно подолати цілісну клітинну мембрану. Виявлення ядерних антигенів є складнішим, а присутність позаклітинної рідини може створювати додаткові перешкоди в ІЦХ. Тому часто використовують пермеабілізацію мембран за допомогою детергентів (наприклад, Triton X-100 або Tween-20) або фіксацію органічними розчинниками (ацетон, метанол, етанол).

Інформативність та чутливість методу. Антитіла є ключовим інструментом для визначення як наявності антигену, так і його субклітинної локалізації. Імуноцитохімічне фарбування є високочутливим методом: у разі локалізованої експресії антигену воно здатне виявляти навіть декілька тисяч молекул антигену на клітину. У деяких випадках ІЦХ можна також використовувати для приблизної оцінки концентрації антигену за допомогою систем цифрового аналізу зображень.

Методика і техніка проведення імуноцитохімічного аналізу

Імуноцитохімічний аналіз зазвичай виконується в чотири послідовні етапи.

На *першому етапі* клітини висівають на тверду поверхню, якою зазвичай слугує предметне скло або планшет із скляним дном. Залежно від типу клітин і методу висіву, перед проведенням імунного фарбування може бути необхідним період інкубації. У випадку адгезивних клітин, протягом інкубації (від 30 хвилин до 24 годин для різних типів клітин) відбувається прикріплення клітин до поверхні носія.

На *другому етапі* проводиться імунне фарбування, що включає фіксацію, пермеабілізацію та інкубацію з антитілами. **Фіксація** забезпечує збереження білків у їхньому внутрішньоклітинному розташуванні, а також хімічного і структурного стану на момент фіксації. Вона може здійснюватися шляхом створення ковалентних зшивок (crosslinking) або шляхом осадження білків із використанням органічних розчинників. **Пермеабілізація** передбачає порушення цілісності клітинних мембран за допомогою розчинників або детергентів, що дозволяє великим молекулам антитіл проникати в клітину. Пермеабілізація потребує попередньої фіксації, тому метод застосовується лише для дослідження фіксованих (нежиттєздатних) клітин. **Інкубація з антитілами** полягає у зв'язуванні специфічних антитіл із відповідними внутрішньоклітинними антигенами, після чого незв'язані антитіла змиваються буфером.

На *третьому етапі* здійснюється візуалізація клітин і локалізації антитіл, зв'язаних із мішеневими антигенами, за допомогою мікроскопії. Зображення реєструють за допомогою камери або іншого детектора.

На *четвертому, завершальному етапі*, отримані зображення аналізують і здійснюють анотацію внутрішньоклітинних структур.

Рисунок 37 демонструє типовий робочий процес ІЦХ із використанням флуоресцентного маркера.

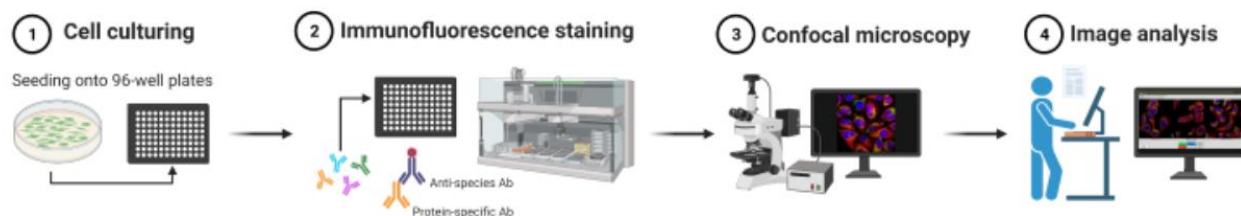


Рис. 37. Чотири основні етапи імуноцитохімії: (1) вирощування клітин, (2) імунофлуоресцентне фарбування, (3) отримання зображень методом конфокальної мікроскопії, (4) аналіз зображень (джерело: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunocytochemistry>)

Репортерні системи. Як і в ІГХ, в ІЦХ існує кілька типів репортерних систем (Таблиця 1). Однією з них є використання антитіл, зв'язаних із ферментами. Після додавання відповідного субстрату фермент каталізує реакцію, у результаті якої утворюється забарвлений продукт у місці зв'язування антитіла з антигеном у клітині. Наприклад, поширено використовуваний фермент пероксидаза хрому (HRP) перетворює 3,3'-діамінобензидин (англ. 3,3'-diaminobenzidine, DAB) у коричневий осад, який візуалізується за допомогою світлової мікроскопії.

Таблиця 16. Приклади різних типів репортерів

Тип репортера	Приклад репортера	Візуалізація	Специфічність
Антитіло, зв'язане з ферментом	Антитіло-пероксидаза + DAB	Коричнєве забарвлення	Антиген
Антитіло з флуорофором	Антитіло-СуЗ	Збудження зеленим / випромінювання жовтим	Антиген
Біоспецифічна флуоресцентна молекула	DAPI	Збудження УФ / випромінювання синім	ДНК

Інший тип репортерів — флуорофори. Ці молекули тимчасово збуджуються до вищого енергетичного стану при поглинанні світла певної довжини хвилі, після чого повертаються в основний стан із випромінюванням світла довшої довжини хвилі. Для збудження та детекції таких сигналів використовується флуоресцентний мікроскоп.

Оскільки різні флуорофори збуджуються та випромінюють світло при різних довжинах хвиль, можна комбінувати кілька флуорофорів із різними спектральними характеристиками в одному зразку. Це дозволяє отримувати багатокольорові зображення, де кожен колір відповідає окремому мішеневому антигену. Проте кількість флуорофорів у зразку обмежена через можливе спектральне перекривання сигналів, що ускладнює їх відокремлення при аналізі.

Крім антитіл, мічених флуорофорами, використовуються також флуоресцентні молекули, що самостійно зв'язуються з певними мішенями. Наприклад, 4',6-діамідино-2-феніліндол (англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole,

DAPI) — флуоресцентний барвник, що зв'язується з ДНК і широко використовується для візуалізації ядер клітин. DAPI збуджується ультрафіолетовим світлом та випромінює в синьому спектрі.

Важливе зауваження: при використанні флуорофорів необхідно враховувати явище фотознебарвлення (англ. bleaching) — поступове зменшення інтенсивності сигналу при тривалому опроміненні зразка світлом. Це може обмежувати час спостереження та якість отриманих зображень.

Пряма та непряма детекція. Метод детекції в імуноцитохімії може бути або прямим, або непрямим.

Прямий метод передбачає використання первинного антитіла, яке безпосередньо зв'язується з цільовою молекулою (антигеном) і вже має приєднаний репортер (наприклад, флуорофор або фермент). Такий підхід забезпечує швидке й специфічне виявлення. Проте він зазвичай має недостатню чутливість для більшості білків, оскільки їх кількість у клітині може бути недостатньою для генерації сильного сигналу.

Непрямий метод використовує немічене первинне антитіло для розпізнавання антигену, а потім — мічене вторинне антитіло, яке зв'язується з первинним. Завдяки тому, що до одного первинного антитіла може приєднуватися декілька вторинних, непрямий метод забезпечує підсилення сигналу і є більш чутливим.

Перевагами непрямого методу є:

- вища чутливість через ефект підсилення сигналу;
- можливість гнучко комбінувати різні первинні й вторинні антитіла;
- універсальність: одне й те саме вторинне антитіло може бути використане для виявлення всіх первинних антитіл, отриманих від одного виду (наприклад, миші або кроля).

Недоліками є:

- більша тривалість та складність протоколу;
- ризик неспецифічного зв'язування вторинного антитіла, що потребує ретельного блокування.

Існує багато методів імунологічної детекції антигенів у тканинах, які базуються на застосуванні первинних антитіл або антисироваток.

До найбільш поширених субстратів (**хромогенів**) належать:

- DAB (3,3'-Діамінобензидин),
- АЕС (3-Аміно-9-етилкарбазол).

Використання цих реагентів у поєднанні з відповідними ферментами дозволяє отримати позитивну імуноцитохімічну реакцію, яка чітко локалізує антиген у клітині.

Імуноцитохімічна візуалізація є особливо цінною у випадках, коли менш специфічні методи фарбування, як-от гематоксилін-еозин (H&E), не забезпечують достатньої інформації для діагнозу або коли потрібна додаткова прогностична інформація (наприклад, при оцінці пухлин).

Інший варіант — використання флуоресцентно мічених вторинних антитіл, які ковалентно зв'язані з флуорохромами, такими як:

- FITC (ізотіоціанат флуоресцеїну),
- Rhodamine (родамін).

Ці мітки детектуються за допомогою флуоресцентного або конфокального мікроскопа. Локалізація флуоресценції залежить від типу мішені: вона буде поверхневою для мембранних білків та внутрішньоклітинною — для цитоплазматичних або ядерних білків.

Приклади застосування імуноцитохімічного аналізу

ІЦХ широко використовується в сучасних біомедичних дослідженнях, молекулярній діагностиці, клінічній патології та фармацевтичних розробках. Його основна мета — виявлення та візуалізація специфічних білків або антигенів у межах окремих клітин за допомогою специфічних антитіл. Наведемо основні напрями практичного застосування ІЦХ:

Ідентифікація клітинних типів. ІЦХ дозволяє точно визначати фенотип клітин на основі експресії маркерних білків. Наприклад, у імунології можна розрізнити CD4⁺ Т-хелпери і CD8⁺ цитотоксичні Т-клітини, в нейробіології — дофамінергічні нейрони за маркером тирозингідроксилази, а в онкології — пухлинні клітини епітеліального походження за цитокератинами.

Дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків. ІЦХ дозволяє визначити, у якому саме компартменті клітини (ядро, цитоплазма, мембрана, органела) локалізується білок. Це критично важливо для розуміння функції білка, його участі у сигнальних шляхах, клітинному циклі або апоптозі.

Онкологічна діагностика і прогностична оцінка. ІЦХ застосовується у клінічній патології для виявлення пухлинних маркерів (наприклад, HER2/neu, p53, Ki-67); оцінки проліферативного статусу пухлини; диференціації між різними видами новоутворень або метастазів.

Дослідження вірусної інфекції. Метод дає змогу виявити вірусні антигени у заражених клітинах, наприклад, при інфекціях герпесвірусами, вірусом грипу або SARS-CoV-2. Це дозволяє досліджувати механізми реплікації вірусу, ураження клітин та ефективність противірусних засобів.

Скринінг та оцінка дії лікарських засобів. ІЦХ широко застосовується у фармакології та токсикології для виявлення змін експресії білків-мішеней під дією препаратів; вивчення токсичних ефектів на клітини; дослідження механізмів дії нових молекул у культурі клітин.

Нейробіологічні дослідження. ІЦХ є важливим методом у вивченні мозку, зокрема для маркування нейрональних популяцій; дослідження нейротрансмітерних систем; вивчення змін при нейродегенеративних захворюваннях (наприклад, хворобі Альцгеймера).

Аналіз імунної відповіді та запальних процесів. ІЦХ дає змогу виявити продукцію цитокінів, хемокинів, ферментів або рецепторів, пов'язаних з імунною відповіддю, як у дослідженнях *in vitro*, так і в зразках пацієнтів.

Створення клітинних моделей захворювань. ІЦХ є незамінним у валідації експресії специфічних маркерів у клітинних моделях, включаючи лінії стовбурових клітин, моделі диференціації або трансфекції.

У проєкті Human Protein Atlas метод імуноцитохімії з флуоресцентною візуалізацією (ICC-IF) застосовується для дослідження субклітинної локалізації білків (Barbe L та ін., 2008). Для кожного досліджуваного білка проводять

фарбування у трьох різних лініях клітин людини, вирощених *in vitro*. Зазвичай використовують антитіла, створені в межах проєкту Human Protein Atlas.

Клітини фіксуються параформальдегідом, пермеабілізуються Triton X-100, і далі фарбуються за допомогою непрямої імуофлуоресценції (Stadler C та ін., 2010).

Крім основного антитіла до цільового білка, використовуються:

- антитіло-маркер до ендоплазматичного ретикулуму;
- антитіло-маркер до мікротрубочок.

Ядро додатково забарвлюється за допомогою DAPI, що зв'язується з ДНК і світиться у синьому спектрі при УФ-опроміненні.

Зображення отримуються за допомогою конфокального лазерного мікроскопа, оснащеного об'єктивом із зануренням у масло ($\times 63$). Далі проводиться ручна анотація результатів з метою опису субклітинної локалізації та особливостей забарвлення.

Кожному варіанту локалізації присвоюється оцінка надійності, яка враховує як внутрішню валідацію антитіла, так і зовнішні експериментальні дані. На завершення здійснюється експертний перегляд субклітинної локалізації, який враховує результати з використанням одного або кількох антитіл до того самого білка.

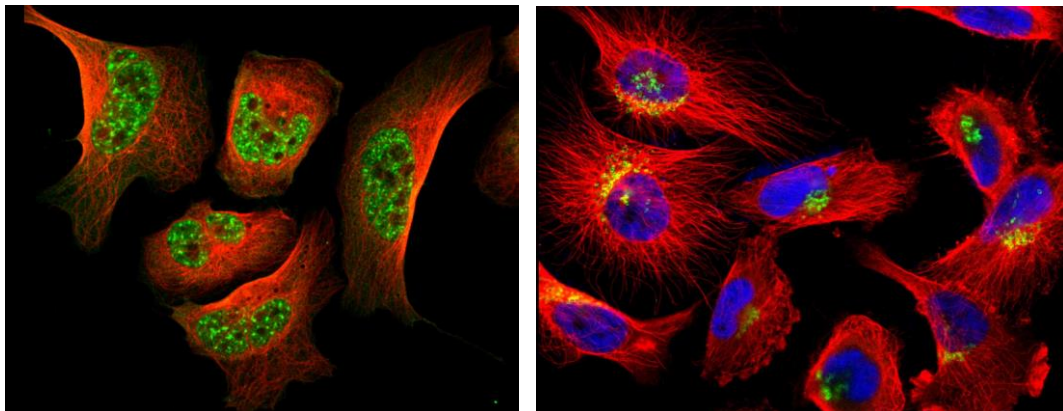


Рис. 38. (А) Білок RBM25, що містить мотив зв'язування з РНК, локалізується у ядерних спеклах (зелений сигнал). Мікротрубочки позначені червоним; (Б) білок Golgin B1 (GOLGB1) локалізується в апараті Гольджі (зелений сигнал). Мікротрубочки забарвлені в червоний колір, а ядро — в синій (DAPI) (джерело:

<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunocytochemistry>)

Загалом, ІЦХ є потужним і гнучким методом для якісної та кількісної оцінки експресії білків, дозволяючи поєднати морфологічний аналіз клітин з високоспецифічним молекулярним детектуванням.

Практична частина

Тема. Виявлення специфічних білків у зрізах рослинних тканин за допомогою імуоцитохімічного дослідження

Матеріали: рослинні зразки (наприклад, листки *Arabidopsis thaliana* або *Nicotiana tabacum*); первинні антитіла (наприклад, до білка Rubisco або GFP); вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому (HRP) або флуорофором

(наприклад, Alexa Fluor 488); буфер PBS; блокуючий розчин (1–5% BSA в PBS); розчин для фіксації (4% параформальдегід); детергент (0.1% Triton X-100 у PBS); мікроскопічні предметні скельця і покривні скельця; монтажне середовище (для флуоресцентної мікроскопії – з DAPI).

Обладнання: ламінарна шафа або стерильне робоче місце; флуоресцентний або світловий мікроскоп; мікропіпетки з наконечниками; вологі камери або планшети для інкубації; таймер; холодильник +4°C та морозильна камера -20°C; водяна баня; предметні скельця, скальпель або мікротом; рукавички, халат, захисні окуляри.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть виявлення специфічних білків у зрізах рослинних тканин за допомогою ІЦХ.

Принцип методу. ІЦХ – це метод, який дозволяє виявити специфічні білки або антигени у клітинах і тканинах за допомогою антитіл. Після фіксації і проникнення антитіла зв'язуються з цільовими білками. Вторинні антитіла, мічені ферментом або флуорофором, дозволяють візуалізувати локалізацію специфічного білка за допомогою світлової або флуоресцентної мікроскопії.

Клінічне і біотехнологічне значення. ІЦХ дозволяє локалізувати білки в тканинах, вивчати просторову експресію, діагностувати патології, аналізувати генну активність у трансгенних рослин, досліджувати стресові реакції тощо.

Хід роботи

1. Підготовка тканинних зрізів. Зібрати свіжий зразок рослини. Виготовити тонкі зрізи листкової тканини (вручну або за допомогою мікромата). Зафіксувати зрізи у 4% розчині параформальдегіду протягом 30 хв при кімнатній температурі. Промити зрізи тричі у PBS (по 5 хв).

2. Пермеабілізація та блокування. Інкубувати зрізи 10 хв у 0,1% Triton X-100 для підвищення проникності. Промити у PBS. Інкубувати зразки 30 хв у блокуючому розчині (5% BSA) для запобігання неспецифічного зв'язування.

3. Інкубація з антитілами. Додати розведені первинні антитіла та інкубувати вологій камері 1 год (або ніч при 4°C). Промити 3× по 5 хв PBS. Додати вторинні мічені антитіла (флуоресцентні або HRP) і інкубувати 1 год. Промити PBS.

4. Візуалізація результатів. Помістити зразки на предметне скло, додати монтажне середовище. Покрити покривним скельцем. Дослідити зразки під мікроскопом (залежно від мітки – світловим або флуоресцентним).

5. Оцінка результатів. Зафіксувати наявність або відсутність сигналу. Зробити фотографії позитивних та негативних результатів. Порівняти локалізацію білка з відомими даними або контрольною пробою (без первинного антитіла).

Таблиця 17. Реєстрація результатів імуноцитохімічного аналізу:
наявність сигналу та локалізація білка-мішені

Зразок	Білок-мішень	Первинне антитіло	Вторинне антитіло	Сигнал (+/-)	Локалізація	Примітки

Завдання 2. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи було виявлено специфічний білок у зрізах рослинної тканини? Опишіть, чи було зафіксовано специфічне забарвлення, у яких клітинах або тканинах воно спостерігалось.

2. Як оцінити якість проведеного імуноцитохімічного аналізу? Врахуйте інтенсивність сигналу, рівень фону, специфічність реакції, наявність контролів.

3. Яке біологічне значення має виявлений білок у контексті досліджуваної тканини? Поясніть можливу функцію білка в цій тканині, якщо відома його роль (наприклад, фотосинтез, регуляція росту, стресовий білок).

4. Що вплинуло на ефективність і точність результату? Оцініть чинники, які могли знизити якість реакції (наприклад, тривале зберігання реагентів, неправильне розведення, недостатня інкубація, перехресна реактивність).

5. Сформулюйте короткий висновок щодо ефективності ІЦХ для вивчення білків у рослинах. Оцініть перспективи використання ІЦХ у біотехнології, фізіології рослин або молекулярній біології.

Контрольні питання

1. У чому полягає принцип імуноцитохімічного аналізу та як забезпечується специфічність виявлення антигену в клітині?

2. Яка ключова відмінність між ІЦХ та ІГХ за типом зразків і дослідницькими завданнями?

3. Які основні етапи включає стандартний протокол проведення імуноцитохімічного аналізу, та яка роль кожного з них?

4. Які методи пермеабілізації застосовуються для проникнення антитіл усередину клітин, і в яких випадках вони є необхідними?

5. Чим характеризуються різні типи репортерних систем, що застосовуються в ІЦХ, та як вони впливають на чутливість і візуалізацію результатів?

6. У яких випадках доцільніше застосовувати прямий метод детекції в ІЦХ, а коли — непрямий, і чим вони відрізняються за ефективністю?

7. Які типи клітинних зразків найчастіше використовуються в ІЦХ і які фактори визначають вибір методу їх підготовки?

8. Які переваги та обмеження має використання флуорофорів у порівнянні з ферментативними системами у візуалізації антитіл?

9. Назвіть основні сфери застосування ІЦХ у біомедичних дослідженнях і клінічній практиці та наведіть приклади маркерів для кожної з них.

10. Які чинники можуть впливати на інформативність та точність результатів імуноцитохімічного аналізу?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №16. Імунопреципітація хроматину (англ. Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)

Мета: ознайомитися з принципами, різновидами та практичним значенням методу імунопреципітації хроматину (ChIP) як ключового інструменту для дослідження білок-ДНК взаємодій *in vivo*; вивчити сучасні модифікації ChIP-аналізу, їх переваги та обмеження; набутти практичних навичок проведення експерименту з виявлення взаємодії білків із регуляторними ділянками ДНК у тканинах *Arabidopsis sp.* за допомогою класичного протоколу ChIP.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика і принцип методу ChIP.
2. Різновиди, порівняння і застосування методу ChIP.
3. Сучасні модифікації методу ChIP.
4. Обмеження методу ChIP.

Загальна характеристика і принцип методу ChIP

Імунопреципітація хроматину (англ. chromatin immunoprecipitation ChIP) — це експериментальна методика, заснована на імуноопреципітації, яка застосовується для вивчення взаємодії між білками та ДНК у клітині. Основною метою ChIP є виявлення зв'язування певних білків — зокрема транскрипційних факторів — із визначеними регіонами геному, такими як промотори або інші послідовності зв'язування з ДНК. Крім того, метод дозволяє ідентифікувати ділянки геному, з якими асоційовані специфічні гістонові модифікації, що дає змогу локалізувати мішені гістонових модифікаторів та визначати цістроми (сукупність сайтів зв'язування одного транскрипційного фактора в межах геному).

Метод ChIP відіграє ключову роль у розвитку епігеноміки та глибшому розумінні механізмів епігенетичного регулювання.

Історичний огляд. Метод ChIP було вперше розроблено у 1984 році Джоном Лісом та його аспірантом Девідом Гілмором. Вони використали УФ-опромінення як агент ковалентного зшивання білків із ДНК у живих бактеріальних клітинах, що дозволило зафіксувати взаємодії між РНК-полімеразою та ДНК. Після лізису клітин і імуноопреципітації РНК-полімерази, асоційовану ДНК гібридизували з відомими зондами, щоб визначити локалізацію ферменту *in vivo*. Через рік цю ж методологію було застосовано для дослідження полімерази II у дрізофілі на генах теплового шоку, започаткувавши еру ChIP-аналізу у вивченні еукаріотичних організмів.

Згодом Олександр Варшавський і колеги удосконалили метод, застосували фіксацію формальдегідом для дослідження розподілу гістону H4. Незалежно, у 1988 році Хеббс із співавторами описали нативний варіант ChIP (англ. native ChIP, NChIP), що також швидко був вдосконалений.

Класичний протокол ChIP-аналізу потребував 4–5 днів і щонайменше 10^6 – 10^7 клітин, однак нові модифікації дозволяють працювати з 100–1000 клітинами і завершити аналіз за 1 день.

Узагальнений протокол ChIP-аналізу включає такі основні етапи:

1. **Фіксація білок-ДНК взаємодій** у живих клітинах або тканинах шляхом крослінкування (перехресного зшивання), зазвичай із використанням формальдегіду. У нативному варіанті методу ChIP цей етап пропускається.

2. **Фрагментація хроматину** до фрагментів довжиною приблизно 500 пар основ за допомогою ультразвукової обробки (сонікації) або ферментативного гідролізу.

3. **Імуноопреципітація фрагментів хроматину**, що містять цільовий білок, із використанням специфічних антитіл до даного білка.

4. **Очищення зв'язаних із білком фрагментів ДНК** та подальше визначення їх послідовностей (наприклад, шляхом ПЛР, qPCR або секвенування).

Збагачення специфічних регіонів ДНК у преципітаті вказує на ділянки геному, з якими білок досліджуваного інтересу взаємодіє в умовах *in vivo*.

Різновиди, порівняння і застосування методу ChIP

Існує два основних типи методики ChIP, які відрізняються між собою способом підготовки хроматину: це перехресно-зв'язаний ChIP (англ. cross-linked ChIP, XChIP) та нативний ChIP – NChIP.

Метод XChIP

Метод XChIP використовується переважно для ідентифікації сайтів зв'язування транскрипційних факторів та інших білків, асоційованих з хроматином. На початковому етапі хроматин фіксується зворотною ковалентною крос-лінкацією (найчастіше з використанням формальдегіду або ультрафіолетового опромінення). Це дозволяє стабілізувати взаємодії білок-ДНК в умовах *in vivo*.

Після цього хроматин фрагментується — зазвичай ультразвуком (сонікацією), до фрагментів довжиною 300–1000 пар основ. У деяких випадках також застосовують помірну фіксацію формальдегідом із подальшою обробкою нуклеазами.

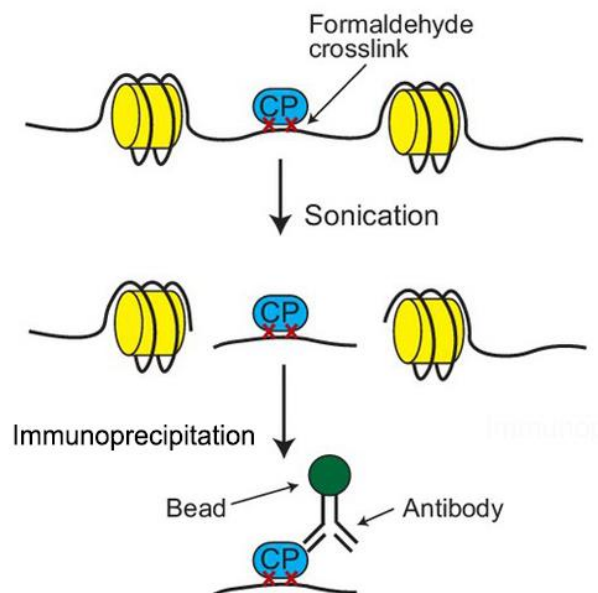


Рис. 39. Узагальнена схема методики проведення XChIP-аналізу (джерело: <https://www.epigentek.com/catalog/chip-protocol-native-cross-linking-n-29.html>)

Наступним етапом є імуноопреципітація фрагментів хроматину, які містять білок-мішень, за допомогою специфічних антитіл, зв'язаних із магнітними кульками, агарозою або сефарозою. Альтернативно застосовують інертні полімерні диски для селективного зв'язування комплексів хроматин–антитіло.

Після промивання преципітованих комплексів від неспецифічно зв'язаних домішок проводиться реверсія крос-лінкування, видалення білків протеїназою К та очищення ДНК. Як альтернативу нативним білкам, у дослідженнях можуть застосовуватися епітоп-марковані білки або біотинільовані білки *in vivo*.

Ідентифікація пов'язаних ділянок ДНК здійснюється методами ПЛР, ДНК-мікрочипів (англ. ChIP-on-chip) або високопродуктивного секвенування (англ. ChIP-seq).

Метод NChIP

Метод NChIP найчастіше застосовується для картування зв'язування гістонових модифікаторів, зокрема — при вивченні гістонових міток. Початковий матеріал — нативний нефіксований хроматин, у якому ДНК вже зв'язана з гістонами в нуклеосомах.

Хроматин фрагментують за допомогою мікрококової нуклеази, яка розщеплює ДНК у ділянках між нуклеосомами, залишаючи цілі нуклеосоми. У результаті отримують фрагменти розміром від одного (≈ 200 п.н.) до п'яти нуклеосом (≈ 1000 п.н.).

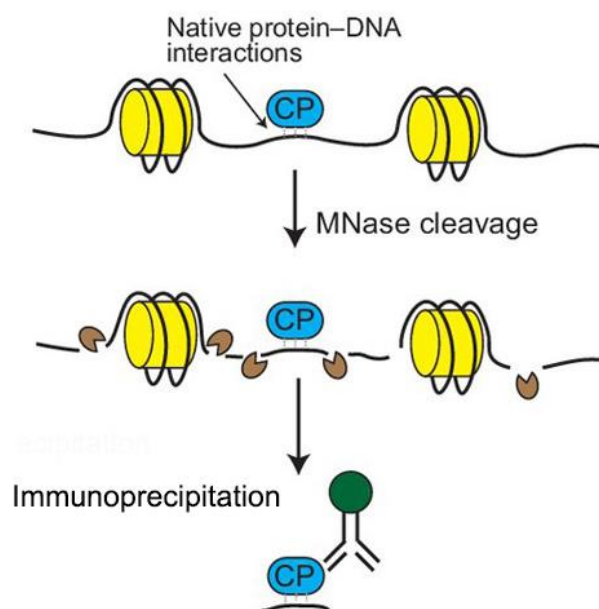


Рис. 40. Узагальнена схема методики проведення NChIP-аналізу (джерело: <https://www.epigentek.com/catalog/chip-protocol-native-cross-linking-n-29.html>)

Подальші етапи аналогічні XChIP: очищення лізату, імуноопреципітація, видалення білків та аналіз ДНК.

Таблиця 18. Порівняння XChIP і NChIP

Параметр	XChIP	NChIP
Тип білків	Транскрипційні фактори, білки хроматину	Гістонові модифікатори
Фіксація	Потрібна (формальдегід, УФ)	Не застосовується
Фрагментація	Сонікація, ферменти	Мікрококова нуклеаза
Довжина фрагментів	300–1000 п.н.	200–1000 п.н.
Специфічність антитіл	Може знижуватись через крос-лінкування	Вища, оскільки без крос-лінкування
Основне застосування	Картування зв'язування транскрипційних факторів	Вивчення гістонових модифікацій

Порівняння ChIP-seq і ChIP-on-chip. ChIP-seq — методика, що дозволяє з високою роздільною здатністю визначати ділянки зв'язування транскрипційних факторів по всьому геному за допомогою високопродуктивного секвенування. Це ключова технологія у функціональній геноміці, що дає змогу зрозуміти, як білки регулюють експресію генів, і є надзвичайно важливою у вивченні механізмів захворювань та епігенетики.

ChIP-on-chip (ChIP-chip) — раніша технологія, яка поєднує ChIP із ДНК-мікрочипами для гібридизації з преципітованими фрагментами. Метод дозволяє виявляти зв'язані з білком ділянки ДНК, проте поступається ChIP-seq за чутливістю, роздільною здатністю та обсягом покриття геному.

Таким чином, обидві методики ChIP — XChIP та NChIP — мають унікальні переваги і застосовуються залежно від типу цільового білка. ChIP-seq залишається «золотим стандартом» у дослідженнях регуляції генів, хоча ChIP-chip все ще використовується в умовах обмежених ресурсів.

Таблиця 19. Переваги та недоліки методів XChIP та NChIP

Метод	XChIP (Cross-linked ChIP)	NChIP (Native ChIP)
Переваги	Підходить для дослідження транскрипційних факторів або інших слабо зв'язаних з хроматином білків. Може застосовуватись для будь-яких організмів, де складно виділити нативний білок.	Можливість перевірки специфічності антитіла. Краща специфічність антитіл, оскільки цільовий білок зберігає нативну структуру. Вища ефективність осадження хроматину та білків завдяки високій специфічності антитіл.
Недоліки	Низька ефективність осадження хроматину через руйнування епітопів білків-мішеней під час фіксації. Можливе виникнення хибнопозитивних результатів через фіксацію транзиторних білків. Широкий розподіл розмірів фрагментів хроматину через випадкове фрагментування при сонікації.	Зазвичай не підходить для дослідження негістонових білків. Під час ферментативного розщеплення можливе вторинне переміщення нуклеосом.

Сучасні модифікації методу ChIP

ChIP без носія (англ. Bead-free ChIP): у цьому новому методі ChIP використовуються диски з інертного пористого полімеру з асоційованим білком А або G у колонках або мікропланшетах. Комплекс хроматин-антитіло вибірково утримується диском і на наступному етапі елююється для подальших досліджень ДНК за допомогою ПЛР і секвенування. Пористе середовище спеціально розроблено для максимізації ефективності захоплення та зменшення неспецифічного зв'язування. Завдяки наявності оптимізованих протоколів цей різновид методу ChIP можна виконати за 5 годин (<https://www.chromatrap.com/technology/>).

CSChIP (від англ. Carrier ChIP, тобто ChIP із додатковим носієм): цей варіант ChIP дозволяє преципітувати хроматин з надзвичайно малої кількості (від 100) клітин. Його характерною особливістю є додавання клітин *Drosophila* як буферного матеріалу для того щоб зменшити втрати під час маніпуляцій. Цей метод потребує використання високоспецифічних праймерів для ампліфікації цільових генів на фоні великого надлишку генів *Drosophila* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527857/>).

Швидкий ChIP (англ. Fast ChIP, qChIP). У цьому протоколі наступні кроки виконуються швидше ніж звичайно (<https://www.nature.com/articles/nprot.2006.27>): ультразвукова обробка пришвидшує зв'язування антитіл з цільовим білком, зменшуючи загальний час потрібний для імунопреципітації, полімерний носій (Chelex-100) використовують для швидшого виділення ДНК. Цей протокол вимагає велику кількість вихідного матеріалу (від $10^6 \sim 10^7$ клітин).

Швидкий і кількісний ChIP (англ. Q2ChIP, Quick and quantitative ChIP): у цьому методі використовується щонайменше 100 000 клітин як вихідний матеріал. Метод підходить для аналізу до 1000 гістонів чи 100 факторів транскрипції. Таким чином, багато зразків хроматину можна готувати паралельно та зберігати, а Q2ChIP можна проводити виконати протягом дня. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17569620/>).

МікроChIP (англ. MicroChIP, μ ChIP): метод був розроблений для аналізу малих популяцій клітин. Однієї тисячі клітин може вистачити для восьми паралельних визначень. Можливий також аналіз невеликих (1 мм^3) зразків біопсій (<https://www.nature.com/articles/nprot.2008.68>).

iChIP (англ. indexing-first chromatin immunoprecipitation): високочутлива техніка, яка зменшує кількість клітин, необхідних для проведення ChIP, шляхом початкового створення унікальних “кодів” (іштрих-кодування) для загального хроматину (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4412442/>).

enChIP (англ. engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation): техніка, яка використовує систему CRISPR/Cas9 для націлювання на певні геномні регіони. Направляюча РНК, комплементарна бажаній геномній ділянці, експресується в поєднанні з міченим, ферментативно неактивним білком Cas9. Потім виконується ChIP з використанням антитіла проти модифікованого Cas9. Ця методика може допомогти оцінити цис- і транс-взаємодіючі хромосомні петлі (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25827874/>).

ChIP-exo: модифікація методу з додаванням етапу розщеплення екзонуклеазою для підвищення роздільної здатності ДНК-сайтів зв'язування білка до однієї пари основ (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36427141/>).

Матриксний ChIP (англ. Matrix ChIP): ця модифікація методу характеризується підвищеною продуктивністю та спрощеною процедурою. Усі етапи виконуються в лунках мікропланшетів без переміщення зразків, що потенційно дозволяє автоматизувати процес. Метод дозволяє проводити 96 аналізів ChIP на гістони та різні ДНК-зв'язані білки за один день (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2241906/>).

ChIP для патологічних досліджень (англ. PAT-ChIP, Pathology-ChIP): ця методика дозволяє досліджувати патологічні зміни у тканинах, фіксованих формаліном і залитих парафіном, і, отже, використовувати архіви патології (навіть ті, яким кілька років) для епігенетичного аналізу та ідентифікації потенційних епігенетичних біомаркерів при тих чи інших патологіях (https://www.researchgate.net/publication/51797895_Chromatin_immunoprecipitation_and_high-throughput_sequencing_from_paraffin-embedded_pathology_tissue/figures?lo=1).

Метод ChIP також застосовується для аналізу у масштабах усього геному шляхом поєднання з технологією мікрочипів (ChIP-on-chip) або секвенуванням другого покоління (ChIP-seq). Крім того, ChIP може бути інтегрований із секвенуванням «paired-end tags» (PET) у методі аналізу хроматинових взаємодій (ChIA-PET) — технології, розробленої для великомасштабного *de novo* аналізу високорівневих структур хроматину.

Обмеження методу ChIP

Метод ChIP, попри свою високу інформативність і широке застосування в епігенетичних дослідженнях, має низку технічних і біологічних обмежень, які слід враховувати при плануванні експериментів:

- необхідність мати специфічні антитіла до кожного білка/транскрипційного фактора або використовувати трансгенні організми з епітоп-маркованими білками,
- обмежена чутливість для вивчення генів із низьким рівнем експресії або в малій кількості клітин,
- не дозволяє розрізнити ізоформи одного білка, якщо антитіла не є строго специфічними.

Практична частина

Тема. Дослідження ДНК-білок взаємодій у тканинах *Arabidopsis sp.* методом ChIP

Матеріали: свіжі зразки *Arabidopsis thaliana*; формальдегід (1% розчин); гліцин (0,125 M); буфер PBS; буфер для лізису ядер; антитіла до транскрипційного фактора (наприклад, до GFP-маркованого білка); магнітні частинки, споряджені антитілами (Protein A/G beads); буфери для промивання (low-salt, high-salt, LiCl, TE); буфер для елюювання ДНК; протеїназа K; набір для очищення ДНК (наприклад, Qiagen); qPCR-реагенти; праймери до цільової ділянки; dNTPs; Taq-полімераза; дистильована вода.

Обладнання: ламінарна шафа; ультразвуковий деструктор (сонікатор); центрифуга; водяна баня; магнітний штатив для сепарації кульок; PCR-циклер (термоциклер); спектрофотометр або флуорометр; електрофоретична система; гель-документуюча система або UV-транслілюмінатор; мікропіпетки з набором стерильних наконечників; захисні засоби (рукавички, халат, захисні окуляри).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть ChIP-процедуру на зразках *A. thaliana*.

Принцип методу. Метод ChIP-PCR дозволяє визначити, чи зв'язується певний білок (наприклад, транскрипційний фактор) з конкретною ділянкою ДНК у клітині. Після фіксації взаємодії в клітині, хроматин фрагментується, і з використанням специфічних антитіл відбувається імунопреципітація комплексу ДНК-білок. Потім з преципітованої ДНК виділяється фрагмент, що аналізується методом PCR.

Клінічне і біотехнологічне значення. Метод ChIP-PCR використовується для виявлення білків, які зв'язуються з ДНК, і таким чином регулюють експресію генів, що особливо важливо у дослідженнях транскрипційних факторів, епігенетики та відповіді рослин на стрес.

Хід роботи

1. Фіксація білок-ДНК взаємодій. Подрібніть листки *Arabidopsis* (≈ 1 г) у рідкому азоті. Додайте 1% формальдегід у PBS — інкубуйте 10 хв для фіксації. Зупиніть реакцію додаванням 0.125 М гліцину, інкубуйте ще 5 хв. Промийте 2-3 рази PBS, осадіть центрифугуванням.

2. Лізис клітин і фрагментація хроматину. Ресуспендуйте осад у ChIP-лізисному буфері. Проведіть сонікацію (наприклад, 6×10 сек імпульсів на льоду) або механічне дроблення — для отримання фрагментів хроматину ~ 200 – 1000 п.н.

3. Імунопреципітація. Додайте специфічні антитіла до білка (напр., анти-GFP). Інкубуйте при 4°C (3–12 годин) з повільним перемішуванням. Додайте магнітні кульки (Protein A/G), інкубуйте ще 1 годину. Промийте 4 типами буферів послідовно (низька сіль, висока сіль, LiCl, TE).

4. Елюювання і зворотна крос-лінкація. Елюйте комплекси білок-ДНК буфером з SDS. Проведіть інкубацію при 65°C протягом 4 год (або ніч), щоб зруйнувати крос-лінки. Очистіть ДНК (фенол-хлороформ або мініколонка).

5. ПЛР-аналіз цільової ділянки. Проведіть PCR з праймерами до відомої цільової послідовності (наприклад, промотор гена X). Використовуйте позитивний контроль (вхідний хроматин) та негативний (без антитіл). Проведіть електрофорез для оцінки наявності ампліфікату.

Завдання 2. Проведіть оцінку отриманих результатів.

Таблиця 20. Результати аналізу взаємодії білка з цільовою ділянкою ДНК методом ChIP-PCR

№	Назва зразка	Наявність ампліфікату (електрофорез)	Інтенсивність смуги (оцінка + / ++ / +++)	Примітка (наприклад,
---	--------------	--------------------------------------	---	----------------------

				специфічність, фоновий сигнал)
1	Вхідний контроль (input DNA)			
2	ChIP з антитілом (anti-GFP)			
3	ChIP без антитіла (нег. контроль)			
4	Позитивний контроль (якщо застосовується)			

Пояснення до таблиці

✓ **Наявність ампліфікату:** позначте «+» або «—» залежно від того, чи спостерігалася смуга на гелі.

✓ **Інтенсивність смуги:** оціни за візуальною шкалою:

- + – слабка смуга
- ++ – помірна
- +++ – інтенсивна

Примітка: додайте інформацію про специфічність, наявність неспецифічного зв'язування або артефактів.

Завдання 3. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи було виявлено взаємодію білка з цільовою ДНК-послідовністю? Проаналізуйте наявність ампліфікату в зразках після ChIP. Укажіть, у яких фракціях він спостерігався (ChIP з антитілом, input, негативний контроль). Які це може мати функціональні наслідки?

2. Як оцінити якість проведеного ChIP-аналізу? Врахуйте наявність/відсутність сигналу в негативному контролі, інтенсивність ампліфікації у позитивному контролі, специфічність праймерів, якість ДНК та ефективність імунопреципітації.

3. Яке біологічне значення має досліджуваний білок та його зв'язування з ДНК? Опишіть роль цього транскрипційного фактора або білка в регуляції генів у тканинах *Arabidopsis sp.* (наприклад, участь у відповіді на стрес, розвитку, фотоморфогенезі тощо).

4. Які фактори могли вплинути на ефективність експерименту? Проаналізуйте технічні аспекти: якість фіксації, ступінь перехресного зв'язування, специфічність антитіл, температура інкубації, кількість праймерів, точність етапу промивання, якість електрофорезу.

5. Сформулюйте висновок щодо використання ChIP для вивчення ДНК-білок взаємодій у рослинах. Оцініть метод як інструмент у молекулярній біології, функціональній геноміці та біотехнології. Які перспективи його застосування для розробки трансгенних рослин або вивчення регуляції генів?

Контрольні питання

1. У чому полягає основний принцип методу ChIP та які його ключові етапи?

2. Яка мета застосування ChIP у дослідженні транскрипційних факторів і гістонових модифікацій?
3. Які переваги має використання перехресного зшивання білків із ДНК у методі XChIP?
4. Чим відрізняються методи XChIP та NChIP за механізмом підготовки хроматину?
5. Яким чином формується комплекс хроматин–антитіло під час імуноопреципітації, і які типи носіїв для цього використовуються?
6. Які методи аналізу фрагментів ДНК застосовуються після ChIP-преципітації?
7. У яких випадках доцільніше використовувати метод NChIP, а не XChIP?
8. Які нові модифікації методу ChIP дозволяють працювати з малою кількістю клітин та скорочувати тривалість експерименту?
9. Що таке ChIP-on-chip та ChIP-seq і в чому полягає їх відмінність за принципом та роздільною здатністю?
10. Які основні обмеження ChIP-аналізу слід враховувати при проєктуванні епігенетичних експериментів?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №17. Вестерн-блот аналіз

Мета: ознайомитися з принципом Вестерн-блот аналізу, його основними етапами та практичним застосуванням у біомедичних і біотехнологічних дослідженнях. Засвоїти методiku екстракції білків, проведення електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методом Лемлі, виконання напівсухого перенесення білків на PVDF-мембрану, проведення блокування, виявлення специфічного білка за допомогою системи ECL та здійснення кількісної оцінки хемілюмінесцентного сигналу.

Теоретичні відомості

1. Загальна характеристика і принцип методу.
2. Типовий протокол Вестерн-блоту: підготовка зразків, гель - електрофорез, перенесення на мембрану, блокування, детекція і візуалізація результатів.
3. Переваги і недоліки методу.
4. Використання Вестерн-блоту.

Загальна характеристика і принцип методу

Вестерн-блот (англ. western blot; інколи цей метод називають імунний блотинг) — аналітичний метод, який ґрунтується на реакції антиген—антитіло і застосовується для визначення специфічних білків в екстрактах клітин або тканин, попередньо фракціонованих за допомогою гелевого електрофорезу та перенесені, в переважній більшості випадків, на нітроцелюлозну або PVDF-мембрану. Трансфер протеїнів із гелю на мембрану дозволяє інкубувати їх з певним антитілом та виконати подальшу їх детекцію та візуалізацію у вигляді смуг (бендів). Існує безліч комерційних компаній, що спеціалізуються на

виробництві антитіл (як моноклональних, так і поліклональних) до десятків тисяч різних білків.

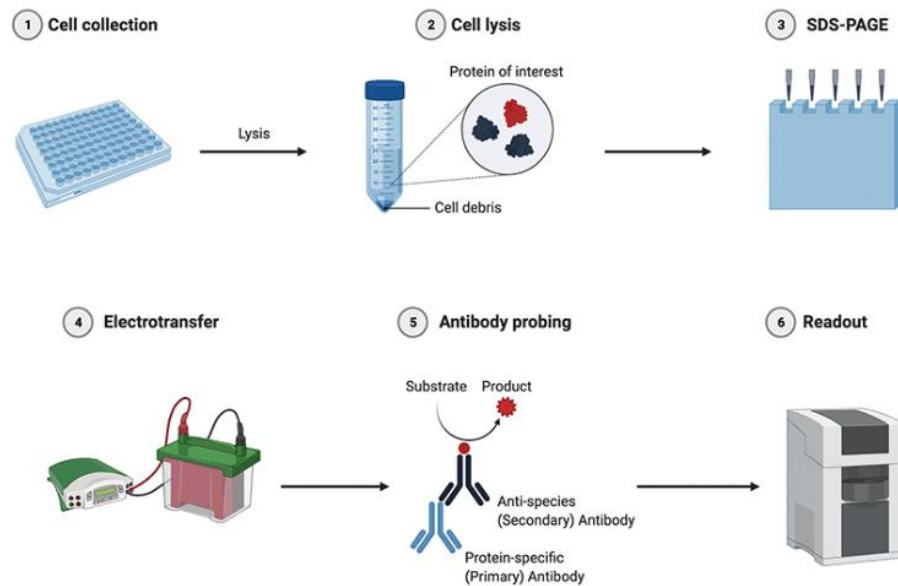


Рис. 41. Загальна схема процедури Вестерн-блот аналізу (джерело: <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:67ab1bfa:html:1?source=%2Flibrary%2Fclusters%2Fcluster%3Aabe-espanol>)

Вестерн-блот був розроблений у лабораторії Джорджа Старка (George Stark) в Стенфорді. Назва "вестерн-блот" техніці було дана У. Нейлом Бурнеттом (W. Neal Burnette) і є грою слів від назви "саузерн-блот" - методики визначення ДНК, розробленої раніше Едвін Саузерном. Аналогічний метод визначення РНК називається нозерн-блот (англ. Northern blot), а детекція посттрансляційних модифікацій білків - істерн-блот (англ. Eastern blotting).

Типовий протокол Вестерн-блоту: підготовка зразків, гель - електрофорез, перенесення на мембрану, блокування, детекція і візуалізація результатів

Підготовка зразків

Зразок може бути взятий з цільної тканини або клітинної культури. У більшості випадків тверді тканини спочатку подрібнюються з використанням блендера (для зразків великого об'єму), гомогенізатора (менші об'єми) або обробки ультразвуком. При цьому бактерії, віруси та інші компоненти довкілля також є джерелом білків.

Для поліпшення лізису клітин та розчинення білків можуть бути застосовані різні детергенти, солі та буфери. Для запобігання розщепленню зразків їх власними ферментами часто додають інгібітори протеаз та фосфатаз. Підготовка тканин часто виконується за низьких температур, щоб уникнути денатурації білка.

Для поділу різних клітинних компартментів та органел застосовують комбінації біохімічних та механічних методик фракціонування, у тому числі різні типи фільтрації та центрифугування.

Обов'язковим кроком є також вимірювання загальної концентрації білка (за методом Лоурі або Бредфорда) та вирівнювання її в різних зразках шляхом розведення, що полегшує порівняння кінцевих результатів.

Гель-електрофорез

Білки розділяються за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Розподіл білків можна проводити за ізоелектричною точкою (pI), молекулярною масою, електричним зарядом або за поєднання цих параметрів.

Найбільш поширений спосіб розділення білків - електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію (англ. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) за Лемлі. SDS викликає денатурацію білків і підтримує їх у денатурованому стані, для руйнування вторинних і третинних структур білків використовують відновники дисульфідних зв'язків, наприклад, дитіотреїтол та меркаптоетанол. Денатуровані поліпептиди мігрують в електричному полі через акриламідний гель до анода, при цьому менші білки рухаються швидше і, таким чином, розділяються відповідно до молекулярної маси.

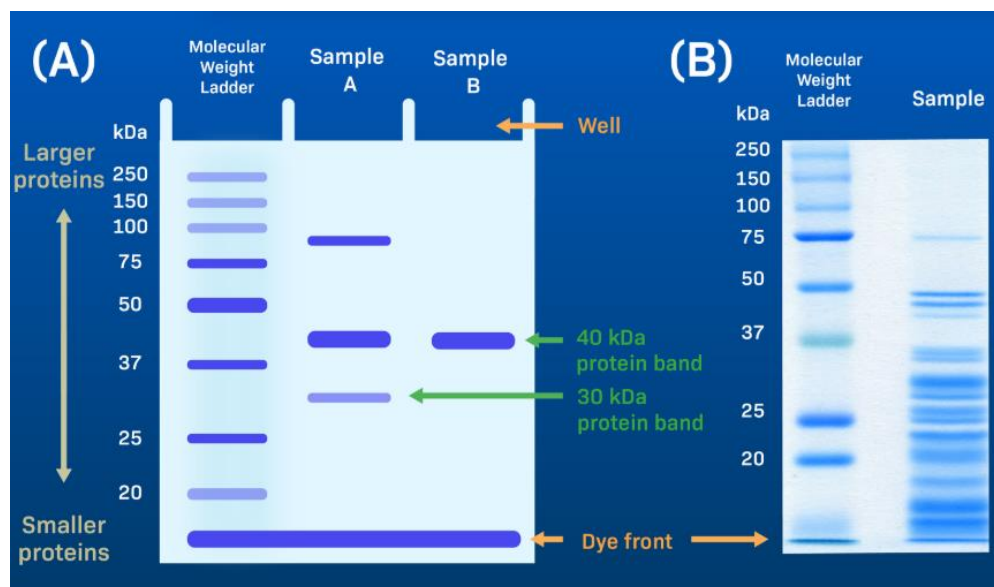


Рис. 42. Пофарбований поліакриламідний гель можна використовувати для візуалізації розділених білків у зразку

Панель А показує схематичне зображення результатів SDS-PAGE електрофорезу (пофарбовано кумасі). Більші білки знаходяться у верхній частині гелю, а менші білки - у нижній. Доріжка 1 - маркер молекулярної маси, доріжки 2 і 3 - зразки білка 40 кДа з різним ступенем очищення. Зразок у доріжці 3 є більш чистим, ніж зразок у доріжці 2, оскільки в зразку в доріжці 2 можна побачити додаткові білки. На панелі В показано частину справжнього гелю, який використовувався для аналізу білків в очищеному зразку еукаріотичних рибосом. Еукаріотична рибосома складається з 80 білків, тому така велика кількість смуг у доріжці зі зразком (джерело: Lee N, <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:02a2a79b:html:1>)

Концентрація акриламідну визначає роздільну здатність гелю - чим вища концентрація акриламідну, тим краще роздільна здатність низькомолекулярних білків. Низька концентрація акриламідну покращує роздільну здатність для високомолекулярних білків.

Також можливе використання двовимірного електрофорезу (2-D). У такому разі розділення білків проводять у двох напрямках — відповідно до їхньої ізоелектричної точки в першому напрямку та відповідно до молекулярної маси — у другому.

Зразки на гель наносять у кишені (лунки). Як правило, одну з доріжок залишають для маркерів молекулярної маси (суміші білків з відомими масами). Після подачі напруги білки рухаються в електричному полі з різною швидкістю. Відмінності у швидкості просування — електрофоретичної рухливості — призводить до поділу білків на смуги (англ. bands).

Перенесення на мембрану (трансфер)

Щоб зробити білки доступними для антитіл і подальшої детекції, їх разом з гелем переносять на мембрану, виготовлену з нітроцелюлози або полівініліденфториду (PVDF). Мембрана накладається поверх гелю, а поверх неї кладуть стос фільтрувального паперу. Весь стос поміщають у буфер для перенесення, який під дією капілярних сил просувається вгору по паперу, несучи з собою білки.

Інший метод перенесення білків називається електроблотинг і використовує електричний струм для перенеосення білків з гелю на мембрану. Білки переміщуються з гелю на мембрану із збереженням свого розташування. Внаслідок цього «промокування» (від. англ. blotting) процесу білки утримуються на тонкому поверхневому шарі мембрани для детекції.

Обидва типи мембран використовують через їх властивості неспецифічно зв'язувати білки. Зв'язування білків ґрунтується як на гідрофобних взаємодіях, так і на електростатичних взаємодіях між мембраною та білком. Нітроцелюлозна мембрана дешевша за PVDF, але набагато тендітніша і гірше витримує повторне нанесення мембран використовують через їх властивості неспецифічно зв'язувати білки.

Одноманітність і загальна ефективність перенесення білків з гелю на мембрану може бути перевірена фарбуванням мембрани барвниками Coomassie blue або Ponceau S. Coomassie найбільш поширений з двох, а барвник Ponceau S має більшу чутливість і краще розчинний у воді, що спрощує подальше відмивання на мембрану.

Блокування

Як тільки обрано тип мембрани, антитіла та цільовий білок, повинні бути вжиті заходи щодо виключення взаємодії між мембраною та антитілом, яке використовується для детекції цільового білка (бо антитіло саме по собі білок).

Блокування неспецифічних зв'язувань досягається інкубацією мембрани в розведеному розчині білка - зазвичай бичачого сироваткового альбуміну або сухого знежиреного молока (обидва недорогі), з невеликим відсотком детергенту типу Tween 20 або Triton X-100. Білок із розведеного розчину прикріплюється до мембрани у всіх місцях, де не прикріпився цільовий білок. Тому при додаванні антитіл єдине вільне місце на мембрані, куди вони можуть прикріпитися, це сайти зв'язування на специфічних цільових білках. Цей фоновий «шум» в кінцевому продукті вестерн-блоту призводить до чистих результатів та виключення хибно-позитивних.

Детекція

Після блокування мембрана інкубується з розчином первинного антитіла, яке специфічно зв'язується з досліджуваним білком. Зазвичай розчин складається з буферного розчину солі з невеликим відсотковим вмістом детергенту, іноді сухого молока або БСА. Розчин антитіл з мембрана можуть бути інкубовані де завгодно від 30 хвилин до залишення на ніч. Також вони можуть бути інкубовані за різних температур, при підвищеній температурі спостерігається краще зв'язування - і специфічне (цільового білка, "сигнал") і неспецифічне ("шум").

Після етапу промивання мембрани, що необхідно для видалення первинних антитіл, які не зв'язалися, - мембрану витримують в інших антитілах, що безпосередньо зв'язуються з клас-специфічними ділянками первинних антитіл. Вони відомі як вторинні антитіла і відповідно до їх цільових властивостей, як правило називаються на кшталт «anti-mouse», «anti-goat», і так далі.

Вторинні антитіла зазвичай зв'язані з біотином або репортерним ферментом, таким як лужна фосфатаза або пероксидаза хрому. Це означає, що кілька вторинних антитіл можуть зв'язуватися з одним первинним та посилювати сигнал.

Найбільш поширені, зв'язані з пероксидазою хрому вторинні антитіла використовуються для розрізання хемілюмінесцентного агента, і продукт реакції виробляє люмінесцентне випромінювання пропорційно кількості білка. Лист світлочутливої фотографічної плівки міститься навпроти мембрани і піддається дії випромінювання у ході реакції, створюючи зображення смуг антитіл на блоті.

Дешевший, але менш чутливий підхід з використанням 4-хлоронафтольного фарбування в суміші з 1% перекисом водню; реакція пероксидного радикалу з 4-хлоронафтолом дає темно-коричневе фарбування, яке реєструється без використання спеціальної фотографічної плівки.

У іншому методі детекції використовуються вторинні антитіла зі зв'язаним флюорофором, який випромінює у ближній інфрачервоній ділянці (NIR). Світло, випромінюване флюоресцентним барвником, постійне і робить флюоресцентну детекцію більш точним і чутливим способом вимірювання різниці в сигналі, виробленому білками, міченими антитілами, на вестерн-блоті. Білки можуть бути визначені кількісно, оскільки сигнал розраховується як різниця (випромінювання) щодо всіх білків на мембрані, вимірюваному у спокої, щодо (випромінювання) хемілюмінесценції, яка вимірюється в динаміці.

Третій альтернативний метод використовує радіоактивну мітку (наприклад, мічений антитілозв'язуючий білок типу Білка A *Staphylococcus* з радіоактивним ізотопом йоду) замість ферменту, зв'язаного з вторинним антитілом. Оскільки інші методи безпечніші, швидші і дешевші, тому радіоактивна детекція використовується рідко.

Історично процес нанесення міток проводиться у два етапи, тому що відносно простіше зробити первинні та вторинні антитіла в окремих процесах. Це дає дослідникам і компаніям величезні переваги щодо гнучкості, і додає крок ампліфікації в процес детекції.

Враховуючи появу високопропускного аналізу білка та низький поріг виявлення, все ж таки спостерігається інтерес до розвитку системи-в-один-крок

для нанесення міток, яка дозволяє процесу проходити швидше і з меншими витратами. Вона (система-в-один-крок) вимагає антитіл-міток, які б розпізнавали досліджуваній білок і одночасно несли маркер для детекції — мітки, найбільш доступні для відомих «білкових хвостів». Спочатку мітки інкубують з мембраною в стилі методу-в-два-кроку з первинними антитілами, а потім вони готові для прямої детекції після серії промивань.

Аналіз

Після відмивання міток, що не зв'язалися, вестерн-блот готовий до детекції зондів, що зв'язалися з цільовим білком. На практиці, не у всіх вестернах виявляють білки лише по одному бенді на мембрані. Приблизний розмір обчислюють порівнюючи пофарбовані бенди з маркерами молекулярної маси, доданими при електрофорезі.

Процес повторять із структурними білками, такими як актин чи тубулін, які не змінюють між експериментами. Кількість цільового білка залежить від кількості контрольного структурного білка. Цей прийом забезпечує корекцію кількості загального білка на мембрані у разі помилки чи неповного перенесення.

Колориметрична детекція

Метод колориметричної детекції ґрунтується на інкубації блоту з субстратом, який реагує з репортерним ферментом (таким як пероксидаза хрону, англ. horseradish peroxidase), що «сидить» на вторинному антитілі.

Розчинний барвник перетворюється на нерозчинну форму іншого кольору, випадаючи в осад поруч із ферментом і забарвлюючи мембран, відповідно. Кількість білка оцінюється денситометрично за інтенсивністю фарбування або спектрофотометрично.

Хемілюмінесцентна детекція (ECL-детекція)

Метод хемілюмінесцентної детекції ґрунтується на інкубації нітроцелюлозної мембрани із субстратом, який люмінесціює після взаємодії з репортером вторинного антитіла. Світло реєструється на фотоплівку або CCD-камерою, яка здійснює цифрову зйомку блоту. Зображення аналізується денситометрично, оцінюючи відносну кількість забарвленого білка і дає кількісний результат в одиницях оптичної щільності.

Нове програмне забезпечення дозволяє провести подальший аналіз даних, наприклад, визначити молекулярну масу, якщо використовувався відповідний стандарт.

Радіоактивна детекція

Радіоактивні мітки не потребують ферментних субстратів, а дозволяють поміщати медичну радіографічну плівку навпроти блоту, даючи їй (плівці) можливість взаємодіяти з мітками та створювати темні ділянки, які відповідають смугам досліджуваного білка (на зображенні ліворуч).

Флюоресцентна детекція

Флюоресцентні мітки збуджуються світлом і випромінюють більш довгохвильове світло, яке реєструється фотосенсорами, такими як CCD-камера, забезпечена відповідними фільтрами емісії. Камера робить цифровий знімок блоту, дозволяючи проводити подальший аналіз даних, такий як аналіз молекулярної маси і кількісний вестерн-блот-аналіз.

Переваги і недоліки методу

Вестерн-блот — це високоспецифічний метод виявлення та аналізу білків, який поєднує електрофоретичне розділення білкових молекул у поліакриламідному гелі з подальшим перенесенням на мембрану і детекцією за допомогою специфічних антитіл. Метод широко використовується в молекулярній біології, біотехнології, імунології, біомедичних і фармакологічних дослідженнях.

Серед основних **переваг Вестерн-блоту** слід відзначити його високу специфічність, яка забезпечується завдяки використанню антитіл, що вибірково зв'язуються з конкретною білковою мішенню. Метод дозволяє виявляти навіть невеликі кількості білків, що робить його чутливим інструментом для аналізу експресії. Вестерн-блот дає змогу визначити молекулярну масу білка, оцінити його цілісність, а також виявити посттрансляційні модифікації (наприклад, фосфорилювання або глікозилювання). Крім того, при використанні відповідних внутрішніх контролів метод може застосовуватись для напівкількісної або навіть кількісної оцінки рівня експресії білка в різних умовах.

Попри численні переваги, метод має й **недоліки**. Вестерн-блот є багатоступеневим і трудомістким процесом, що вимагає часу, спеціального обладнання та досвіду. Результати значною мірою залежать від якості антитіл — низька специфічність або перехресна реактивність можуть призвести до хибнопозитивних сигналів. Крім того, аналіз зазвичай дозволяє дослідити лише обмежену кількість зразків одночасно, що знижує його продуктивність порівняно з високопродуктивними методами, такими як ELISA або протеомний аналіз. Ще одним обмеженням є ймовірність деградації білків під час екстракції або розділення, що може вплинути на точність результатів.

Використання Вестерн-блоту

Сфери застосування Вестерн-блоту охоплюють широкий спектр напрямів. У молекулярній біології його використовують для вивчення білкової експресії, дослідження сигнальних шляхів і клітинних відповідей на стимули. В імунології метод слугує для виявлення імуногенних білків, підтвердження специфічності антитіл або аналізу взаємодій антиген-антитіло. У біомедичній діагностиці Вестерн-блот застосовується для підтвердження таких захворювань, як ВІЛ, хвороба Лайма, пріонні хвороби. У фармакології та токсикології він є важливим інструментом для оцінки впливу лікарських засобів або токсичних речовин на рівень білкової експресії. У біотехнології Вестерн-блот використовується для контролю експресії та якості рекомбінантних білків, а також моніторингу етапів їх очищення.

Отже, Вестерн-блот залишається одним із найнадійніших та найінформативніших методів білкового аналізу, незважаючи на певні технічні складності. Його точність, чутливість і універсальність роблять його незамінним у лабораторній практиці та наукових дослідженнях.

Практична частина

Тема. Виявлення рослинного білка RuBisCO за допомогою Вестерн-блот аналізу

Матеріали: свіже листя *Arabidopsis thaliana*; буфер для екстракції білків (RIPA або Laemmli); PMSF (інгібітор протеаз); додецилсульфат натрію (SDS); бета-меркаптоетанол або DTT; маркер білкових мас (Protein ladder); поліакриламідні гелі (10–12% SDS-PAGE); буфери для гелевого електрофорезу; PVDF-мембрана (попередньо активована в метанолі); буфери для трансферу (для напівсухого перенесення); блокуючий розчин (5% BSA або сухе знежирене молоко в TBST); первинне антитіло до RuBisCO (анти-RbcL); вторинне антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP); ECL-субстрат для хемілюмінесцентної детекції; розчин для промивання (TBST).

Обладнання: гомогенізатор або ступка з рідким азотом; центрифуга; вертикальна електрофоретична камера; блок живлення; система напівсухого трансферу (наприклад, Bio-Rad Trans-Blot® Turbo); хемілюмінесцентна система візуалізації (ChemIDoc або аналогічна); мікропіпетки з набором стерильних наконечників; водяна баня або термошейкер; холодильник і морозильник; захисні засоби: лабораторні рукавички, халат, захисні окуляри.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть SDS-PAGE та вестерн-блот на прикладі білка RuBisCO.

Принцип методу. Метод SDS-PAGE дозволяє розділити білки за молекулярною масою. Далі білки переносять на мембрану (Western blot), де за допомогою специфічних антитіл виявляють цільовий білок (RuBisCO). Детекція здійснюється через хемілюмінесценцію після взаємодії HRP-кон'югованого вторинного антитіла з ECL-субстратом.

Клінічне і біотехнологічне значення. Метод Вестерн-блоту використовується для специфічного виявлення білків у біологічних зразках, що дозволяє досліджувати експресію, кількість і посттрансляційні модифікації білків. Він є особливо важливим у діагностиці захворювань, пов'язаних із порушенням білкового складу, зокрема вірусних інфекцій, аутоімунних та онкологічних патологій. У біотехнології Вестерн-блот широко застосовується для контролю якості рекомбінантних білків, оцінки ефективності трансформації клітин, перевірки експресії маркерних білків у трансгенних рослин та дослідження механізмів клітинної відповіді на біотичні або абіотичні фактори.

Хід роботи

1. Екстракція білків. Подрібнити ~100 мг свіжого листя *Arabidopsis* у рідкому азоті. Додати буфер Laemmli (з інгібіторами протеаз). Нагріти 5 хв при 95°C, охолодити, центрифугувати 10 хв при 12000 об/хв. Відібрати супернатант (білковий лізат).

2. SDS-PAGE. Завантажити 20–30 мкг білка у гелеві лунки. Виконати електрофорез при 120 В ~1–1,5 год. По завершенню – промити гель у воді.

3. Перенесення білків на PVDF. Активувати мембрану в метанолі, змити TBST. Зібрати сендвіч для напівсухого трансферу. Проводити перенесення 30 хв при 25 В.

4. Блокування та інкубація з антитілами. Мембрану інкубувати 1 год при кімнатній температурі у 5% BSA. Додати первинне антитіло (анти-RbcL),

інкубувати 1,5 год (або ніч при 4°C). Промити TBST, додати вторинне HRP-кон'юговане антитіло. Інкубувати 1 год.

5. Виявлення сигналу. Промити мембрану 3× по 5 хв у TBST. Нанести ECL-субстрат. Детекція сигналу на ChemiDoc.

Завдання 2. Проведіть оцінку результатів вестерн-блоту.

Таблиця 21. Результати детекції білка RuBisCO методом вестерн-блоту

№	Назва зразка	Наявність сигналу	Інтенсивність смуги (+/++/+++)	Коментарі
1	Arabidopsis контроль			
2	Arabidopsis стрес			
3	Вторинне без первинного			контроль фону
4	Позитивний контроль (якщо застосовується)			

Пояснення до таблиці

- ✓ **Наявність сигналу:** "+" або "-"
- ✓ **Інтенсивність:** + слабкий, ++ помірний, +++ сильний
- ✓ **Коментарі:** специфічність, фоновий шум, аномальні смуги

Завдання 3. Після завершення експерименту проаналізуйте отримані результати та сформулюйте узагальнення згідно з такими критеріями:

1. Чи було виявлено RuBisCO? У яких зразках він спостерігався, і чи відповідає його маса очікуваній (~55 кДа)?
2. Оцінка якості методу: врахуйте наявність фону, ефективність блокування, чистоту смуги, якість контролю.
3. Біологічне значення RuBisCO: опишіть його функцію у фотосинтезі, значення в рослинах, чутливість до зовнішніх умов.
4. Фактори, що вплинули на якість: якість білкової екстракції, антитіла, буфери, точність трансферу.
5. Висновок: наскільки ефективним є метод вестерн-блоту для кількісного аналізу білкової експресії? Які його обмеження та переваги в біотехнології?

Контрольні питання

1. У чому полягає принцип методу Вестерн-блот?
2. Які етапи включає типовий протокол Вестерн-блот аналізу?
3. Яку функцію виконує додецилсульфат натрію (SDS) у методі SDS-PAGE?
4. У чому полягає мета перенесення білків з гелю на мембрану під час Вестерн-блоту?
5. Чим відрізняється нітроцелюозна мембрана від PVDF-мембрани?
6. Яка роль блокування під час проведення Вестерн-блоту і чим воно здійснюється?
7. Які типи детекції використовуються у Вестерн-блоті та в чому їхні особливості?

8. У чому полягає відмінність між первинними і вторинними антитілами у Вестерн-блоті?

9. Назвіть переваги і недоліки Вестерн-блот аналізу як методу виявлення білків.

10. У яких сферах біології та медицини найбільш часто застосовується Вестерн-блот і чому?

ЧАСТИНА 4. ОТРИМАННЯ ТРАДИЦІЙНИХ ВАКЦИН

Вакцини є одним із найбільш ефективних засобів профілактики інфекційних захворювань, що дозволяє значно знизити захворюваність і смертність від бактеріальних та вірусних інфекцій. Традиційні вакцини, які включають живі ослаблені, інактивовані та субодиничні вакцини, вже протягом багатьох десятиліть відіграють ключову роль у захисті здоров'я населення.

У цій частині лабораторних робіт студенти ознайомляться з основними видами бактерійних та вірусних вакцин, принципами їх дії, методами отримання та контролю якості. Лабораторні заняття охоплюють:

- бактерійні вакцини, включаючи вакцини проти туберкульозу (БЦЖ), дифтерії, правця, кашлюка та пневмококової інфекції. Розгляд їхньої класифікації, допоміжних компонентів та механізму дії.
- вірусні вакцини, серед яких препарати для профілактики поліомієліту, гепатиту В, кору, паротиту, краснухи та грипу. Аналіз механізмів їх імунної дії та контроль якості виробництва.

Практичні заняття передбачають групові обговорення переваг і недоліків різних типів вакцин, що сприятиме кращому розумінню їхнього впливу на імунну систему та ефективності у профілактиці захворювань. Дослідження традиційних вакцин є важливим етапом у формуванні компетентностей майбутніх фахівців у сфері біотехнології, імунології та медицини.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №18. Бактеріальні вакцини для профілактики інфекційних захворювань

Мета: ознайомитися з класифікацією бактеріальних вакцин, їх основними типами, механізмами дії, допоміжними компонентами, етапами виробництва та контролю якості; розглянути приклади найпоширеніших бактеріальних вакцин, що застосовуються в клінічній практиці (зокрема БЦЖ, АКДП, Hib, пневмококова вакцина); закріпити теоретичні знання шляхом активного обговорення переваг і недоліків різних типів бактеріальних вакцин у форматі групової дискусії.

Теоретичні відомості

1. Бактеріальні вакцини та їх класифікація.
2. Приклади бактеріальних вакцин: вакцина проти туберкульозу (БЦЖ), вакцини проти дифтерії, кашлюка, правця; вакцина проти гемофільної інфекції типу b (Hib); вакцина проти пневмококової інфекції; адсорбована кашлюко - дифтерійно -правцева вакцина (АКДП).

3. Допоміжні компоненти бактеріальних вакцин.
4. Механізм дії бактеріальних вакцин.
5. Етапи виробництва і контроль якості бактеріальних вакцин.

Вакцинація є одним із найефективніших методів профілактики інфекційних захворювань, спрямованим на створення специфічного імунітету проти збудників хвороб. Бактеріальні вакцини відіграють ключову роль у зниженні захворюваності та смертності від бактеріальних інфекцій, що історично були значним тягарем для суспільства.

Бактеріальні вакцини та їх класифікація

Бактеріальні вакцини — це препарати, призначені для формування специфічного імунітету до збудників бактеріальних інфекцій. Вони стимулюють імунну систему до вироблення антитіл або клітинної імунної відповіді, що дозволяє захистити організм від подальшого зараження. Залежно від типу використаного антигену, технології виготовлення та механізму дії бактеріальні вакцини поділяють на кілька основних категорій. Кожна з них має свої переваги, недоліки та специфіку використання.

Живі атенуовані вакцини. Живі атенуовані вакцини містять ослаблені (атенуовані) штами бактерій, які зберігають здатність до обмеженої реплікації в організмі, але при цьому втратили патогенність. Атенуація досягається шляхом багаторазового культивування бактерій в умовах, які знижують їх вірулентність, або за допомогою генної інженерії.

Таблиця 22. Переваги, недоліки та приклади живих бактеріальних вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Потужна та тривала імунна відповідь (гуморальна і клітинна) • Можливість одноразового введення • Імітація природного зараження
Недоліки	• Не рекомендовані для імунокомпрометованих осіб • Високі вимоги до зберігання (холодовий ланцюг) • Ризик реверсії вірулентності (дуже рідко)
Приклад вакцини	БЦЖ (Bacillus Calmette–Guérin) — жива атенуована вакцина проти туберкульозу, що містить ослаблений штам <i>Mycobacterium bovis</i> . Захищає від тяжких форм ТБ у дітей.

Інактивовані (убиті) вакцини. Ці вакцини містять бактерії, які були повністю інактивовані (вбиті) шляхом обробки теплом, хімічними агентами (наприклад, формаліном) або ультрафіолетовим випромінюванням. Інактивовані мікроорганізми не здатні до реплікації в організмі, але зберігають антигенні властивості, що стимулюють імунну відповідь.

Таблиця 23. Переваги, недоліки та приклади інактивованих (убитих) вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Абсолютна безпечність щодо реплікації мікроорганізмів • Підходять для всіх вікових груп, включно з імунокомпрометованими пацієнтами • Добре контрольована доза антигену

Недоліки	• Формують переважно гуморальну імунну відповідь • Часто потребують багаторазових введень (бустерні дози) • Можуть містити залишкові токсичні компоненти (формалін, ад'юванти тощо)
Приклади вакцин	• Інактивована цілюноклітинна вакцина проти кашлюка (<i>Bordetella pertussis</i>) — входить до складу комбінованих препаратів, зокрема АКДП (кашлюк-дифтерія-правець). • Вакцина проти черевного тифу (<i>Typhim Vi</i>) — містить інактивовані бактерії або очищений Vi-полісахарид <i>Salmonella Typhi</i>.

Анатоксини (токсоїди). Токсоїдні вакцини не містять самих бактерій, а лише їхні токсини, які були інактивовані (наприклад, формальдегідом), але зберегли імуногенність. Токсоїди стимулюють організм до вироблення антитіл проти бактеріальних екзотоксинів, захищаючи від токсикоінфекцій.

Таблиця 24. Переваги, недоліки та приклади анатоксинів

Критерій	Опис
Переваги	• Висока безпека — не містять живих або убитих бактерій • Спрямовані на нейтралізацію токсинів, які є основним патогенним фактором • Формують стійкий гуморальний імунітет (антитіла до токсинів) • Можуть поєднуватися в комбіновані вакцини (наприклад, АКДП)
Недоліки	• Не формують клітинного імунітету • Не захищають від колонізації бактеріями, лише від дії токсинів • Потребують бустерних доз для підтримки імунітету
Приклади вакцин	• Дифтерійний анатоксин — містить інактивований токсин <i>Corynebacterium diphtheriae</i>. • Правцевий анатоксин — містить інактивований токсин <i>Clostridium tetani</i>. • Обидва анатоксини входять до складу комбінованої вакцини АКДП (кашлюк-дифтерія-правець).

Полісахаридні та кон'юговані вакцини. Ці вакцини розроблені для захисту проти бактерій, які мають полісахаридну капсулу — важливий фактор вірулентності, що дозволяє їм уникати фагоцитозу. Самі полісахариди є слабкими антигенами (Т-незалежними), особливо у дітей до 2 років. Для посилення імунної відповіді розроблені кон'юговані вакцини — у них полісахариди хімічно з'єднані з білками-носіями, що забезпечують Т-залежну імунну відповідь.

Таблиця 25. Переваги, недоліки та приклади полісахаридних та кон'югованих вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Ефективні у дітей до 2 років (у кон'югованій формі) • Формують тривалий гуморальний імунітет та імунну пам'ять • Дають змогу комбінувати антигени різних серотипів бактерій • Знижують носійство збудника та забезпечують колективний імунітет
Недоліки	• Некон'юговані полісахаридні вакцини неефективні в ранньому дитячому віці • Можлива менша ефективність у регіонах з високою серотипною варіабельністю бактерій

	• Дорожчі у виробництві (особливо кон'юговані форми) • Потребують оновлення формул із урахуванням циркулюючих серотипів
Приклади вакцин	• Ніб-вакцина — містить капсульний полісахарид PRP <i>Haemophilus influenzae</i> типу b, кон'югований з білком-носієм (токсоїдом правця або дифтерії). • Пневмококові вакцини: PCV13 (кон'югована), PPSV23 (полісахаридна) — проти <i>Streptococcus pneumoniae</i>. • Менінгококова кон'югована вакцина — проти <i>Neisseria meningitidis</i> (серогрупи A, C, W, Y).

Кожен тип бактеріальної вакцини має своє місце в системі імунoproфілактики. Вибір форми вакцини залежить від цільової популяції (вік, стан імунної системи), характеристики патогену, мети вакцинації (профілактика інфекцій чи токсикоінфекцій), а також логістичних умов (зберігання, транспортування, забезпечення холодового ланцюга).

Загалом, завдяки бактеріальним вакцинам вдалося суттєво знизити захворюваність і смертність від таких небезпечних захворювань, як туберкульоз, дифтерія, правець, коклюш, Ніб-менінгіт, пневмококова інфекція та інші. Розвиток нових технологій (наприклад, рекомбінантних білкових вакцин або РНК-вакцин проти бактеріальних антигенів) відкриває нові перспективи для вдосконалення існуючих бактеріальних вакцин та створення нових.

Приклади бактеріальних вакцин

У таблиці наведено основні приклади бактеріальних вакцин, які використовуються в сучасній медичній практиці.

Таблиця 26. Приклади бактеріальних вакцин та їх характеристика

№	Назва вакцини	Тип вакцини	Активний компонент	Комерційні препарати	Особливості застосування
1	Вакцина проти туберкульозу (БЦЖ)	Жива атенуйована	Ослаблений штам <i>Mycobacterium bovis</i> (BCG)	BCG SSI (Данія), BCG Vaxigrip (Індія)	Вакцинація новонароджених у більшості країн. Захист від тяжких форм ТБ у дітей.
2	АКДП (вакцина проти дифтерії, кашлюка, правця)	Інактивована (комбінована), анатоксини + цілюноклітинна/ацелюлярна	Дифтерійний і правцевий анатоксини, <i>Bordetella pertussis</i>	Infanrix (GSK), Pentaxim (Sanofi), DTP (Serum Institute)	Рутинна імунізація у дитячому віці. Ацелюлярні вакцини мають кращу переносимість.
3	Вакцина проти гемофільної інфекції типу b (Ніб)	Кон'югована полісахаридна	PRP (капсульний полісахарид) + білок-носії	Hiberix (GSK), Act-HIB (Sanofi), у складі Pentaxim	Захист дітей <5 років від менінгіту, сепсису, епіглотиту. Вакцинація з 2 міс.
4	Пневмококова вакцина	Полісахаридна/Кон'югована	Капсульні полісахариди <i>S. pneumoniae</i>	Prevenar 13 (Pfizer), Pneumovax 23 (Merck), Vaxneuvance	Вакцинація дітей, осіб похилого віку, хроніків. PCV13 ефективна у дітей раннього віку.
5	Менінгококова вакцина	Полісахаридна або кон'югована	Полісахариди <i>Neisseria</i>	Menactra, Menveo	Профілактика менінгіту у

			<i>meningitidis</i> серогруп A, C, W, Y, B	(ACWY); Bexsero, Trumenba (B)	підлітків, військових, осіб у регіонах з ендемічністю.
6	Вакцина проти черевного тифу	Інактивована/полісахаридна	Vi-полісахарид <i>Salmonella</i> <i>Typhi</i> або інактивовані бактерії	Typhim Vi (Sanofi), Typherix (GSK)	Рекомендована для мандрівників у регіони з високою ендемічністю. Ефективна з 2 років.

Допоміжні компоненти бактеріальних вакцин

Бактеріальні вакцини, крім основного імуногенного компонента (антигену), містять ряд додаткових речовин — допоміжних компонентів, що забезпечують їхню ефективність, стабільність, безпечність і тривалий термін зберігання. Ці речовини не є активними імунними агентами, але без них якісне виготовлення, транспортування та застосування вакцини було б неможливим. Нижче наведено основні категорії допоміжних компонентів бактеріальних вакцин із поясненням їхнього призначення та прикладами застосування.

Ад'юванти. Ад'юванти — це речовини, що підсилюють імунну відповідь організму на введений антиген. Їхнє використання дозволяє зменшити кількість антигену у вакцині та зменшити потребу в повторних бустерних дозах.

Найпоширенішим класом ад'ювантів у бактеріальних вакцинах є **алюмінієві солі** — гідроксид або фосфат алюмінію. Вони активують локальні запальні процеси і забезпечують поступове вивільнення антигену, що стимулює ефективнішу гуморальну імунну відповідь. Алюмінієві ад'юванти використовуються в АКДП-вакцинах (Infanrix, Pentaxim), Hib-вакцині, вакцині проти гепатиту В, а також у багатьох комбінованих вакцинах для дітей.

Крім алюмінієвих солей, у сучасних вакцинах можуть використовуватись нові типи ад'ювантів, наприклад:

- емульсії на основі сквалену (MF59, AS03),
- мікроемульсії з CPG-олігонуклеотидами (активаторами Toll-подібних рецепторів).

Проте такі ад'юванти частіше використовуються у вірусних або експериментальних бактеріальних вакцинах і поки що рідше — у широкій практиці.

Консерванти. Консерванти додаються до вакцин, щоб запобігти росту мікроорганізмів під час зберігання та застосування, особливо у багатодозових флаконах. Це важливо для запобігання інфікуванню пацієнта при повторному використанні флакону.

Тіомерсал — найвідоміший консервант, що містить органічну сполуку ртуті. Його використовували у багатьох вакцинах протягом десятиліть. Проте через занепокоєння громадськості щодо можливих нейротоксичних ефектів (які не були підтверджені клінічними дослідженнями) тіомерсал поступово прибирають із дитячих вакцин. Наразі він зустрічається головним чином у багатодозових формах вакцин, які застосовуються в країнах із низьким і середнім рівнем доходу.

Інші консерванти включають:

- фенол,
- 2-феноксietанол,
- формальдегід (залишається в препаратах у слідових кількостях після інактивації бактерій або токсинів).

У сучасних одноразових формах вакцин консерванти або не використовуються, або замінюються на безпечніші альтернативи. Наприклад, у вакцинації немовлят препарат *Infanrix Hexa* не містить тіомерсалу.

Стабілізатори. Стабілізатори забезпечують збереження біологічної активності вакцини протягом терміну зберігання. Вони запобігають денатурації білкових антигенів, агрегації молекул або зміні структури препарату при заморожуванні, нагріванні чи коливаннях рН.

Найчастіше використовувані стабілізатори:

- желатин — тваринного походження, часто входить до складу живих або ліофілізованих вакцин (зокрема БЦЖ, вакцина проти сказу),
- лактоза, сахароза, сорбіт, маніт — вуглеводи, які використовуються для підтримки стабільності у ліофілізованих препаратах, таких як Hib-вакцина *Act-HIB* або *Menactra*,
- альбумін сироватковий — застосовується рідше, як стабілізатор для деяких рекомбінантних вакцин,
- буферні системи (фосфатні або цитратні) — для підтримання сталого рН у розчинах.

У вакцині *Act-HIB*, наприклад, стабілізатором є лактоза, яка забезпечує стабільність кон'югованого PRP-антигену під час зберігання.

Розчинники та розріджувачі. У випадках, коли вакцина випускається у вигляді порошку (наприклад, ліофілізовані форми живих вакцин), перед введенням її необхідно відновити за допомогою розчинника. Цей компонент подається в окремому флаконі або попередньо заповненому шприці.

Типові розчинники включають:

- воду для ін'єкцій (sterile WFI),
- 0,9% розчин хлориду натрію (NaCl),
- спеціальні буфери, що регулюють рН і забезпечують ізотонічність.

Наприклад, при підготовці до введення вакцини БЦЖ, яка представлена у вигляді ліофілізованої маси, обов'язково додають стерильну воду для ін'єкцій без консервантів.

Допоміжні речовини в бактеріальних вакцинах — це важливий компонент, який гарантує стабільність, ефективність і безпеку препарату. Їхній склад суворо регламентується і контролюється на кожному етапі виробництва. Кожна з них виконує свою функцію: одні забезпечують імунну стимуляцію, інші — довготривале зберігання, а деякі запобігають мікробному зараженню. Однак важливо пам'ятати, що ці компоненти можуть впливати на безпеку або переносимість вакцини в окремих категоріях населення (наприклад, у разі алергії на желатин або лактозу), що необхідно враховувати при вакцинації.

Механізм дії бактеріальних вакцин

Механізм дії бактеріальних вакцин ґрунтується на здатності імунної системи розпізнавати, запам'ятовувати та нейтралізовувати чужорідні антигени. Введення вакцини імітує природне інфікування, але без розвитку клінічних проявів захворювання. Це дозволяє організму заздалегідь сформувати специфічну імунну відповідь, яка забезпечує захист у разі подальшого контакту з патогеном.

Первинна імунна відповідь після вакцинації. Після введення вакцини антигени (живі або інактивовані бактерії, токсосоїди, полісахариди або білково-полісахаридні кон'югати) потрапляють у тканини та кров, де їх розпізнають антиген-презентуючі клітини (макрофаги, дендритні клітини). Вони обробляють антиген і представляють його на своїй поверхні разом із молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС).

Далі антиген-презентуючі клітини активують Т-лімфоцити, які, у свою чергу, стимулюють В-лімфоцити. В-лімфоцити диференціюються в плазматичні клітини, які починають синтезувати специфічні антитіла до відповідного антигену. Також формується пул клітин пам'яті (Т- і В-клітини), які зберігаються в організмі протягом тривалого часу.

Роль гуморальної та клітинної імунної відповіді. Різні типи бактеріальних вакцин активують різні ланки імунної системи:

- **Живі атенуйовані вакцини (наприклад, БЦЖ)** активують як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь. Оскільки бактерії частково реплікуються в організмі, вони стимулюють утворення специфічних Т-хелперів і Т-кілерів. Це особливо важливо для боротьби з внутрішньоклітинними патогенами, такими як *Mycobacterium tuberculosis*.

- **Інактивовані вакцини (наприклад, інактивована вакцина проти кашлюка)** переважно стимулюють гуморальну імунну відповідь — тобто продукцію антитіл, які нейтралізують бактеріальні антигени. Клітинна відповідь тут менш виражена, що іноді вимагає введення повторних доз (бустерів) для підтримки тривалого імунітету.

- **Токсоїди (анатоксини), як у випадку з вакцинами проти дифтерії та правця,** стимулюють вироблення нейтралізуючих антитіл проти токсинів, а не самих бактерій. Це захищає організм не від бактеріальної інфекції як такої, а від її основного патогенетичного фактора — токсину.

- **Полісахаридні та кон'юговані вакцини (наприклад, Hib, PCV13)** запускають продукцію антитіл до капсульних полісахаридів бактерій. Звичайні полісахаридні вакцини стимулюють Т-незалежну відповідь, яка є короткотривалою і не формує імунної пам'яті, особливо в дітей до 2 років. Кон'юговані вакцини, де полісахарид з'єднаний із білком-носієм, дозволяють залучити Т-хелпери і сформувати повноцінну тривалу імунну відповідь із формуванням пам'яті.

Імунологічна пам'ять. Ключовим результатом вакцинації є формування імунної пам'яті. Це означає, що при повторному контакті з бактеріальним збудником (через місяці або навіть роки після щеплення) активуються клітини пам'яті, які вже «знають» антиген. Вони дуже швидко перетворюються в плазматичні клітини та починають інтенсивно виробляти антитіла.

Таким чином, реінфекція або не настає взагалі, або проходить у легкій формі, не викликаючи важких ускладнень. Наприклад, при вакцинації АКДП імунна система вже готова розпізнати правцевий токсин або поверхневі антигени *Bordetella pertussis*, запобігаючи розвитку хвороби.

Значення бустерної імунізації. Для деяких вакцин (особливо інактивованих і токсойдних) однієї дози недостатньо. У таких випадках бустерна (нагадувальна) доза вводиться через кілька місяців або років, щоб:

- активувати імунні клітини пам'яті,
- забезпечити довготривалий захист,
- підвищити рівень антитіл до захисного титру.

Наприклад, вакцинація АКДП включає кілька доз у дитинстві, а потім бустерні щеплення в дорослому віці (АДП або АДП-м).

Таблиця 27. Приклади механізмів захисту вакцин різних типів

Тип вакцини	Механізм дії	Приклад вакцини
Живі атенуйовані	Інфікують клітини → активація Т- та В-лімфоцитів → утворення клітин пам'яті	БЦЖ проти туберкульозу
Інактивовані	Антигени поглинаються APC → активація В-лімфоцитів → антитіла	Інактивована вакцина проти кашлюка
Токсойдні	Антитіла нейтралізують токсин → попередження ураження тканин	Правцевий анатоксин
Кон'юговані	Полісахариди + білок активують Т-залежну відповідь → антитіла + пам'ять	Hib-вакцина, PCV13

Механізм дії бактеріальних вакцин ґрунтується на природній здатності імунної системи «вчитись» реагувати на патогени без ризику захворювання. Ефективність кожної вакцини визначається її здатністю викликати адекватну імунну відповідь із формуванням довготривалої пам'яті. Знання про ці механізми дає змогу обґрунтовано підходити до вибору вакцин, планування календаря щеплень і стратегії імунопрофілактики у різних груп населення.

Етапи виробництва і контроль якості бактеріальних вакцин

Виробництво бактеріальних вакцин є багатоступеневим, високоспеціалізованим біотехнологічним процесом, що вимагає суворого дотримання міжнародних стандартів якості, зокрема належної виробничої практики (GMP). Всі етапи — від вирощування бактерій до випуску готової продукції — виконуються у стерильних умовах із постійним контролем параметрів середовища, обладнання, персоналу та кінцевого продукту. Нижче наведено основні етапи виробництва бактеріальних вакцин.

Вирощування мікроорганізмів. Процес починається з культивування бактеріальних штамів, які є джерелом антигенного матеріалу. Для цього використовуються стерильні ферментери або біореактори, де підтримуються оптимальні умови (рН, температура, аерація, живильне середовище). Штами мають бути генетично стабільними, атестованими, нетоксичними та відповідати вимогам до вакцинного виробництва.

Прикладом є культивування *Mycobacterium bovis* (штам БЦЖ) для отримання вакцини проти туберкульозу, *Bordetella pertussis* — для виробництва

вакцини проти кашлюка, або *Corynebacterium diphtheriae* — для виготовлення дифтерійного анатоксину.

Інактивація або ослаблення патогенів. Залежно від типу вакцини, бактерії можуть бути:

- **Інактивовані (вбиті)** шляхом обробки формальдегідом, теплом або іншим фізико-хімічним методом. Це зберігає антигенну структуру, але повністю позбавляє мікроорганізм здатності до розмноження.

- **Атенуйовані (ослаблені)** шляхом багаторазових пасажів або генної модифікації, що знижує вірулентність бактерій, зберігаючи їхню здатність викликати імунну відповідь.

У випадку анатоксинів (токсоїдів) інактивуються бактеріальні екзотоксини — білкові молекули, які є основними чинниками патогенності. Наприклад, токсини дифтерії та правця обробляються формальдегідом, що робить їх безпечними, але імуногенними.

Очищення та ізоляція антигенів. Цей етап включає виділення необхідного антигенного компоненту: цілі бактеріальні клітини, їх фрагменти, токсини або полісахариди. Застосовуються такі методи:

- Центрифугування, ультрафільтрація, осадження солями.
- Хроматографічні методи (гель-фільтрація, іонообмінна, афінна хроматографія).
- Мікрофільтрація для видалення домішок і залишкових компонентів середовища.

У кон'югованих вакцинах, наприклад проти НіВ або пневмокока, полісахаридні антигени зв'язуються з білковими носіями (анатоксинами) — це підвищує імуногенність, особливо в дітей.

Додавання допоміжних речовин. Для забезпечення стабільності, ефективності та безпеки вакцин до складу препарату вводять:

- **Ад'юванти** — речовини, які підсилюють імунну відповідь. Найпоширенішим є гідроксид алюмінію, який широко застосовується в АКДП-вакцинах, анатоксинах та ряді інших бактеріальних препаратів.
- **Консерванти** — захищають препарат від мікробного забруднення, особливо в багатодозових флаконах. Наприклад, тіомерсал або фенол. Наразі тіомерсал майже не використовується у вакцинах для дітей в ЄС та США.
- **Стабілізатори** — запобігають денатурації антигенів під час зберігання. До них належать лактоза, сорбіт, желатин.
- **Буферні розчини** — забезпечують стабільний рН, наприклад, фосфатні буфери.

Стерильне фасування та упаковка. Після приготування вакцинного препарату, його:

- Стерильно фільтрують через мембрани з порами 0,22 мкм.
- Фасують у стерильні флакони, ампули або шприци.
- Закупорюють, маркують і упаковують відповідно до вимог GMP.

Ліофілізовані вакцини перед введенням потребують розведення стерильним розчинником. Обов'язково додаються інструкція для медичного застосування та сертифікати відповідності.

Контроль якості. Контроль якості охоплює всі етапи — від сировини до готової серії вакцини. Основні показники, які перевіряють:

- **Стерильність** — згідно з фармакопейними методиками (метод посіву, фільтрація).
- **Мікробіологічна чистота** — відсутність сторонніх мікроорганізмів.
- **Імуногенність** — здатність вакцини викликати відповідь у модельному організмі (найчастіше миші, кролі).
- **Токсичність** — визначається за допомогою біотестів (наприклад, LD50) або in vitro-методів.
- **Фізико-хімічні показники** — рН, осмолярність, кількість алюмінію, вміст антигену.
- **Стабільність** — перевіряється в умовах довготривалого зберігання (реальна і прискорена деградація).
- **Ідентичність антигену** — підтверджується імуноферментними, біохімічними або молекулярно-біологічними методами.

Сертифікація серії. Усі вакцини, що застосовуються в Україні, повинні пройти державний контроль у ДЕЦ МОЗ України. Після аналізу документації, методів контролю та результатів лабораторних досліджень серія отримує дозвіл на реалізацію.

Таким чином, кожен етап — від вирощування бактерій до контролю якості готової продукції — є критично важливим для забезпечення ефективності, безпеки та стабільності бактеріальних вакцин. Суворе дотримання регламентованих процедур і нормативних документів гарантує надійність і довіру до вакцин, що застосовуються в системах охорони здоров'я.

Практична частина

Тема. Групове обговорення переваг і недоліків бактеріальних вакцин

Матеріали: інформаційні довідки про типи бактерійних вакцин (живі атенуйовані, інактивовані, субдиничні, кон'юговані); презентації або відеоматеріали щодо механізмів дії бактерійних вакцин; таблиці для порівняльного аналізу характеристик вакцин (переваги, недоліки, приклади захворювань); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описом кейсів або клінічних ситуацій); доступ до мережі Інтернет (для додаткового пошуку або перегляду відео при обговоренні).

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для презентації результатів обговорення; набір маркерів для роботи в групах; листки з кейсами або прикладами клінічних ситуацій для аналізу; комп'ютер і мультимедійний проектор (за потреби — для демонстрації презентацій/відео); зошити або блокноти для індивідуальних висновків і заповнення таблиць.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з теоретичним матеріалом.

1. Ознайомтеся з основними типами бактерійних вакцин, їх будовою, прикладами та особливостями.

2. Перегляньте надану презентацію/відеофрагмент про механізм дії вакцин.

Завдання 2. У групах обговоріть переваги і недоліки бактерійних вакцин.

1. Об'єднайтеся в малі групи (по 3–5 студентів).
2. Для кожного типу вакцини заповніть таблицю.

Таблиця 28. Порівняльна характеристика бактерійних вакцин

Тип вакцини	Переваги	Недоліки	Приклади захворювань
Живі атенуйовані			
Інактивовані			
Субодиничні (анатоксини)			
Кон'юговані			

3. Обговоріть у групі:

- ✓ Який тип вакцин найефективніший у попередженні важких форм захворювань?
- ✓ Які типи вакцин можуть викликати більше побічних реакцій?
- ✓ У яких випадках не можна застосовувати живі вакцини?

4. Підготуйте коротку усну презентацію результатів вашого обговорення (до 5 хв).

Завдання 3. Узагальнення та рефлексія.

1. Обговоріть спільно:

- ✓ Яке клінічне і соціальне значення має застосування бактерійних вакцин?
- ✓ Як вакцинація змінює епідеміологічну ситуацію?
- ✓ Чому важливо дотримуватися календаря щеплень?

Завдання 4. Висновки оформіть індивідуально у вигляді відповідей:

1. Який тип бактерійної вакцини, на вашу думку, найбільш ефективний і безпечний? Чому?
2. Яку роль відіграють бактерійні вакцини в охороні громадського здоров'я?
3. Які фактори можуть впливати на вибір конкретної вакцини в клінічній практиці?

Контрольні питання

1. Які основні типи бактеріальних вакцин виокремлюють за способом підготовки антигену та принципом дії? Наведіть приклади для кожного.
2. Чим відрізняється механізм формування імунітету при введенні живих атенуйованих вакцин порівняно з інактивованими?
3. Які переваги і недоліки характерні для вакцин на основі токсинів (анатоксинів)? Які захворювання запобігаються за допомогою таких вакцин?
4. Що таке кон'юговані вакцини, і чому вони є більш ефективними у дітей до 2 років порівняно з некон'югованими полісахаридними вакцинами?

5. Опишіть послідовність основних етапів виробництва бактеріальних вакцин — від вирощування мікроорганізмів до сертифікації серії.

6. Які допоміжні речовини входять до складу бактеріальних вакцин і яку функцію виконує кожна з них (ад'юванти, стабілізатори, консерванти, розчинники)?

7. У чому полягає механізм дії бактеріальних вакцин на рівні клітинного та гуморального імунітету? Як формується імунологічна пам'ять?

8. Які типи вакцин входять до складу АКДП-препаратів і як взаємодіють між собою їхні антигени? Чим відрізняються ацелюлярні та цілюклітинні вакцини проти кашлюка?

9. Які критерії перевіряються під час контролю якості вакцин і чому цей етап є критично важливим для забезпечення безпеки?

10. Наведіть приклади комерційно доступних бактеріальних вакцин і вкажіть їхній тип, активний компонент та основні особливості застосування.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №19. Вірусні вакцини для профілактики інфекційних захворювань

***Мета:** ознайомитися з основними типами вірусних вакцин, їх класифікацією, механізмами дії, прикладами найбільш поширених вакцин (проти поліомієліту, гепатиту В, кору, паротиту, краснухи, грипу), а також із ключовими етапами їх виробництва та системою контролю якості; розвинути навички критичного аналізу шляхом групового обговорення переваг і недоліків різних типів вірусних вакцин та сформулювати обґрунтоване уявлення про їх застосування в сучасній імунопрофілактиці.*

Теоретичні відомості

1. Вірусні вакцини та їх класифікація.
2. Приклади вірусних вакцин: вакцин проти поліомієліту, гепатиту В; вакцина проти кору, паротиту та краснухи (КПК); вакцина проти грипу.
3. Механізм дії вірусних вакцин.
4. Етапи виробництва і контроль якості вірусних вакцин.

Вірусні вакцини та їх класифікація

Вірусні вакцини — це біологічні препарати, що застосовуються з метою профілактики вірусних інфекцій. Їх дія полягає у створенні специфічного імунітету проти конкретного вірусу або групи вірусів. Вакцини містять антигени вірусного походження, які не викликають захворювання, але стимулюють імунну систему до вироблення захисної відповіді.

Вірусні вакцини класифікують за типом використаного вірусного матеріалу.

Живі атенуйовані вірусні вакцини. Живі атенуйовані вакцини містять ослаблені штами вірусів, які здатні обмежено реплікуватися в організмі людини, не викликаючи при цьому захворювання. Ослаблення досягається шляхом тривалого пасажу вірусу через культуру клітин або застосуванням методів генної

інженерії. Такі вакцини імітують природну інфекцію, активуючи як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь.

Таблиця 29. Переваги, недоліки та приклади живих атенуйованих вірусних вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Потужна імунна відповідь (гуморальна і клітинна) • Тривалий захист після однієї дози • Імітація природного інфікування
Недоліки	• Протипоказані імуноскомпрометованим особам • Високі вимоги до зберігання (холодовий ланцюг) • Ризик реверсії вірулентності (вкрай рідко)
Приклад вакцини	КПК (кір, паротит, краснуха) — комбінована жива атенуйована вакцина, що застосовується для профілактики трьох захворювань у дітей. Жива вакцина проти жовтої лихоманки — рекомендована при поїздках у ендемічні регіони Африки та Південної Америки.

Інактивовані (убиті) вірусні вакцини. Інактивовані вакцини містять цілі вірусні частинки, що були повністю знешкоджені фізичними або хімічними методами (наприклад, формальдегідом, β -пропіолактоном). Вони не здатні реплікуватися, але зберігають антигенну структуру, необхідну для індукції імунної відповіді.

Таблиця 30. Переваги, недоліки та приклади інактивованих вірусних вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Абсолютна безпека (неможливість реплікації) • Підходять для імуноскомпрометованих осіб • Добре контрольована доза антигену
Недоліки	• Менш інтенсивна імунна відповідь • Переважно гуморальна імунна відповідь • Потреба в повторному введенні (бустерах)
Приклад вакцини	ІПВ (інактивована поліомієлітна вакцина) — безпечна для використання у всіх групах населення, входить до календаря щеплень. Вакцина проти гепатиту А — показана для осіб, які подорожують до ендемічних регіонів.

Субодиничні та рекомбінантні вакцини. Субодиничні вакцини містять лише окремі вірусні білки (антигени), які були очищені з вірусних частинок або отримані за допомогою технологій рекомбінантної ДНК. Вони не містять живих вірусів і тому є надзвичайно безпечними.

Таблиця 31. Переваги, недоліки та приклади субодиничних та рекомбінантних вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Високий профіль безпеки • Можливість точного дозування • Підходять для широких вікових груп
Недоліки	• Не завжди формують клітинну імунну відповідь • Часто потребують ад'ювантів для посилення ефекту • Можуть потребувати бустерних доз

Приклад вакцини	Вакцина проти гепатиту В (Engerix-B, Recombivax HB) — містить рекомбінантний поверхневий антиген HBsAg. Вакцина проти ВПЛ (HPV) — (Gardasil, Cervarix) — профілактика раку шийки матки.
------------------------	--

Векторні вірусні вакцини. Векторні вакцини використовують безпечні віруси (вектори), у геном яких вбудований ген, що кодує антиген іншого вірусу. Після введення в організм вектор доставляє цей ген до клітин, де синтезується відповідний антиген, що стимулює імунну відповідь.

Таблиця 32. Переваги, недоліки та приклади векторних вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Потужна імунна відповідь (гуморальна і клітинна) • Можливість включення кількох генів (мультивалентність) • Не потребують використання самого вірусу-патогену
Недоліки	• Імунітет до вектора може зменшувати ефективність • Складність у виробництві • Менше досвіду тривалого застосування
Приклад вакцини	Vaxzevria (AstraZeneca) — векторна вакцина проти COVID-19 на основі аденовірусу шимпанзе.

мРНК-вакцини. мРНК-вакцини — інноваційна платформа, яка використовує синтетичну матричну РНК (мРНК), що кодує вірусний антиген. Після введення мРНК проникає в цитоплазму клітин, де починається синтез антигену, який запускає імунну відповідь.

Таблиця 33. Переваги, недоліки та приклади мРНК-вакцин

Критерій	Опис
Переваги	• Висока ефективність • Швидкість розробки та виробництва • Відсутність вірусного білка чи геному • Добре підходить для масового виробництва
Недоліки	• Високі вимоги до умов зберігання та транспортування (-70°C) • Відносно нова технологія — обмежені довгострокові спостереження • Потреба в кількох дозах
Приклад вакцини	Comirnaty (Pfizer/BioNTech) та Moderna (mRNA-1273) — вакцини проти COVID-19, що зарекомендували себе як високоефективні засоби профілактики тяжкого перебігу хвороби.

Приклади вірусних вакцин

У таблиці наведено основні приклади вірусних вакцин, які широко застосовуються в сучасній медичній практиці для профілактики поширених вірусних інфекцій.

Таблиця 34. Приклади вірусних вакцин та їх характеристика

№	Назва вакцини	Тип вакцини	Активний компонент	Комерційні препарати	Особливості застосування
1	Вакцина проти поліомієліту	Жива атенуйована (ОПВ) /	Ослаблені або інактивовані віруси	Imovax Polio (Sanofi), Poliorix (GSK)	ОПВ застосовується перорально; ІПВ — у вигляді ін'єкцій. ІПВ безпечна для

		Інактивована (ІПВ)	поліомієліту типів 1, 2, 3		імуноскомпрометованих. Вакцинація є обов'язковою в більшості країн.
2	Вакцина проти гепатиту В	Рекомбінантна субодинична	Поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg)	Engerix-B (GSK), Recombivax HB (MSD)	Проводиться з перших днів життя. Обов'язкова для новонароджених, медиків, осіб з хронічними хворобами печінки.
3	Вакцина проти кору, паротиту, краснухи (КПК)	Жива атенуйована комбінована	Ослаблені штами вірусів кору, паротиту, краснухи	Priorix (GSK), M-M-R II (MSD)	Входить до календаря щеплень. Перше введення — у 12 міс., ревакцинація — у 6 років. Забезпечує довготривалий імунітет.
4	Вакцина проти грипу	Інактивована / Субодинична / Жива атенуйована	Інактивовані віруси або очищені білки гемаглютиніну	Vaxigrip Tetra (Sanofi), FluMist (AstraZeneca), Influvac (Abbott)	Проводиться щорічно, особливо рекомендована для літніх людей, дітей, медпрацівників. Живі форми — назальні, переважно для дітей.

Механізм дії вірусних вакцин

Механізм дії вірусних вакцин ґрунтується на здатності імунної системи розпізнавати вірусні антигени, формувати специфічну імунну відповідь і зберігати імунологічну пам'ять. Введення вакцини імітує природне вірусне інфікування, не викликаючи хвороби, але стимулюючи організм до захисту у разі майбутнього контакту зі збудником.

Первинна імунна відповідь після вакцинації. Після введення вірусної вакцини активні компоненти (атенуйовані віруси, інактивовані вірусні частинки, вірусні білки, РНК або векторні конструкції) розпізнаються антиген-презентуючими клітинами (макрофагами, дендритними клітинами). Ці клітини обробляють антиген і презентують його за допомогою молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) Т-лімфоцитам.

Далі відбувається активація специфічних Т-лімфоцитів (цитотоксичних Т-клітин або Т-хелперів), які стимулюють В-лімфоцити. Останні диференціюються в плазматичні клітини, що починають виробляти антитіла проти вірусного антигену. Паралельно формується пул клітин пам'яті, які зберігаються в організмі протягом тривалого часу.

Роль гуморальної та клітинної імунної відповіді. Залежно від типу вакцини активуються різні ланки імунної системи:

- **Живі атенуйовані вакцини** (наприклад, КПК-вакцина) імітують природне вірусне інфікування. Вони забезпечують як гуморальну (вироблення антитіл), так і клітинну (активація цитотоксичних Т-лімфоцитів) імунну відповідь. Це важливо для боротьби з внутрішньоклітинними вірусами.

- **Інактивовані вакцини** (наприклад, ІПВ проти поліомієліту) активують переважно гуморальну відповідь. Оскільки вони не проникають у клітини, клітинна відповідь виражена слабше. У зв'язку з цим може знадобитися кілька доз (бустерна імунізація).

- **Субодиничні та рекомбінантні вакцини** (наприклад, вакцина проти гепатиту В) містять окремі вірусні білки. Вони стимулюють переважно В-

лімфоцити до вироблення специфічних антитіл. Клітинна відповідь незначна, тому часто додаються ад'юванти.

- **Векторні вакцини** (наприклад, Vaxzevria проти COVID-19) використовують безпечні вірусні вектори (наприклад, аденовіруси), що експресують генетичний матеріал іншого вірусу. Вектор проникає в клітину, викликаючи як гуморальну, так і клітинну відповідь.

- **мРНК-вакцини** (наприклад, Comirnaty від Pfizer/BioNTech) забезпечують синтез вірусного білка в організмі з введеної РНК. Цей білок потім обробляється як ендogenous антиген, що стимулює як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь.

Імунологічна пам'ять. Формування імунної пам'яті — ключовий ефект вакцинації. Після першого контакту з антигеном формуються Т- і В-клітини пам'яті. При подальшому потраплянні вірусу в організм ці клітини швидко активуються, ініціюючи вторинну імунну відповідь, яка є швидшою і сильнішою. Завдяки цьому або запобігається розвиток хвороби, або інфекція перебігає у легкій формі.

Таблиця 35. Типи імунної відповіді в залежності від типу вакцини

Тип вакцини	Основна імунна відповідь
Жива атенуйована	Гуморальна + клітинна
Інактивована	Гуморальна
Субодинична/рекомбінантна	Гуморальна
Векторна	Гуморальна + клітинна
мРНК-вакцина	Гуморальна + клітинна

Значення бустерної імунізації. Багато вірусних вакцин потребують введення декількох доз для:

- формування первинної імунної відповіді,
- підвищення титру антитіл до захисного рівня,
- підтримання тривалого захисту.

Наприклад, вакцинація проти гепатиту В включає три дози, вакцинація проти грипу проводиться щорічно через антигенну варіабельність вірусу, а вакцини проти COVID-19 часто доповнюються бустерними дозами для підвищення ефективності.

Таблиця 36. Приклади механізмів дії вірусних вакцин залежно від типу

Тип вакцини	Механізм дії	Приклад вакцини
Живі атенуйовані	Реплікуються в клітинах → активація Т- та В-лімфоцитів → тривала імунна пам'ять	КПК (кір, паротит, краснуха), вакцина проти жовтої лихоманки
Інактивовані	Антигени поглинаються APC → активація В-лімфоцитів → синтез антитіл	ІПВ (поліомієліт), вакцина проти гепатиту А
Субодиничні/рекомбінантні	Вірусні білки активують В-лімфоцити → вироблення антитіл	Гепатит В (Engerix-B), HPV (Gardasil)
Векторні	Вектор доставляє ген антигену → синтез білка → активація Т- і В-лімфоцитів	Vaxzevria (AstraZeneca)

мРНК-вакцини	РНК експресується в клітині → синтез антигену → активація гуморальної і клітинної відповіді	Comirnaty (Pfizer/BioNTech), Moderna
---------------------	--	--

Ефективність вірусних вакцин базується на імітації вірусної інфекції без патогенності. Успішна імунізація забезпечує швидку, специфічну та довготривалу імунну відповідь. Глибоке розуміння механізмів дії різних типів вірусних вакцин дозволяє формувати обґрунтовані стратегії профілактики, особливо у вразливих групах населення.

Етапи виробництва і контроль якості вірусних вакцин

Виробництво вірусних вакцин — це багатоступеневий, високоспеціалізований біотехнологічний процес, який потребує суворого дотримання міжнародних стандартів, зокрема вимог належної виробничої практики (GMP). Усі етапи — від вибору штаму до контролю готової серії — проводяться у стерильних умовах із ретельним моніторингом середовища, обладнання та персоналу.

Вибір і підготовка вірусного штаму. Першим кроком є відбір вірусного штаму, що відповідає вимогам безпеки, імуногенності та стабільності. Залежно від типу вакцини:

- **Атенуйовані вакцини** створюють шляхом багаторазових пасажів або генної модифікації, що призводить до зниження вірулентності;
- **Інактивовані вакцини** використовують повністю інактивовані патогени;
- **Рекомбінантні вакцини** отримують шляхом експресії вірусних антигенів у клітинах-господарях (наприклад, дріжджах або клітинах CHO).

Культивування вірусу. Вірус культивується у контрольованих умовах. Основними системами культивування є клітинні культури (наприклад, Vero, MRC-5, HEK293, CHO), ембріоновані курячі яйця (широко використовуються для виробництва грипозної вакцини), біореактори з суспензійними культурами (для масштабного виробництва).

Оптимальні умови (рН, температура, аерація, живильне середовище) підтримуються автоматично.

Інактивація або ослаблення. В залежності від типу вакцини інактивація вірусу проводиться з використанням хімічних агентів (формальдегід, β -пропіолактон) або фізичних методів. Важливо зберегти конформаційну цілісність антигенів для імунної ефективності. Атенуація здійснюється шляхом добору маловірулентних варіантів або за допомогою генної інженерії. Такі вакцини зберігають здатність до реплікації, але не спричиняють захворювання.

Очищення і концентрування антигенів. На цьому етапі проводиться видалення сторонніх домішок, клітинного детриту, токсинів або залишків середовища. Основні методи очищення:

- центрифугування та мікрофільтрація,
- хроматографія (іонообмінна, афінна, гель-фільтрація),
- ультрафільтрація та діаліз.

Метою є отримання високочистого антигенного препарату з максимальною імуногенністю.

Формулювання вакцини. До очищеного антигену додаються допоміжні компоненти для стабільності та підсилення імунної відповіді: ад'юванти — найчастіше гідроксид або фосфат алюмінію (наприклад, у вакцині проти гепатиту В), консерванти — тіомерсал, фенол, 2-феноксиетанол (зазвичай у багатодозових флаконах), стабілізатори — лактоза, желатин, сахароза (важливі для збереження активності під час ліофілізації), буферні системи — фосфатні чи цитратні для підтримання рН.

У мРНК-вакцинах формулювання також включає ліпідні наночастинки, які забезпечують доставку РНК до клітин.

Стерильне фасування і ліофілізація. Формуловану вакцину: стерильно фільтрують (0,22 мкм), фасують у стерильні флакони, ампули або попередньо заповнені шприци, при необхідності — ліофілізують для подальшого розведення перед введенням. До кожної упаковки додається інструкція для медичного застосування, сертифікати відповідності та захисні етикетки.

Контроль якості вакцини. Контроль якості проводиться на всіх етапах виробництва відповідно до національних і міжнародних фармакопей. Основні показники:

- **Стерильність** (відсутність живих мікроорганізмів),
- **Імуногенність** (здатність індукувати імунну відповідь у модельних тварин або *in vitro*),
- **Ідентичність антигену** (методами ІФА, Вестерн-блоту або секвенування),
- **Вміст антигену** (кількісний аналіз),
- **Відсутність токсичних домішок** (залишкові реактиви, клітинні білки),
- **Стабільність** (здатність зберігати властивості у заданих умовах — температура, світло, час).

Сертифікація серії вакцин. В Україні контроль здійснюється Державним експертним центром МОЗ (ДЕЦ МОЗ). Перед дозволом на реалізацію кожна серія вакцини проходить: лабораторні випробування, перевірку виробничої документації, підтвердження відповідності специфікаціям і реєстраційним вимогам.

Етапи виробництва вірусних вакцин вимагають високого рівня біобезпеки, технологічної точності та ретельного контролю. Результатом є препарати, які не тільки забезпечують індивідуальний захист, а й створюють основи для колективного імунітету. Сучасні технології — включно з мРНК- і векторними платформами — значно розширили можливості швидкої розробки та масштабного виробництва ефективних вірусних вакцин, що особливо актуально під час пандемій.

Практична частина

Тема. Групове обговорення переваг і недоліків вірусних вакцин

Матеріали: інформаційні довідки про типи вірусних вакцин (живі атенуйовані, інактивовані, субодиничні, векторні, мРНК-вакцини); презентації

або відеоматеріали щодо механізмів дії вірусних вакцин; таблиці для порівняльного аналізу характеристик вакцин (переваги, недоліки, приклади захворювань); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описом кейсів або клінічних ситуацій); доступ до мережі Інтернет (для додаткового пошуку або перегляду відео при обговоренні).

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для презентації результатів обговорення; набір маркерів для роботи в групах; листки з кейсами або прикладами клінічних ситуацій для аналізу; комп'ютер і мультимедійний проектор (за потреби — для демонстрації презентацій/відео); зошити або блокноти для індивідуальних висновків і заповнення таблиць.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з теоретичним матеріалом.

1. Ознайомтеся з основними типами вірусних вакцин, їх структурою, механізмом дії та прикладами.

2. Перегляньте презентацію або відеоматеріал щодо імунологічної відповіді на вірусні вакцини.

Завдання 2. У групах обговоріть переваги і недоліки вірусних вакцин.

1. Об'єднайтеся в малі групи (по 3–5 студентів).

2. Для кожного типу вірусної вакцини заповніть таблицю.

Таблиця 37. Порівняльна характеристика вірусних вакцин

Тип вакцини	Переваги	Недоліки	Приклади захворювань
Живі атенуйовані			
Інактивовані			
Субдиннічні (вірусні білки, ВПЧ, гепатит В)			
Векторні (напр. AstraZeneca, Johnson&Johnson)			
мРНК-вакцини			

3. Обговоріть у групі:

- Який тип вакцин найефективніший у запобіганні тяжкому перебігу вірусних інфекцій?

- Які типи вакцин потенційно мають більше побічних реакцій?

- У яких ситуаціях небажано застосовувати живі вакцини?

4. Підготуйте коротку усну презентацію (до 5 хв) з висновками вашої групи.

Завдання 3. Узагальнення та рефлексія.

1. Обговоріть спільно:

- Яке клінічне та епідеміологічне значення має використання вірусних вакцин?

- Як масова вакцинація змінює динаміку вірусних захворювань у популяції?

- Які виклики стоять перед суспільством у контексті впровадження нових типів вірусних вакцин?

Завдання 4. Оформіть письмово короткі (індивідуальна робота) відповіді на такі питання:

1. Який тип вірусної вакцини, на вашу думку, найбільш ефективний і безпечний? Аргументуйте.
2. Яку роль вірусні вакцини відіграють у системі громадського здоров'я?
3. Які фактори можуть впливати на вибір типу вакцини для конкретного пацієнта або популяції (вік, імунний статус, епідеміологічна ситуація тощо)?

Контрольні питання

1. Що лежить в основі класифікації вірусних вакцин і які основні типи виділяють?
2. Яким чином живі атенуйовані вірусні вакцини імітують природну інфекцію?
3. У чому полягають основні переваги та недоліки живих атенуйованих вірусних вакцин? Наведіть приклади.
4. Як здійснюється інактивація вірусів для виготовлення інактивованих вакцин? Які переваги має цей тип вакцин?
5. Чим субодиничні та рекомбінантні вакцини відрізняються від інших типів вірусних вакцин за складом та механізмом дії?
6. Наведіть приклади вакцин, створених за допомогою рекомбінантної ДНК-технології. Які антигени вони містять?
7. Який принцип дії векторних вірусних вакцин і в чому полягає їхня імуногенна перевага?
8. Які ризики можуть бути пов'язані з використанням вірусного вектора у векторних вакцинах?
9. Що є активним компонентом мРНК-вакцин і як цей тип вакцин забезпечує імунізацію організму?
10. Поясніть, чому мРНК-вакцини вимагають особливих умов транспортування та зберігання.

ЧАСТИНА 5. РОЗРОБКА НОВІТНІХ ВАКЦИН

Сучасна імунологія та біотехнологія активно розвивають нові підходи до створення вакцин, що забезпечують ефективний захист від інфекційних захворювань. Вакцини третього та четвертого поколінь є результатом інноваційних технологій, які дозволяють отримувати вискоєфективні препарати з мінімальними побічними ефектами та високою специфічністю.

Лабораторні роботи цієї частини присвячені вивченню:

- векторних (рекомбінантних) вакцин – вакцин, що використовують безпечні вірусні вектори або вірусоподібні частинки для імунізації. Приклади таких вакцин включають AstraZeneca (Covishield), Janssen (Johnson & Johnson), Dengvaxia та Gardasil;
- вакцин на основі нуклеїнових кислот (РНК- і ДНК-вакцин), які забезпечують інструкції для синтезу антигенів безпосередньо в клітинах організму. Відомі приклади: Pfizer-BioNTech (Comirnaty) та Moderna (Spikevax);

- антиідіотипічних вакцин та вакцин на основі наночастинок, які відкривають нові можливості у вакцинації проти вірусних та онкологічних захворювань.

Практичні заняття передбачають перегляд та обговорення демонстраційних відео про розробку і дію новітніх вакцин, що допоможе студентам глибше зрозуміти їхні механізми, переваги та перспективи застосування. Вивчення цих технологій є важливим кроком для формування майбутніх фахівців у сфері біотехнології, імунології та медицини.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №20. Вакцини третього покоління

Мета: ознайомитися з основними принципами створення вакцин третього покоління, зокрема векторних (рекомбінантних) вакцин і вакцин на основі вірусоподібних частинок: дослідити їхню будову, механізм дії, біотехнологічні особливості отримання та переваги у порівнянні з традиційними вакцинами; на основі перегляду демонстраційних відеоматеріалів про приклади сучасних векторних вакцин (проти COVID-19, Еболи, Денге) і вакцин на основі VLP (проти ВПЛ та гепатиту В) проаналізувати особливості їх клінічного застосування та оцінити потенціал у боротьбі з інфекційними захворюваннями.

Теоретичні відомості

1. Векторні (рекомбінантні) вакцини.
2. Технологія отримання векторних вакцин і їх переваги.
3. Вірусні вектори.
4. Принцип дії векторних вакцин.
5. Вакцини на основі вірусоподібних частинок.

Вакцини третього покоління — це новітнє покоління вакцин, яке базується на використанні генно-інженерних технологій, що дозволяють отримувати антигени або їх генетичні коди без безпосереднього використання живих або інактивованих збудників. Вони характеризуються високим рівнем безпеки, цілеспрямованістю дії та можливістю швидкої адаптації під нові інфекційні виклики.

Основними типами вакцин третього покоління є:

- Векторні (рекомбінантні) вакцини,
- ДНК- та РНК-вакцини (іноді виділяють як окрему групу),
- Вакцини на основі вірусоподібних частинок (VLP, virus-like particles).

Векторні (рекомбінантні) вакцини

Векторні вакцини — це інноваційні біопрепарати, створені за допомогою технологій генної інженерії, які використовують модифіковані вірусні або бактеріальні вектори для доставки генетичного матеріалу, що кодує один або кілька антигенів збудника. Після введення в організм вектор проникає у клітини, де за допомогою клітинного апарату відбувається експресія гену антигену. Цей

антиген розпізнається імунною системою як чужорідний, що призводить до активації як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді.

На відміну від традиційних вакцин, які містять ослаблені або інактивовані форми патогену чи очищені білки, векторні вакцини не містять самого збудника хвороби. Це робить їх безпечними, але водночас — високоефективними завдяки внутрішньоклітинному синтезу антигенів.

Особливості векторних вакцин полягають у їхній високій ефективності та безпеці. Оскільки такі вакцини не містять повноцінного патогену, вони не здатні спричинити захворювання, але водночас викликають потужну імунну відповідь. Векторні платформи забезпечують як утворення антитіл, так і стимуляцію Т-клітинної відповіді, що є ключовим для формування тривалого імунітету. Крім того, технологія дозволяє проводити генетичну модифікацію векторів, включаючи кілька генів, які кодують різні антигени, що робить можливим створення мультівалентних вакцин. Такі платформи особливо цінні у випадку боротьби з вірусами, що мають високу варіабельність і швидко мутують (наприклад, SARS-CoV-2). Завдяки технологічній гнучкості створення векторних вакцин може бути адаптоване для швидкого реагування на нові виклики, зокрема пандемії.

Серед основних типів векторів, що застосовуються у вакцинології, найпоширенішими є аденовіруси людини та тварин. Також широко досліджуються вектори на основі вірусу везикулярного стоматиту (VSV), який застосовувався, зокрема, для створення вакцини проти вірусу Ебола, а також модифікований вірус віспи (Modified Vaccinia Ankara, MVA), який є безпечним навіть для імунокомпрометованих осіб. Бактеріальні вектори перебувають на стадії активних досліджень і поки що рідше використовуються на практиці, однак мають потенціал для створення нових типів імунобіологічних препаратів.

Таблиця 38. Приклади векторних вакцин

Назва вакцини	Тип вектора	Цільовий антиген	Комерційні назви	Особливості
Vaxzevria (AstraZeneca)	Аденовірус шимпанзе (ChAdOx1)	Спайковий білок SARS-CoV-2	Vaxzevria	Вектор не має попереднього імунітету у людей; дводозна схема
Jcovden (Janssen/Johnson&Johnson)	Аденовірус людини серотипу 26 (Ad26)	Спайковий білок SARS-CoV-2	Jcovden	Одностозна вакцина, що зручна для масової імунізації
rVSV-ZEBOV	Вірус везикулярного стоматиту (рекомбінантний)	Глікопротеїн вірусу Ебола	Ervebo	Перша ефективна вакцина проти вірусу Ебола, схвалена ВООЗ і FDA
MVA-BN (Imvanex / Jynneos)	Модифікований вірус віспи (Modified Vaccinia Ankara)	Антигени вірусу мавпячої віспи	Imvanex, Jynneos	Застосовується для профілактики віспи і мавпячої віспи

Ad5-nCoV (Convidecia)	Аденовірус людини серотипу 5	Спайковий білок SARS-CoV-2	Convidecia (CanSino Biologics)	Однодозна вакцина, використовується в деяких країнах Азії та Латинської Америки
Viral vector vaccines проти ВІЛ, малярії, туберкульозу	Різні віруси (в стадії клінічних досліджень)	Відповідні поверхневі або структурні антигени	—	Потенційно ефективна стратегія проти хронічних інфекцій

Універсальність платформи. Векторні вакцини легко адаптуються під нові віруси, що робить їх надзвичайно перспективними для майбутнього. Наприклад, після секвенування нового збудника можна створити відповідний рекомбінантний вектор упродовж кількох тижнів, що дає перевагу під час спалахів нових інфекцій.

Технологія отримання векторних вакцин і їх переваги

Векторні вакцини є одним із найперспективніших типів вакцин третього покоління, створених на основі методів генетичної інженерії. Їхня дія базується на доставці в організм людини або тварини гена, що кодує один або кілька імуногенних білків (антигенів) патогену, за допомогою спеціально сконструйованого безпечного вірусу-вектора.

Етапи створення векторної вакцини:

1. Вибір відповідного векторного носія. Найчастіше використовуються аденовіруси, вірус коров'ячої віспи (вакцинія), вірус кору, цитомегаловірус або інші рекомбінантні вірусні платформи, що є безпечними та позбавлені здатності викликати захворювання. Вектор підбирається залежно від цільової популяції, бажаної імунної відповіді та особливостей вакцинованого організму.

2. Інтеграція гена, що кодує антиген патогену. У вектор за допомогою методів рекомбінантної ДНК-технології вбудовується генетична послідовність, яка кодує імуноген — наприклад, спайковий (S) білок SARS-CoV-2. Такий білок є специфічною мішенню для імунної системи й здатен індукувати утворення антитіл.

3. Створення рекомбінантного векторного геному. Після вбудови гена у вектор утворюється рекомбінантна вірусна ДНК (або РНК), яка є основою для синтезу повноцінного векторного препарату. Важливо, щоб ця конструкція була стабільною, не містила вірулентних генів і ефективно експресувала антиген у клітинах організму-господаря.

4. Розмноження рекомбінантного вірусу в клітинній культурі. Отриманий рекомбінантний вірус культивується у відповідних клітинних лініях (наприклад, HEK293 або Vero), де він розмножується та забезпечує накопичення вакцинного матеріалу.

5. Очищення, формулювання та контроль якості вакцини. Після збору рекомбінантного вектору проводиться ретельне очищення від клітинних

домішок і неактивних частинок. Вакцина формулюється з додаванням стабілізаторів, за потреби — ад’ювантів, і проходить контроль якості на стерильність, безпечність, генетичну стабільність та імуногенність.

Таблиця 39. Переваги, обмеження і недоліки векторних вакцин

Категорія	Опис
Переваги	- Потужна гуморальна і клітинна імунна відповідь - Висока специфічність і тривалість імунітету - Можливість вбудови кількох антигенних генів (мультивалентність) - Не потребують роботи з живим патогеном - Швидка розробка нових вакцин при виникненні нових інфекцій - Придатність для масштабного виробництва
Обмеження	- Існуючий імунітет до вектору (наприклад, аденовірусу) може знижувати ефективність - Обмежене багаторазове введення через імунну відповідь до вектора - Вимагають зберігання і транспортування при контрольованих умовах
Недоліки	- Складні технології виготовлення - Необхідність використання рекомбінантної ДНК/РНК технології - Високі вимоги до контролю безпеки і стабільності - Дорожче виробництво у порівнянні з класичними вакцинами

Вірусні вектори

Вірусні вектори — це віруси, що були генно модифіковані для втрати патогенності й отримання здатності експресувати чужорідні гени. Найпоширенішими є вектори, наведені у таблиці нижче.

Таблиця 40. Переваги, обмеження і недоліки векторних вакцин

Тип вектора	Переваги	Недоліки	Приклади
Аденовіруси (людини/шимпанзе)	Швидка експресія, ефективна трансдукція	Імунітет до вектора	Vaxzevria, Jcovden
Вірус везикулярного стоматиту (VSV)	Потужна клітинна відповідь, висока імуногенність	Менше досвіду використання	Ervebo (Ебола)
Модифіковані віруси віспи (MVA)	Дуже безпечні, обмежена реплікація	Нижча експресія антигену	Вакцини проти віспи, експериментальні проти БІЛ

Принцип дії векторних вакцин

Принцип дії векторних вакцин полягає в доставці генетичної інформації, що кодує антиген збудника захворювання, до клітин організму-реципієнта за допомогою спеціального вектора — найчастіше це модифікований вірус, позбавлений здатності до розмноження і патогенності. Такий вектор слугує «транспортном» для доставки гена в організм людини.

Після введення вакцини вектор інфікує певні клітини організму — зазвичай це м’язові клітини або дендритні клітини, які відіграють ключову роль

у запуску імунної відповіді. Потрапивши до клітини, вектор вивільняє свій рекомбінантний геном, який містить ген, що кодує цільовий антиген — наприклад, спайковий білок вірусу SARS-CoV-2.

Далі в клітині відбувається транскрипція й трансляція цього гена, в результаті чого синтезується вірусний або бактеріальний білок-антиген. Цей білок потім процесується і презентується на поверхні клітини в комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС I — для залучення CD8⁺ Т-клітин, або МНС II — для активації CD4⁺ Т-хелперів). Таким чином, імунна система розпізнає ці клітини як "інфіковані" і запускає імунну відповідь.

У відповідь на презентацію антигену активуються Т-лімфоцити, зокрема CD8⁺ цитотоксичні Т-клітини, що можуть знищувати інфіковані клітини, а також CD4⁺ Т-хелпери, які стимулюють В-лімфоцити до продукції специфічних антитіл. Утворюються також клітини імунної пам'яті, які забезпечують тривалий захист при повторному контакті з патогеном.

Отже, векторні вакцини імітують природну вірусну інфекцію, але без ризику захворювання, що дозволяє сформувати потужну гуморальну (антитіла) та клітинну (Т-клітини) імунну відповідь, а також забезпечити довготривалий захист.

Вакцини на основі вірусоподібних частинок

Принцип дії вакцин на основі вірусоподібних частинок (VLP-вакцин) ґрунтується на імітації структури справжнього вірусу без ризику інфекційного процесу. Вірусоподібні частинки (VLP, *virus-like particles*) — це наноструктури, що формуються з вірусних білків, які самозбираються у капсидоподібні оболонки, але при цьому не містять генетичного матеріалу. Відповідно, VLP не мають здатності до реплікації і не можуть спричинити інфекцію.

Такі частинки створюються за допомогою рекомбінантних технологій, найчастіше — у дріжджах (*Saccharomyces cerevisiae*), клітинах комах (з використанням баціловірусних векторів) або в системах клітин ссавців. Синтезовані вірусні білки мають здатність до самозбирання у структури, морфологічно подібні до справжнього вірусу, що забезпечує ефективне розпізнавання з боку імунної системи.

Таблиця 41. Приклади VLP-вакцин

Вакцина	Цільовий вірус	Тип	Комерційна назва
Проти ВПЛ (вірус папіломи людини)	HPV 6, 11, 16, 18	VLP	Gardasil, Cervarix
Проти гепатиту В	HBV	VLP	Engerix-B, Recombivax HB
Кандидатні вакцини	SARS-CoV-2, HBV, B11	Розробляються	—

Після введення в організм, вірусоподібні частинки розпізнаються імунною системою як «загроза», завдяки характерним вірусним епітопам на своїй поверхні. Антигенпрезентуючі клітини (зокрема, дендритні клітини) захоплюють ці частинки, процесують їх і презентують антигенні фрагменти на своїй поверхні в комплексі з молекулами МНС. Це призводить до активації Т-

хелперів (CD4⁺), які в свою чергу стимулюють В-лімфоцити до продукції специфічних антитіл проти вірусних білків, з яких складається VLP.

Таким чином формується ефективна гуморальна імунна відповідь, яка супроводжується утворенням клітин імунної пам'яті. У разі майбутнього контакту з відповідним патогеном, імунна система швидко розпізнає вірус за тими ж антигенами та ефективно нейтралізує його, не дозволяючи розвитку захворювання.

Перевагами VLP-вакцин є їхня висока імуногенність, що забезпечується завдяки структурній подібності до природного вірусу, навіть без наявності генетичного матеріалу. Така конструкція гарантує високу безпеку, оскільки виключає ризик реплікації або зворотної мутації. Крім того, платформа VLP дозволяє створювати мультівалентні вакцини, які включають декілька типів вірусних антигенів, що забезпечує захист проти кількох серотипів збудника одночасно.

Ці особливості роблять VLP-вакцини перспективними для профілактики інфекцій, що викликаються складними вірусами, такими як папіломавірус людини (HPV), гепатит В, вірус Норовок та інші.

Вакцини третього покоління є результатом стрімкого розвитку біотехнологій і молекулярної біології. Завдяки високій імуногенності, безпеці та адаптивності вони відкривають нові можливості для ефективної профілактики вірусних і бактеріальних інфекцій. У часи пандемій, таких як COVID-19, саме векторні та мРНК-вакцини забезпечили швидку і масштабну імунопрофілактику. Подальші дослідження і вдосконалення цих платформ — ключ до розвитку вакцин майбутнього.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційних відео про векторні вакцини третього покоління

Матеріали: інформаційні довідки про вакцини третього покоління: векторні вакцини (AstraZeneca / Covishield, Janssen / Johnson & Johnson, rVSV-ZEBOV для вірусу Ебола, Dengvaxia для вірусу Денге); вакцини на основі вірусоподібних частинок (VLP) — Gardasil (проти вірусу папіломи людини), Hepplisav-B (гепатит В); підготовлені відеоматеріали або посилання на офіційні демонстраційні відео (CDC, WHO, FDA, YouTube); таблиці для порівняльного аналізу характеристик вакцин (тип вакцини, принцип дії, переваги, недоліки, приклади захворювань); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описами клінічних кейсів); доступ до мережі Інтернет (для перегляду відео або додаткового пошуку інформації).

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для представлення результатів групової роботи; маркерні ручки для обговорення в групах; листки з кейсами або прикладами клінічних ситуацій для аналізу; комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету; мультимедійний проектор для демонстрації відеоматеріалів; зошити або блокноти для індивідуальних записів та заповнення таблиць.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з поняттям «вакцини третього покоління».

1. Ознайомтеся з короткою інформацією про основні платформи вакцин третього покоління:

- Векторні вакцини
- Вірусоподібні частинки (VLP-вакцини)

2. Обговоріть з викладачем переваги й недоліки таких технологій: безпечність, специфічність, можливість масштабування, використання у різних вікових групах.

Завдання 2. Перегляньте демонстраційні відео.

1. Перегляньте фрагменти (2–7 хв) відео про такі вакцини:

- **Векторні вакцини:** AstraZeneca (Covishield), Janssen (Johnson & Johnson), rVSV-ZEBOV (проти вірусу Ебола), Dengvaxia (вакцина проти вірусу Денге)

- **Вакцини на основі VLP:** Gardasil (проти вірусу папіломи людини), Hepelisav-B (проти гепатиту В)

2. Під час перегляду студенти заповнюють таблицю:

Таблиця 42. Порівняння векторних вакцин третього покоління

Назва вакцини	Тип вакцини (векторна / VLP)	Принцип дії	Переваги	Обмеження / недоліки	Цільове захворювання

Завдання 3. Групова дискусія.

1. Об'єднайтесь у групи по 3–5 осіб.

2. Обговоріть:

- Які платформи вакцин є найперспективнішими для швидкої розробки нових вакцин?

- Які складнощі можуть виникнути під час використання векторних вакцин у масштабних кампаніях?

- Як вакцина Gardasil змінила підхід до профілактики ВПЛ-інфекцій та онкопатологій?

3. Презентуйте основні висновки своєї групи усно або у вигляді короткої схеми на дошці/фліпчарті.

Завдання 4. Індивідуальні висновки.

1. Яка вакцина справила на вас найбільше враження? Чому?

2. Який тип вакцин третього покоління, на вашу думку, має найбільше майбутнє у профілактиці вірусних хвороб?

3. Яке значення мають такі вакцини в епідеміології глобальних загроз (COVID-19, Ебола, гепатит В)?

Контрольні питання

1. Що таке вакцини третього покоління і в чому полягає їх принципова відмінність від традиційних вакцин?
2. Які основні типи вакцин третього покоління ви можете назвати? У чому полягає суть кожного з них?
3. Який механізм дії векторної вакцини? Як формується імунна відповідь після її введення?
4. Чим відрізняється аденовірусний вектор від інших вірусних векторів, що застосовуються у вакцинології? Наведіть приклади вакцин, у яких він використовується.
5. У чому полягають переваги векторних вакцин у порівнянні з вакцинами на основі інактивованих або атенуйованих вірусів?
6. Які існують обмеження та потенційні недоліки векторних вакцин з точки зору їх ефективності та повторного введення?
7. Як створюються вірусоподібні частинки (VLP) для виготовлення вакцин і яку роль відіграє їх структура у формуванні імунної відповіді?
8. Чому вакцини на основі вірусоподібних частинок вважаються безпечними? У яких випадках їх застосування є найбільш доцільним?
9. Які сучасні вакцини (комерційні назви) є прикладами векторних та VLP-вакцин, і проти яких збудників вони спрямовані?
10. Яке значення мають вакцини третього покоління у боротьбі з пандеміями та які перспективи розвитку цієї платформи в майбутньому?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №21. Вакцини четвертого покоління

Мета: сформувати цілісне уявлення про вакцини четвертого покоління як інноваційний напрям сучасної імунопрофілактики, ознайомити здобувачів освіти з принципами дії та технологією створення вакцин на основі нуклеїнових кислот (РНК- та ДНК-вакцини), антиідіотипічних вакцин та вакцин з використанням наночастинок; проаналізувати приклади клінічного використання вакцин четвертого покоління (зокрема, Comirnaty, Spikevax, INO-4800, Novavax), порівняти їхні особливості, механізми дії, переваги й обмеження, а також обґрунтувати перспективи подальшого розвитку даних платформ в умовах глобальних епідеміологічних викликів.

Теоретичні відомості

1. Вакцини на основі нуклеїнових кислот: РНКі ДНК-вакцини.
2. Антиідіотипічні вакцини.
3. Вакцини на основі наночастинок.

Вакцини четвертого покоління — це новітній етап у розвитку імунопрофілактики, який ґрунтується на використанні досягнень генної інженерії, нанотехнологій та імунології. Вони спрямовані на точну і швидку індукцію адаптивної імунної відповіді з високою специфічністю та безпекою. До цього покоління належать вакцини на основі нуклеїнових кислот (РНК- та ДНК-вакцини), антиідіотипічні вакцини та вакцини на основі наночастинок.

Вакцини на основі нуклеїнових кислот: РНК- та ДНК-вакцини

РНК-вакцини (англ. messenger RNA, mRNA vaccines) і **ДНК-вакцини** (англ. DNA vaccines) є молекулярними платформами, які забезпечують синтез вірусних або бактеріальних антигенів безпосередньо в клітинах організму-господаря. Замість введення готового білка або інактивованого збудника, ці вакцини доставляють генетичну інструкцію для синтезу антигену.

Таблиця 43. Характеристика вакцин на основі нуклеїнових кислот

Тип вакцини	Генетичний носій	Місце експресії антигену	Основні приклади
РНК-вакцина	мРНК	Цитоплазма	Pfizer-BioNTech (BNT162b2), Moderna (mRNA-1273)
ДНК-вакцина	плазмідна (дволанцюгова ДНК)	Ядро клітини	INO-4800 (Inovio), ZyCoV-D (Zydus Cadila)

Принцип дії

На відміну від традиційних вакцин, які містять ослаблений або інактивованний збудник або очищений білок-антиген, нуклеїновокислотні вакцини не містять жодних білкових компонентів. Вони є «інструкцією» для синтезу антигену безпосередньо в клітинах людини.

Після введення:

- **мРНК-вакцини:** матрична РНК, інкапсульована в ліпідні наночастинки (LNP), потрапляє до цитоплазми клітин, де використовується рибосомами для синтезу вірусного білка (наприклад, спайкового білка SARS-CoV-2). Білок потім презентується на поверхні клітини у складі МНС I та МНС II, що активує Т- та В-лімфоцити.

- **ДНК-вакцини:** плазмідна ДНК доставляється до ядра клітини (часто за допомогою електропорації), де відбувається транскрипція в мРНК, після чого механізм аналогічний мРНК-вакцинам — відбувається трансляція й презентація антигену.

Таким чином, організм сам виробляє і презентує антиген, що імітує вірусну інфекцію, але без ризику зараження. Це дозволяє ефективно активувати адаптивну імунну відповідь — як гуморальну (антитіла), так і клітинну (CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітини), а також формує імунологічну пам'ять.

Технологія створення

1. **Ідентифікація та клонування гена антигену:** визначають послідовність нуклеотидів, що кодує білок-мішень, та створюють відповідну конструкцію (мРНК або плазмідну ДНК).

2. **Хімічний або ферментативний синтез нуклеїнової кислоти:** проводиться in vitro, із включенням модифікацій (наприклад, псевдоуридину в мРНК для зниження імуногенності самої РНК).

3. **Формулювання вакцини:** ДНК або РНК інкапсулюється в носії (найчастіше ліпідні наночастинки або інші наноструктури), що забезпечують захист і таргетну доставку в клітини.

4. **Контроль якості та стерильності:** перевіряють стабільність, чистоту, здатність викликати імунну відповідь.

Антиідіотипічні вакцини

Антиідіотипічні вакцини представляють собою унікальний підхід до імунопрофілактики, що базується на теоретичній моделі імунної регуляції, відомій як мережева теорія імунної відповіді, яку у 1974 році запропонував лауреат Нобелівської премії Нільс Єрне (Niels Jerne). Ця концепція передбачає, що антитіла не лише зв'язуються з антигенами, але й можуть бути самі імуногенними, викликаючи утворення інших антитіл, спрямованих проти їх варіабельних ділянок (ідіотипів).

Класична імунна відповідь розпочинається з утворення первинних антитіл (Ab1), які специфічно розпізнають і зв'язуються з чужорідним антигеном. Ці антитіла мають унікальні ділянки зв'язування, звані ідіотипами. У відповідь на них організм може синтезувати антиідіотипові антитіла (Ab2), які розпізнають саме ідіотипи Ab1. Якщо ідіотип первинного антитіла тісно відповідає структурі антигенної детермінанти (епітопу), то антиідіотипове антитіло (Ab2) може функціонально і структурно імітувати цей епітоп. Саме ця властивість покладена в основу антиідіотипічної вакцинації.

Після введення в організм антиідіотипового антитіла (Ab2), яке імітує специфічний епітоп патогену, імунна система сприймає його як чужорідний антиген. У результаті цього відбувається активація лімфоцитів та синтез третинних антитіл (Ab3), які є спрямованими проти справжнього епітопу збудника, тобто таких, що потенційно нейтралізують інфекційний агент. Таким чином, без безпосереднього введення патогену або його білків, організм формує імунну відповідь, подібну до тієї, що виникає при звичайній вакцинації.

Завдяки здатності антиідіотипових антитіл імітувати антиген без застосування живих або інактивованих мікроорганізмів, цей підхід вважається особливо перспективним у випадках, коли традиційна вакцинація є ускладненою або ризикованою. Наприклад, в онкології антиідіотипічні вакцини досліджуються для індукції імунної відповіді проти пухлинних антигенів, зокрема гангліозиду GD2 — молекули, що експресується на деяких нейробластомах і меланомах. Також ведуться дослідження щодо застосування антиідіотипових вакцин у боротьбі з паразитарними захворюваннями, зокрема малярією, де створення класичної вакцини залишається складним завданням через складну антигенну структуру збудника.

Попри наукову привабливість і теоретичну елегантність концепції, антиідіотипічні вакцини мають низку обмежень. Насамперед, це складність виробництва: для створення ефективного антиідіотипу потрібна точна структурна відповідність між імітованим і справжнім епітопом. Маленькі відхилення у просторі можуть знизити ефективність імунної відповіді. Крім того, обрання правильного антиідіотипу вимагає складного лабораторного скринінгу та структурного аналізу.

Ще одним важливим викликом є обмежене застосування цих вакцин у клінічній практиці. Більшість з них перебувають на етапі досліджень або клінічних випробувань, і наразі немає широкомасштабно затверджених антиідіотипічних вакцин для інфекційних хвороб. Їхнє використання залишається більш перспективним у терапевтичній вакцинації при

онкопатологіях або як експериментальні моделі імунного навантаження без введення власне патогену.

Таким чином, антиідіотипічні вакцини становлять цікаву альтернативу класичним підходам до імунопрофілактики, особливо у випадках, коли робота з натуральним антигеном є небажаною або технічно неможливою. Подальші дослідження у цій сфері можуть відкрити нові можливості для безпечної та ефективної боротьби з низкою складних патологій.

Вакцини на основі наночастинок

Вакцини на основі наночастинок належать до передових інновацій у галузі вакцинології, що поєднують досягнення нанотехнологій та імунобіотехнологій. Цей тип вакцин використовує наноматеріали як ефективні платформи для доставки антигену до імунокомпетентних клітин, або ж імітує зовнішні властивості патогенів з метою імітації природної інфекції без виклику захворювання. Залежно від складу та функції, наночастинки можуть бути ліпідними, білковими, полімерними або мати неорганічну природу (наприклад, на основі золота чи діоксиду кремнію).

Ключовою особливістю таких вакцин є можливість модифікації розміру, поверхневого заряду, гідрофільності та інших фізико-хімічних характеристик наночастинок, що дозволяє точно контролювати їхній біорозподіл, ступінь поглинання клітинами та імуногенність. Найбільш поширеними на сьогодні є ліпідні наночастинки (LNP), що використовуються, зокрема, в мРНК-вакцинах (наприклад, Pfizer-BioNTech та Moderna проти COVID-19). Вони здатні ефективно інкапсулювати нуклеїнові кислоти та захищати їх від деградації до моменту доставки в клітину.

Технологія створення наночастинкових вакцин передбачає іммобілізацію антигену — у вигляді очищеного білка, пептиду або нуклеїнової кислоти (ДНК, мРНК) — на поверхні або всередині наночастинки. Завдяки мікро- та наномасштабним розмірам, такі частинки можуть активно поглинатися антигенпрезентуючими клітинами, зокрема дендритними клітинами, макрофагами, В-лімфоцитами, що значно підвищує ефективність антигенної презентації та індукції імунної відповіді.

Після потрапляння в організм, наночастинки, завдяки своїм розмірам і поверхневим властивостям, проникають у клітини вродженого імунітету. Всередині цих клітин вони активують Toll-подібні рецептори (TLR), NOD-подібні рецептори та інші патерн-розпізнаючі рецептори (PRRs), що є важливим сигналом небезпеки для імунної системи. Це стимулює секрецію прозапальних цитокінів і запуск каскаду активації адаптивної імунної відповіді.

Таблиця 44. Особливості вакцин на основі наночастинок

Тип наночастинок	Переваги	Приклади
Ліпідні (LNP)	Ефективна доставка мРНК; хороша біосумісність	Pfizer-BioNTech, Moderna
Білкові наноструктури	Імітація вірусної капсиди, підвищення імуногенності	Кандидатні вакцини проти грипу, RSV
Полімерні (PLGA, chitosan)	Повільне вивільнення антигену, стабільність	Дослідницькі проекти (БІЛ, туберкульоз)

У контексті презентації антигену відбувається обробка пептидів і їх демонстрація на поверхні клітин у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС класу I та II). Цей процес активує антигенспецифічні $CD4^+$ Т-хелпери, які, у свою чергу, стимулюють В-лімфоцити до продукції антитіл, а також $CD8^+$ цитотоксичні Т-клітини, що здатні знищувати інфіковані клітини. Таким чином формується комплексна гуморальна і клітинна відповідь.

Наночастинки також можуть функціонувати як внутрішньовакцинні ад'юванти — тобто підсилювачі імунної відповіді, завдяки здатності активувати клітини вродженого імунітету без потреби в додаткових ад'ювантних речовинах. Важливою перевагою є й те, що їх можна запрограмувати на поступове або спрямоване вивільнення антигену в певних клітинних компартментах (наприклад, у цитозолі або ендосомі).

У результаті, вакцина на основі наночастинок не лише забезпечує надійну доставку антигену, а й формує потужну імунну пам'ять, що є критично важливим для тривалого захисту від інфекцій. Цей тип вакцин розглядається як перспективна платформа для профілактики не лише інфекційних хвороб (COVID-19, гепатит В, ВІЛ), але й для розробки терапевтичних вакцин, зокрема в онкології та аутоімунних захворюваннях.

Вакцини четвертого покоління є результатом інтеграції нанотехнологій, молекулярної біології та біоінженерії. Вони поєднують:

- високу **безпеку** (не містять живого збудника),
- **технологічну гнучкість** (можливість швидкої модифікації),
- і **високу імуногенність**, зокрема здатність стимулювати як гуморальну, так і клітинну ланку імунної системи.

Ці вакцини особливо перспективні для боротьби з пандеміями, хронічними вірусними інфекціями (гепатит, ВІЛ) та навіть онкологічними захворюваннями. Подальше вдосконалення цих платформ є ключем до нової ери вакцинопрофілактики.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційних відео про вакцини четвертого покоління

Матеріали: інформаційні довідки про вакцини четвертого покоління: мРНК-вакцини: Pfizer-BioNTech (Comirnaty), Moderna (Spikevax); ДНК-вакцини: INO-4800 (проти COVID-19), Zika DNA vaccine (на етапі клінічних досліджень); наночастинкові вакцини: Novavax (NVX-CoV2373) проти COVID-19; підготовлені відеоматеріали або посилання на офіційні демонстраційні відео (CDC, WHO, FDA, офіційні канали компаній, YouTube); таблиці для порівняльного аналізу характеристик вакцин (тип вакцини, платформа, принцип дії, переваги, недоліки, показання до застосування); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описами клінічних кейсів або ситуацій з практики вакцинації); інструкція для групового аналізу відео та формування узагальнень; доступ до мережі Інтернет для перегляду відео або додаткового пошуку інформації.

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для представлення результатів групової роботи; маркерні ручки для фіксації ідей під час дискусій; листки з кейсами або прикладами клінічних ситуацій для аналізу у групах; комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету; мультимедійний проектор та екран для демонстрації відеоматеріалів; зошити або блокноти для індивідуальних записів та заповнення таблиць.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з теоретичним матеріалом.

1. Прочитайте інформацію про вакцини четвертого покоління: особливості РНК-, ДНК- та наночастинкових платформ.

2. Перегляньте демонстраційні відео (з рекомендованих джерел) щодо кожного типу вакцин:

- Pfizer-BioNTech (Comirnaty), Moderna (Spikevax) – мРНК
- INO-4800, Zika DNA – ДНК-вакцини (клінічні стадії)
- Novavax (NVX-CoV2373) – наночастинкова вакцина

Завдання 2. Робота в групах.

1. Об'єднайтесь у малі групи (3–5 студентів).

2. Після перегляду заповніть таблицю:

Таблиця 45. Порівняльна характеристика вакцин четвертого покоління

Тип вакцини	Платформа (мРНК, ДНК, наночастинки)	Переваги	Недоліки	Приклади застосування
Comirnaty (Pfizer-BioNTech)	мРНК			
Spikevax (Moderna)	мРНК			
INO-4800	ДНК			
Zika DNA vaccine	ДНК			
Novavax (NVX-CoV2373)	Наночастинки			

3. Обговоріть:

- Який тип вакцин має найвищу ефективність і чому?
- Які платформи потребують спеціальних умов зберігання?
- Які виклики стоять перед масовим впровадженням таких вакцин у країнах з обмеженими ресурсами?

Завдання 3. Презентація результатів

1. Кожна група коротко презентує свої висновки (до 5 хв).

Завдання 4. Узагальнення

1. Спільне обговорення (модерується викладачем):

- Який вплив мають інноваційні вакцини на боротьбу з пандеміями?
- Які технологічні прориви зробили можливими ці типи вакцин?
- Як може виглядати майбутнє вакцинології?

Завдання 5. Індивідуальні висновки

1. У зошитах дайте відповіді:
 - Який тип вакцини четвертого покоління вважаєте найперспективнішим і чому?
 - Які бар'єри існують для їхнього впровадження?
 - Які нові інфекції потенційно можуть потребувати таких вакцин?

Контрольні питання

1. У чому полягає основна відмінність вакцин четвертого покоління від попередніх генерацій вакцин за механізмом дії та складом?
2. Які переваги мають нуклеїновокислотні вакцини (ДНК- та мРНК-вакцини) у контексті швидкої відповіді на нові інфекційні виклики?
3. Охарактеризуйте принцип дії мРНК-вакцини та порівняйте його з механізмом дії ДНК-вакцини на рівні клітинної експресії.
4. Яким чином ліпідні наночастинки (LNP) забезпечують ефективну доставку мРНК у вакцинах типу Pfizer-BioNTech або Moderna?
5. Поясніть концепцію мережевої теорії імунної відповіді Нільса Єрне та її роль в розробці антиідіотипічних вакцин.
6. Які етапи включає технологічний процес створення вакцин на основі нуклеїнових кислот і які з них є критичними для забезпечення стабільності препарату?
7. У чому полягає механізм формування імунної відповіді після введення антиідіотипового антитіла (Ab2) у складі вакцини?
8. Які фізико-хімічні характеристики наночастинок найбільше впливають на їхню імуногенність та біодоступність при використанні у вакцинах?
9. Оцініть перспективи використання наночастинкових вакцин у терапевтичній вакцинації, зокрема при онкологічних захворюваннях.
10. Які виклики стоять перед розробниками вакцин четвертого покоління з точки зору біоетики, безпеки та масштабування виробництва?

ЧАСТИНА 6. ІМУНОТЕРАПІЯ

Імуноterapia є одним із найперспективніших напрямів у сучасній онкології, що ґрунтується на використанні антитіл для прицільного знищення пухлинних клітин. Завдяки розвитку біотехнологій з'явилися нові типи антитіл, що підвищують ефективність лікування та зменшують побічні ефекти у порівнянні з традиційними методами, такими як хіміотерапія та радіотерапія.

Лабораторна робота цієї частини присвячена вивченню:

- моноклональних антитіл, які вибірково зв'язуються з пухлинними клітинами та активують імунну відповідь організму;
- біспецифічних антитіл, що можуть одночасно взаємодіяти з двома різними антигенами, підвищуючи ефективність терапії;
- антитіл-кон'югатів та імунокон'югатів, які поєднують антитіла з цитотоксичними агентами або радіоізотопами, спрямовуючи їх безпосередньо на ракові клітини.

Практична частина передбачає перегляд та аналіз демонстраційного відео про механізм дії Rituximab (Rituxan) – антитіла, що ініціює комплементзалежну

цитотоксичність при лікуванні В-клітинних лімфом. Також розглядатимуться механізми дії інших терапевтичних антитіл, таких як Trastuzumab (Herceptin) та Adalimumab (Humira), що застосовуються для лікування різних онкологічних та аутоімунних захворювань.

Дослідження імунотерапевтичних методів є ключовим для розуміння сучасних підходів до лікування раку та розробки нових біотехнологічних препаратів, що можуть значно покращити результати терапії та якість життя пацієнтів.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №22. Використання антитіл для лікування онкологічних захворювань

Мета: ознайомитися з механізмом дії терапевтичних антитіл у лікуванні онкологічних захворювань, проаналізувати механізм комплементзалежної цитотоксичності на прикладі антитіла Rituximab (Rituxan), дослідити інші механізми дії терапевтичних антитіл (Trastuzumab, Adalimumab) та обговорити можливості й обмеження використання антитіл у терапії раку.

Теоретичні відомості

1. Значення антитіл у сучасній онкології.
2. Типи антитіл, що використовуються в онкології (моноклональні, біспецифічні, антитіла-кон'югати, імунокон'югати).
3. Принципи дії антитіл при лікуванні раку.
4. Переваги і недоліки використання антитіл в онкології.

Значення антитіл у сучасній онкології

Антитіла є ключовими інструментами імунотерапії, що використовуються для лікування онкологічних захворювань завдяки їхній високій специфічності до пухлинних антигенів. Використання антитіл у терапії раку дозволяє не лише безпосередньо атакувати злоякісні клітини, але й активувати імунну відповідь організму, модулювати мікрооточення пухлини та долати механізми імуносупресії.

Розвиток технології моноклональних антитіл та їх модифікацій значно змінив підходи до лікування солідних пухлин і гематологічних неоплазій. Завдяки біотехнологічним методам, сучасні антитіла мають покращені характеристики, такі як висока спорідненість до антигенів, пролонгований період напіввиведення та зменшена імуногенність. Антитіла можуть використовуватися як самостійні препарати або у комбінації з іншими терапевтичними стратегіями, такими як хіміотерапія, променева терапія чи імуномодуючі агенти.

Терапія з використанням моноклональних антитіл — це метод в імунотерапії, який використовує моноклональні антитіла для моноспецифічного зв'язування з певними клітинами або білками. Таке лікування стимулює імунну систему організму атакувати вибрані клітини. Також існує метод лікування в радіоімунотерапії, при якому пацієнти приймають моноклональні антитіла, мічені певними радіоактивними ізотопами, що локалізують мічену клітинну

лінію, призводячи до загибелі уражених клітин. Раніше, антитіла використовували для зв'язування з молекулами, які беруть участь у регуляції Т-клітин, для видалення інгібіторних шляхів, що блокують імунну відповідь Т-клітин. Цей метод відомий як «чек-поінт терапія». Можна створити моноклональні антитіла, специфічні майже для будь-якої мішені позаклітинного чи клітинного простору. В останні роки проводяться дослідження та розробки для створення антитіл до таких захворювань, як ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера, Ебола та різних видів раку.

Принцип роботи імунної системи полягає в тому, що, як тільки в організмі з'являється «незнайома» речовина, вона відразу ж розпізнається як «чужа» і піддається атаці. Джерелами таких речовин можуть стати не тільки хвороботворні мікроорганізми, а й власні аномальні клітини. Під час поділу клітин в нашому організмі періодично виникають помилки. Це неминуче. Якщо щось пішло не так, після поділу дочірні клітини мають неправильну будову, можуть ставати раковими. Імунна система завжди насторожі і готова їх знищити. Однак, імунітет справляється зі своєю функцією не завжди – в іншому випадку ні у кого б не виникали злоякісні пухлини. Для того щоб імунна система почала розправлятися з пухлиною, її потрібно активувати, або надати їй необхідні компоненти. Сучасні лікарі і вчені знають, як це зробити. Такий напрям лікування раку називається *імунотерапією*. Існує кілька її різновидів. Зокрема при імунотерапії онкологічних захворювань з використанням моноклональних антитіл, мішенню для їх дії є певна речовина, яку ракові клітини виробляють в досить великій кількості, а здорові — в дуже малій, або не виробляють взагалі.

Імунотерапія раку – це штучна стимуляція імунної системи для лікування раку, що поліпшує природну здатність систем організму боротися з пухлинними клітинами. Імунотерапія може бути класифікована як *активна*, *пасивна* або *гібридна* (активна і пасивна). Активна імунотерапія направляє імунну систему на ураження пухлинних клітин шляхом націлювання на пухлинні антигени. Пасивна імунотерапія підсилює існуючі протипухлинні реакції і включає використання моноклональних антитіл, лімфоцитів і цитокінів.

Терапія антитілами схвалена в різних юрисдикціях для лікування широкого спектру ракових захворювань. Клітинні поверхневі рецептори є загальними мішенями для лікування антитілами і включають CD20, CD274 і CD279. Після зв'язування з раковим антигеном антитіла можуть індукувати антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність, активувати систему комплементу або запобігати взаємодію рецептора з його лігандом, що може привести до загибелі клітин. Затверджені препарати антитіла включають алемтумаб, іпіліумаб, ніволумаб, даратумаб і Rituximab.

Типи антитіл, що використовуються в онкології

У клінічній практиці застосовують декілька видів терапевтичних антитіл, кожен з яких має унікальний механізм дії та специфічні показання до використання.

Моноклональні антитіла (англ. *monoclonal antibodies, mAbs*). Моноклональні антитіла є найбільш широко використовуваними імунобіологічними препаратами в онкології. Вони вибірково розпізнають

специфічні пухлинні антигени та ініціюють механізми знищення пухлинних клітин. До основних механізмів дії належать:

- *антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність* (англ. *antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) – активація ефektorних клітин імунної системи (NK-клітин, макрофагів), які здійснюють лізис пухлинних клітин.

- *комплементазалежна цитотоксичність* (англ. *complement dependent cytotoxicity, CDC*) – активація системи комплементу, що призводить до лізису пухлинних клітин.

- *блокування сигнальних шляхів* – інгібування ростових факторів пухлини шляхом блокування специфічних рецепторів (наприклад, HER2, EGFR, VEGF). *Приклади: Rituximab (CD20+ В-клітинні лімфому), Trastuzumab (HER2+ рак молочної залози), Bevacizumab (анти-VEGF терапія).*

Біспецифічні антитіла (англ. *bispecific monoclonal antibody, bsAbs*). Біспецифічні антитіла мають здатність одночасно зв'язувати два різні антигени, що дозволяє спрямовувати імунну відповідь безпосередньо на пухлинні клітини. Одним із найважливіших класів bsAbs є антитіла, що взаємодіють із CD3-рецепторами на Т-клітинах та пухлинними антигенами, ініціюючи їхню цитотоксичну активність. *Приклад: Blinatumomab (CD3 × CD19) для лікування гострого лімфобластного лейкозу.*

Антитіла-кон'югати (англ. *antibody-drug conjugates ADC*). Ці препарати складаються з моноклональних антитіл, кон'югованих з цитотоксичними агентами. Антитіло слугує транспортною системою, що доставляє лікарський засіб безпосередньо до пухлинних клітин, уникаючи впливу на здорові тканини.

- Після зв'язування з пухлинним антигеном ADC проникає в клітину шляхом ендоцитозу.

- Усередині клітини цитотоксичний агент вивільняється та індукує загибель пухлинної клітини. *Приклад: Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) – для лікування HER2+ раку молочної залози.*

Імунокон'югати. Це антитіла, модифіковані шляхом приєднання до них радіоактивних ізотопів, токсинів або інших молекул, що підсилюють їхню дію. Вони забезпечують *таргетну терапію* пухлинних клітин, дозволяючи мінімізувати негативний вплив на здорові тканини. Основна стратегія використання імунокон'югатів полягає в тому, що антитіло слугує транспортною системою, яка доставляє цитотоксичний агент безпосередньо до пухлинної клітини. Це дозволяє уникнути системних токсичних ефектів, характерних для традиційної хіміотерапії або радіотерапії.

На сьогодні імунокон'югати активно застосовуються в лікуванні гематологічних злоякісних захворювань (лімфому, лейкози), а також певних типів солідних пухлин (меланома, рак молочної залози, рак легені тощо). Залежно від природи ефektorного агента, імунокон'югати поділяються на три основні групи: імунотоксини, антитіла-кон'югати з хіміопрепаратами (ADC), а також радіоактивні антитіла (радіоімунокон'югати).

Імунотоксини — це імунокон'югати, які містять антитіло, здатне специфічно розпізнавати пухлинний антиген, та приєднаний токсин

бактеріального або рослинного походження. При потраплянні в клітину такий кон'югат індукує апоптоз шляхом блокування життєво важливих процесів, наприклад, синтезу білка. Прикладами є Moxetumomab pasudotox, що містить змінений дифтерійний токсин і застосовується при волохатоклітинному лейкозі, та Denileukin diftotox, ефективний при Т-клітинних лімфомах. Експериментальні конструкції з рицином також демонструють перспективність у знищенні пухлинних клітин.

Антитіла-кон'югати з хіміопрепаратами (ADC) поєднують високу специфічність моноклонального антитіла з потужною протипухлинною дією хіміотерапевтичного агента. Одним із яскравих прикладів є Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1), що містить антитіло Trastuzumab проти HER2 та цитотоксичну речовину DM1. Brentuximab vedotin, що застосовується при лімфомі Ходжкіна, містить MMAE — інгібітор мікротрубочок. Sacituzumab govitecan, що діє на Trop-2, містить SN-38 — активний метаболіт іринотекану.

Принцип дії ADC полягає в тому, що після зв'язування з антигеном на поверхні пухлинної клітини комплекс поглинається і потрапляє в лізосоми, де хіміопрепарат вивільняється і запускає механізми апоптозу, порушення клітинного циклу або інші форми клітинної загибелі.

Радіоактивні антитіла (радіоімунокон'югати, RIT) являють собою моноклональні антитіла, мічені радіоізотопами, що дозволяє здійснювати високоспецифічну радіотерапію. Радіонукліди, зокрема Yttrium-90 або Iodine-131, прицільно доставляються в осередок пухлинного росту, де вивільняють β - і γ -випромінювання, що викликає розриви ДНК і загибель клітин. Відомими прикладами є Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) та Tositumomab (Bexxar), які застосовуються при В-клітинних неходжкінських лімфомах. Окрім прямої дії на мішені, іонізуюче випромінювання впливає й на сусідні пухлинні клітини завдяки ефекту сусіда (bystander effect).

Таким чином, імунокон'югати демонструють високу терапевтичну ефективність, поєднуючи специфічність імунотерапії з потужною цитотоксичною або радіологічною дією. Вони значно знижують ризики системної токсичності, підвищують виживаність і якість життя онкологічних пацієнтів. Подальший розвиток цієї галузі зосереджено на створенні більш селективних мішеней, поліпшенні стабільності кон'югатів та пошуку нових цитотоксичних агентів з мінімальними побічними ефектами.

Принципи дії антитіл при лікуванні раку

Антитіла можуть здійснювати терапевтичний ефект через різні механізми, зокрема:

- **Пряма індукція загибелі пухлинних клітин** (тригери апоптозу або блокування ростових факторів).
- **Модуляція імунної відповіді** (блокування імунних контрольних точок, активація Т-клітин, зменшення імуносупресії).
- **Цільова доставка токсичних агентів** (антитіла-кон'югати, радіоімунокон'югати).
- **Посилення ефективності інших методів лікування** (комбінована терапія з хіміотерапією чи імунотерапією).

Окремим напрямом є **блокування імунних контрольних точок** (англ. checkpoint inhibitors). Ці препарати пригнічують негативні регулятори імунної системи, що дозволяє активувати Т-клітини для знищення пухлин.

Розрізняють різні типи дій моноклональних антитіл:

- роблять ракові клітини «помітними» для імунітету;
- руйнують мембрану ракових клітин;
- блокують зростання пухлини або кровоносних судин;
- блокують речовини, які заважають імунітету розпізнавати рак;
- безпосередньо руйнують пухлину.

Моноклональні антитіла також можна використовувати для доставки до ракових клітин інших ліків. Наприклад, можна прикріпити до молекули антитіла радіоактивну частку або хіміопрепарат (джерело: <https://innovacia.com.ua/imunoterapiya-dlya-likuvannya-raku/>)

Механізм дії антитіла Rituximab: комплементзалежна цитотоксичність (англ. CDC) Загальні відомості

Ритуксимаб (англ. Rituximab) – це протипухлинний засіб із групи моноклональних антитіл. Це синтетичні (генно-інженерні) химерні моноклональні антитіла миші/людини, які володіють специфічністю до CD20 антигену, що виявляється на поверхні нормальних і малігнізованих В-лімфоцитів.

За структурою ритуксимаб відноситься до імуноглобулінів класу G1 (IgG1κ), його молекула містить мишачі варіабельні фрагменти легких та важких ланцюгів і людський константний фрагмент.

Ритуксимаб складається з 2 важких ланцюгів із 451 амінокислот та 2 легких ланцюгів із 213 амінокислот і має молекулярну масу приблизно 145 кД. Афініність ритуксимабу до антигену CD20 становить приблизно 8 нМ. Химерні анти-CD20 антитіла продукуються *in vitro* генно-модифікованими клітинами ссавців (культура клітин китайського хом'ячка), які експресують химерний ген.

Ритуксимаб уперше розроблений у лабораторії компанії «IDEC Pharmaceuticals» дослідницькою групою під керівництвом Набіля Ханни, початково під назвою «IDEC-C2B8», та застосовується у клінічній практиці з 1997 року. Ритуксимаб застосовується як внутрішньовенно, так і підшкірно.

Біоаналоги: 2018 р. - rituximab-abbs (Truxima), 2019 р. - rituximab-pvvr (Ruxience), 2020 р. - rituximab-arxx (Riabni).

Основний механізм дії препарату полягає у зв'язуванні ритуксимабу із трансмембранним антигеном зрілих В-лімфоцитів та пре-В-лімфоцитів CD20, що призводить до активації імунологічних реакцій, які спричиняють лізис В-лімфоцитів. Хоча функція CD20 невідома, він може відігравати певну роль у надходженні Ca^{2+} через плазматичні мембрани, підтримуючи внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} і дозволяючи активувати В-клітини.

Іншими механізмами дії ритуксимабу є зниження експресії антигенів CD40 та CD80 на поверхні В-лімфоцитів, що призводить до гальмування активації Т-лімфоцитів, а також індукуванні елімінації аутореактивних Т-лімфоцитів, та відновленні ауто толерантності, що має значення для гальмування розвитку аутоімунних захворювань.

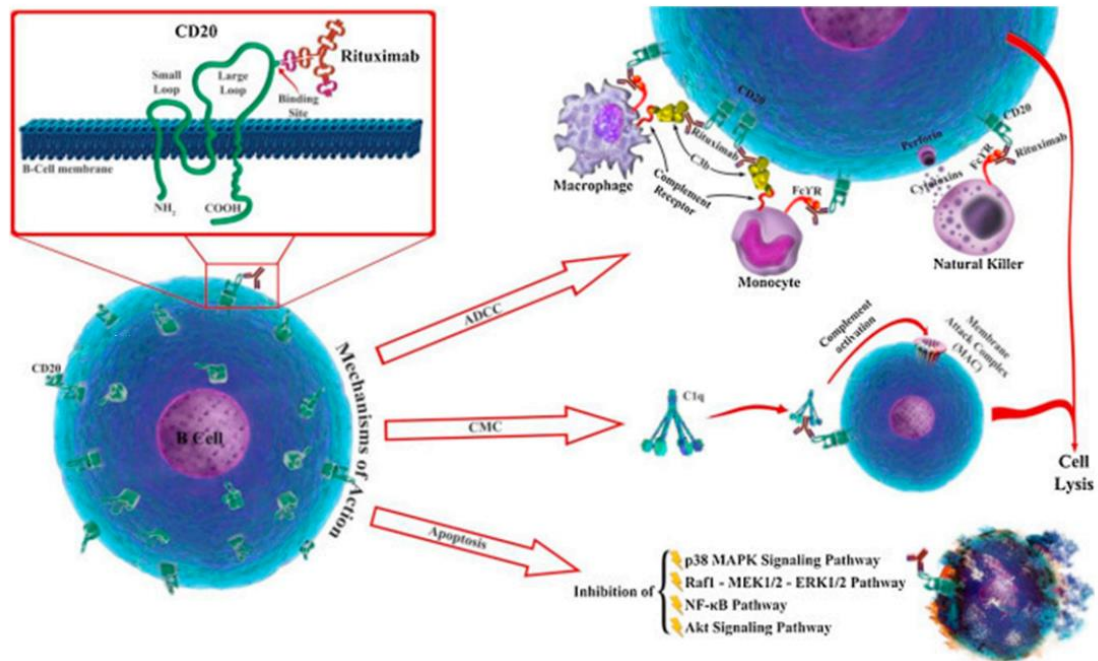


Рис. 43. Три основні незалежні механізми дії ритуксимабу: (1) антитілозалежна клітинна цитотоксичність (англ. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC), (2) комплементпосередкована цитотоксичність (англ. complement mediated cytotoxicity, CMC) і (3) апоптоз; панель ілюструє схематичний вигляд структури CD20 і ритуксимабу (Джерело: Seyfizadeh, N., et al., A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. Critical Reviews in Oncology / Hematology. 97: p. 275-290. - <http://www.croh-online.com/cms/attachment/2042124102/2055390607/gr1.j pg>)

Було виявлено такі ефекти ритуксимабу:

- опосередковує антитілозалежну клітинну цитотоксичність (англ. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) і комплементпосередковану цитотоксичність (англ. complement mediated cytotoxicity, CDC),
- має загальну регуляторну дію на клітинний цикл,
- переважна елімінація злоякісних В-клітин з високим рівнем CD20, особливо при хронічному лімфолейкозі,
- знижує регуляцію В-клітинного рецептора,
- індукує апоптоз клітин CD20⁺,
- індукує вивільнення деяких клітин хронічного лімфолейкозу з імунних ніш, що може зробити їх більш чутливими до хіміотерапії, яка використовується в комбінації з антитілом до CD20.

Комбінований ефект призводить до усунення В-клітин (включаючи ракові) з організму, що дозволяє новій популяції здорових В-клітин розвиватися з лімфоїдних стовбурових клітин.

Ритуксимаб зв'язується з амінокислотними залишками 170-173 і 182-185 білка CD20, які фізично близькі одна до одної через наявний дисульфідний зв'язок між амінокислотними залишками 167 і 183.

Ритуксимаб застосовується при неходжкінських лімфомах, хронічному лімфолейкозі, ревматоїдному артриті (переважно у комбінації з метотрексатом), ідіопатичній тромбоцитопенічній пурпурі та пемфігусі.

Приклади інших антитіл: Trastuzumab (Herceptin) та інші.

Трастузумаб (англ. Trastuzumab) — це синтетичний препарат, який є генно-інженерним моноклональним антитілом до рецептора 2 епідермального фактора росту людини (HER2). Трастузумаб застосовується як внутрішньовенно, так і підшкірно. Трастузумаб уперше синтезований групою науковців під керівництвом Акселя Ульріха та Майкла Шепарда, які працювали в Джонсонівському дослідницькому центрі раку у Каліфорнійському університеті в Лос-Анджелесі. Пізніше дослідження препарату продовжила компанія «Genentech», яка провела перші клінічні випробування трастузумабу на 15 жінках у 1992 році. У 1996 році проведено чергові клінічні дослідження за участю більше 900 жінок, після яких трастузумаб був схвалений FDA для клінічного використання у 1998 році, а у Європейському Союзі в 2000 році.

Механізм дії препарату полягає у зв'язуванні із позаклітинним доменом рецептора 2 епідермального фактору росту людини HER2, що призводить до інгібування фактору росту та блокування проліферації пухлинних клітин, а в подальшому до руйнування пухлинних клітин.

Трастузумаб застосовується при раку молочної залози, як ранньому, так і метастатичному, із підвищеною експресією HER2.

Іпіліумаб (англ. Ipilimumab) є препаратом, що належить до класу моноклональних антитіл. Він був розроблений для лікування деяких видів раку, зокрема меланоми.

Іпіліумаб діє на імунну систему організму, стимулюючи активацію імунних клітин, відомих як Т-лімфоцити. Це сприяє боротьбі з раковими клітинами та зниженню здатності ракових пухлин приховуватися від імунної системи.

Іпіліумаб був схвалений Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США у березні 2011 року для лікування людей з пізньою стадією розвинутої меланоми, яка не може бути видалена хірургічним шляхом. В Європейському Союзі іпіліумаб був схвалений для використання в медицині в листопаді 2012 року.

Т-лімфоцити можуть розпізнавати та знищувати ракові клітини. Однак існує гальмівний механізм, що перериває ці захисні реакції. Іпіліумаб вимикає цей гальмівний механізм і дозволяє лімфоцитам продовжувати знищувати ракові клітини.

Ракові клітини виробляють антигени, за якими імунна система може їх розпізнати. Ці антигени розпізнаються дендритними клітинами, які представляють антигени цитотоксичним Т-лімфоцитам (ЦТЛ) у лімфатичних вузлах. ЦТЛ розпізнають ракові клітини за цими антигенами та знищують їх. Однак разом з антигенами дендритні клітини представляють гальмівний сигнал. Цей сигнал зв'язується з рецептором цитотоксичного Т-лімфоцит-асоційованого антигену 4 (CTLA-4) на CTL і вимикає цитотоксичну реакцію. Це дозволяє раковим клітинам виживати.

Іпілімумаб зв'язується з CTLA-4, блокуючи інгібуючий сигнал, що дозволяє ЦТЛ знищувати ракові клітини. Показання до застосування Неоперабельна чи метастатична меланома, рак нирки, колоректальний рак, гепатоцелюлярна карцинома, метастатичний недрібноклітинний рак легені, неоперабельна мезотеліома плеври.

Алемтузумаб (англ. Alemtuzumab) — це синтетичний препарат, який є генно-інженерним гуманізованим (від пацюка) моноклональним антитілом до поверхневого рецептора лімфоцитів CD52. Алемтузумаб застосовується виключно внутрішньовенно. Алемтузумаб уперше розроблений у 1983 році групою вчених із Кембриджського університету під керівництвом Германа Вальдманна, початково під назвою «Кемпат-1», початково виключно на основі антитіл пацюка. Проте у зв'язку із високою ймовірністю розвитку реакцій на чужорідний білок пацюка у подальших дослідженнях Грегом Вінтером запропоновано гуманізувати антитіла (тобто ввести частину геному із антитіл пацюка до людських антитіл) для посилення дії власних антитіл людини та зменшення ймовірності несприятливих ефектів. Алемтузумаб став першим моноклональним антитілом, яке розпочали використовувати у клінічній практиці. Уперше алемтезумаб схвалений FDA та Європейським агентством з лікарських засобів у 2001 році для лікування В-клітинного хронічного лімфолейкозу. Проте в подальших дослідженнях встановлено також ефективність алемтезумаба при розсіяному склерозі. Після встановлення цього факту компанії «Sanofi» та «Bayer», які випускали алемтезумаб, вирішили відкликати реєстрацію алемтезумаба в Європі та США під торговою маркою «Кемпат», та переєструвати його під новою торговою маркою «Лемтрада», який був схвалений Європейським агентством з лікарських засобів у 2013 році, а FDA у 2014 році.

Алемтезумаб — синтетичний лікарський препарат, який є генно-інженерним рекомбінантним гуманізованим (від пацюка) моноклональним антитілом до поверхневого антигену лімфоцитів CD52, який експресується на поверхні як нормальних, так і уражених лімфоцитів (проте значно більше на поверхні лімфоцитів, уражених лейкозом). Унаслідок взаємодії алемтезумаба із антигеном CD52 відбувається лізис лімфоцитів, спричинений фіксацією комплекменту та антитілозалежним клітинним цитотоксичним ефектом.

Алемтезумаб також може спричинювати лізис моноцитів, макрофагів та тимоцитів, проте не впливає на стовбурові кровотворні клітини.

Завдяки своєму механізму дії препарат ефективний при хронічному лімфолейкозі та Т-клітинній лімфомі, у тому числі при формах, резистентних до інших хіміотерапевтичних препаратів (зокрема, флударабіну та аналогів пуринових основ). Показання до застосування Алемтезумаб застосовують при хронічному лімфолейкозі та розсіяному склерозі.

Переваги та недоліки використання антитіл в онкології

Переваги

- Висока специфічність до пухлинних антигенів, що зменшує вплив на здорові клітини.

- Довготривалий терапевтичний ефект завдяки пролонгованому періоду напіввиведення.
- Поєднання з іншими методами лікування для досягнення синергічного ефекту.
- Менший ризик розвитку резистентності порівняно з класичною хіміотерапією.

Недоліки

- Висока вартість розробки та виробництва антитіл.
- Ризик розвитку імунних ускладнень (цитокіновий шторм, аутоімунні реакції).
- Обмежена ефективність у деяких пацієнтів через механізми пухлинної імуносупресії.
- Побічні ефекти, такі як інфузійні реакції, гепатотоксичність, дерматологічні ускладнення.

Таким чином, використання антитіл у лікуванні онкологічних захворювань є одним із найперспективніших напрямів сучасної медицини. Завдяки високій специфічності, можливості таргетної доставки лікарських засобів та активації імунної відповіді, антитіла суттєво покращують прогноз пацієнтів з різними типами раку. Подальші дослідження спрямовані на вдосконалення механізмів дії антитіл, зменшення побічних ефектів та розширення можливостей комбінованої терапії, що зробить імунотерапію ще більш ефективною у боротьбі з онкологічними захворюваннями.

Практична частина

Тема. Перегляд і обговорення демонстраційного відео про механізм дії антитіла Rituximab (Rituxan) – комплементзалежна цитотоксичність (англ. CDC). Приклади механізмів дії інших антитіл: Trastuzumab (Herceptin), Adalimumab (Humira) та інші

Матеріали: інформаційні довідки про терапевтичні антитіла, що застосовуються в онкології: Rituximab (Rituxan), Trastuzumab (Herceptin), Adalimumab (Humira); підготовлені відеоматеріали або посилання на офіційні демонстраційні відео (CDC, FDA, офіційні канали виробників, YouTube); таблиці для порівняльного аналізу характеристик антитіл (тип антитіла, мішень, механізм дії, переваги, обмеження, терапевтичні показання); роздаткові матеріали для групової роботи (картки з описами клінічних ситуацій, у яких застосовуються моноклональні або біспецифічні антитіла); інструкція для групового аналізу відео та формування висновків; доступ до мережі Інтернет для перегляду відео або додаткового пошуку актуальної наукової інформації.

Обладнання: фліпчарти або маркерна дошка для презентації результатів обговорення; маркерні ручки для фіксації ідей під час групової роботи; листки з кейсами або прикладами клінічних ситуацій для аналізу в групах; комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету; мультимедійний проектор та екран для демонстрації відеоматеріалів; зошити або блокноти для індивідуальних записів, заповнення таблиць і формування узагальнень.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомлення з теоретичним матеріалом.

1. Опрацюйте короткі довідки про механізм дії Rituximab, Trastuzumab, Adalimumab.
2. Ознайомтесь з поняттями CDC, ADCC, апоптоз, блокада рецепторів росту.

Завдання 2. Перегляд і аналіз відеоматеріалів.

1. Перегляньте відео про механізм дії Rituximab (CDC). Зверніть увагу на мішені антитіла (CD20) і послідовність імунної реакції.
2. Перегляньте короткі відеофрагменти або схеми дії Trastuzumab (блокування HER2-рецепторів) та Adalimumab (нейтралізація TNF- α).
3. У групах заповніть таблицю:

Таблиця 46. Порівняльна характеристика препаратів антитіл для лікування онкологічних захворювань

Назва антитіла	Мішень	Механізм дії	Тип цитотоксичності	Застосування
Rituximab				
Trastuzumab				
Adalimumab				

Завдання 3. Обговорення в групах.

1. Обговоріть:
 - У чому полягають переваги таргетної імунотерапії?
 - Які побічні ефекти можуть бути пов'язані з дією моноклональних антитіл?
 - У чому полягає роль комплементу при використанні Rituximab?
 - Який механізм дії найдоцільніше застосовувати при різних типах пухлин?

Завдання 4. Узагальнення і рефлексія.

1. Підготуйте групову презентацію з узагальненням основних механізмів дії антитіл.
2. Індивідуально дайте письмові відповіді на запитання:
 - Яке антитіло, на вашу думку, є найбільш ефективним для імунотерапії онкозахворювань? Чому?
 - Які механізми дії антитіл здаються вам найбільш перспективними для майбутніх досліджень?
 - Як моноклональні антитіла змінюють сучасну онкологічну терапію?

Контрольні питання

1. У чому полягає принципова різниця між активною та пасивною імунотерапією раку, і яку роль у цьому відіграють моноклональні антитіла?
2. Які основні механізми дії моноклональних антитіл реалізуються при терапії пухлин, і як саме вони сприяють загибелі пухлинних клітин?

3. Поясніть, яким чином антитіла-кон'югати (ADC) поєднують специфічність антитіла з цитотоксичним ефектом хіміопрепарату. Які приклади таких препаратів вам відомі?

4. Які мішені (антигени) найчастіше використовуються для створення терапевтичних антитіл у клінічній онкології, і чому саме вони є ефективними?

5. Опишіть механізм комплементзалежної цитотоксичності (CDC), зокрема в контексті дії антитіла Rituximab.

6. Яким чином біспецифічні антитіла відрізняються від класичних моноклональних антитіл за механізмом дії, і які терапевтичні переваги це забезпечує?

7. Як впливає імуногенність антитіл на ефективність та безпеку імунотерапії, і які біоінженерні стратегії використовуються для її зменшення?

8. Розкрийте переваги та недоліки використання імунокон'югатів у порівнянні з традиційною хіміо- або радіотерапією.

9. Які побічні ефекти найбільш характерні для терапії моноклональними антитілами, і які механізми лежать в їх основі?

10. Як сучасні підходи до поєднання антитіл з іншими методами терапії (хіміотерапія, блокада контрольних точок, імуностимуляція) дозволяють досягти синергічного ефекту в лікуванні раку?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Волощук, О. М. Імунобіотехнологічні препарати: навч. посібник. Харків: Мачулін, 2019. 96 с.

Волощук, О. М., Копильчук, Г. П. Імунобіотехнологічні препарати: тестові завдання. Харків: Експрес-книга, 2014. 80 с.

Данилейченко, В. В., Климнюк, С. І., Корнійчук, О. П. та ін. Мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручник для студ. стомат. ф-тів вищих мед. навч. закл. III–IV р. а. Вінниця: Нова Книга, 2017. 376 с.

Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2001.

Звір, Г. І., Гудзь, С. П., Гнатуш, С. О. Тести з імунології: навчальний посібник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 176 с.

Колісник, Н. В., Омелянчик, Л. О. Методи лабораторної (клінічної) імунології: навчальний посібник. Запоріжжя: ЗНУ, 2011. 120 с.

Almagro, J. C., Daniels-Wells, T. R., Perez-Tapia, S. M., Penichet, M. L. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Frontiers in Immunology*, 2018, Vol. 8, Article 1751.

Bansal, R. Antibodies and their role in therapeutics. 2021. [Electronic resource]. Available at: [<http://surl.li/fisncr>] (Accessed: 20 May 2024).

Chen, W. C., Murawsky, C. M. Strategies for generating diverse antibody repertoires using transgenic animals expressing human antibodies. *Frontiers in Immunology*, 2018, p. 460.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. *Roitt's Essential Immunology*. 13th ed. Chichester: Wiley & Sons, 2018. 576 p.

Pfeifer, B. A., Hill, A. F. Vaccine Delivery Technology: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2021. 389 p.

Rüker, F., Wozniak-Knopp, G. Introduction to Antibody Engineering. Cham: Springer, 2021. 307 p.

Shire, S. J., American Association of Pharmaceutical Scientists. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing. New York: Springer : AAPS Press, 2010. 384 p.

Sompayrac, L. M. How the Immune System Works. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2019. 169 p. Steinitz, M. Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. 2nd ed. New York: Humana Press, 2019. 450 p.

Tiller, T. (2011). Single B cell antibody technologies. *New Biotechnology*, 28(5), 453-457. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.014>

Varadé, J., Magadán, S., González-Fernández, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021. 805-828 p.

Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., Tong, A. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, Vol. 3, No. 1, Article 35.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Аббас, А. К., Ліхтман, Е. Г., Піллай, Ш. Основи імунології: функції та розлади імунної системи: 6-е видання. Київ: Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2020. 336 с.

Волощук, О. М. Імунобіотехнологічні препарати: навч. посібник. Харків: Мачулін, 2019. 96 с.

Волощук, О. М., Копильчук, Г. П. Імунобіотехнологічні препарати: тестові завдання. Харків: Експрес-книга, 2014. 80 с.

Данилейченко, В. В., Климнюк, С. І., Корнійчук, О. П. та ін. Мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручник для студ. стомат. ф-тів вищих мед. навч. закл. III–IV р. а. Вінниця: Нова Книга, 2017. 376 с.

Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2001.

Звір, Г. І., Гудзь, С. П., Гнатуш, С. О. Тести з імунології: навчальний посібник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 176 с.

Колісник, Н. В., Омелянчик, Л. О. Методи лабораторної (клінічної) імунології: навчальний посібник. Запоріжжя: ЗНУ, 2011. 120 с.

Кузнецова, Л. В., Бабаджан, В. Д., Харченко, Н. В. та ін. Імунологія: підручник. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. 565 с.

Кузнецова, Л. В., Фролова, В. М., Бабаджан, В. Д. Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник. Київ: ООО «Полиграф плюс», 2012. 922 с.

Колісник Н.В., Омелянчик Л.О. Методи лабораторної імунології. Навчальний посібник для спеціалістів і магістрів біологічного факультету. - Запоріжжя: ЗНУ, 2010. – 118 с.

Лаповець, Л. Є., Луцик, Б. Д., Лебедь, Г. Б., Акімова, В. М., Зубченко, С. О. Посібник з лабораторної імунології. Львів, 2014. 289 с.

Медичні біотехнології. Наглядна медична біотехнологія. Атлас для студентів напряму підготовки 6.0514 «Біотехнологія» / Уклад.: О. Ю. Галкін, Н. В. Дехтяренко, В. Ю. Горчаков та ін. Київ: НТУУ «КПІ», 2011. 36 с.

Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / За ред. В. П. Широбокова. 3-є вид. Вінниця: Нова Книга, 2021. 952 с.

Мельничук, М. Д., Кляченко, О. Л., Бородай, В. В., Коломієць, Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія: навч. посібник. Київ: ФОП Корзун Д. Ю., 2014. 252 с.

Основи гібридної технології: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності «Промислова біотехнологія» / Уклад.: О. Ю. Галкін, Л. М. Шинкаренко, І. В. Ніколаєнко, І. Р. Клечак. Київ: ІВЦ «Політехніка», 2004. 40 с.

Чопяк, В. В. Доказова імунопрофілактика та імунотерапія. Львів: Видавництво «Апріорі», 2013. 336 с.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L. Cellular and Molecular Immunology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2022. 600 p.

Annadurai, B. A Textbook of Immunology and Immunotechnology. New Delhi: S. Chand, 2008. 412 p.

Almagro, J. C., Daniels-Wells, T. R., Perez-Tapia, S. M., Penichet, M. L. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. Frontiers in Immunology, 2018, Vol. 8, Article 1751.

Bansal, R. Antibodies and their role in therapeutics. 2021. [Electronic resource]. Available at: [<http://surl.li/fisncr>] (Accessed: 20 May 2024).

Chen, W. C., Murawsky, C. M. Strategies for generating diverse antibody repertoires using transgenic animals expressing human antibodies. Frontiers in Immunology, 2018, p. 460.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Roitt, I. M. Roitt's Essential Immunology. 13th ed. Chichester: Wiley & Sons, 2018. 576 p.

Desheva, Y. Vaccine Development. London: IntechOpen, 2022. 248 p. Prasad, A. K. Vaccine Development: From Concept to Clinic. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2022. 320 p.

Krasnopolsky, Y., Pylypenko, D. Licensed liposomal vaccines and adjuvants in the antigen delivery system. BioTechnologia, 2022, Vol. 103, No. 4, p. 409-423.

Malysheva, K., de Rooij, M., Lowik, C., Baeten, D., Rose-John, S., Stoika, R., Korchynskiy, O. Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts. Croatian Medical Journal, 2016, Vol. 57, No. 2, p. 89-98.

Murphy, K., Weaver, C., Berg, L., Barton, G., Janeway, C. Janeway's Immunobiology. 10th ed. New York, NY: W.W. Norton and Company, 2022. 928 p.

Norman, R. A., Ambrosetti, F., Bonvin, A. M. J. J., Colwell, L. J., Kelm, S., Kumar, S., Krawczyk, K. Computational approaches to therapeutic antibody design: established methods and emerging trends. Briefings in Bioinformatics, 2020, Vol. 21, Issue 5, p. 1549–1567.

Pfeifer, B. A., Hill, A. F. Vaccine Delivery Technology: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2021. 389 p.

Rüker, F., Wozniak-Knopp, G. Introduction to Antibody Engineering. Cham: Springer, 2021. 307 p.

Shire, S. J., American Association of Pharmaceutical Scientists. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing. New York: Springer : AAPS Press, 2010. 384 p.

Sompayrac, L. M. How the Immune System Works. 6th ed. Wiley-Blackwell, 2019. 169 p. Steinitz, M. Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols. 2nd ed. New York: Humana Press, 2019. 450 p.

Tiller, T. (2011). Single B cell antibody technologies. *New Biotechnology*, 28(5), 453-457. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.014>

Varadé, J., Magadán, S., González-Fernández, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021. 805-828 p.

Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., Tong, A. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, Vol. 3, No. 1, Article 35.

Wen, E. P., Ellis, R. J., Pujar, N. S. Vaccine Development and Manufacturing. Hoboken, New Jersey: Wiley, John Wiley & Sons Inc., 2015. 500 p.

Yadav, P. R. Immuno Biotechnology. New Delhi: Discovery Publishing House, 2013. 288 p.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Львівська національна наукова бібліотека України імені В. Стефаника. URL: <https://www.lsl.lviv.ua/index.php/uk/golovna2/>

Львівська обласна універсальна наукова бібліотека. URL: <http://www.lounb.org.ua/>

Національна бібліотека України ім. В. І. Вернадського. URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WorldCat. The world's largest library catalog. URL: <https://www.worldcat.org/>

Wiley. Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

Trends in Biotechnology. URL: <https://www.cell.com/trends/biotechnology/current>

Nature Immunology. URL: <https://www.nature.com/ni/>

Science Immunology. URL: <https://www.science.org/journal/sciimmunol>

The Journal of Immunology. URL: <https://journals.aai.org/jimmunol>

Frontiers in Immunology. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology>

Roitt's Essential Immunology. URL: <https://www.roitt.com/default.asp>

World Health Organization. URL: <https://www.who.int/>

British Society for Immunology (BSI). URL: <https://www.immunology.org>

Moodle. Біотехнологія протистів. URL: <http://moodle.lvet.edu.ua/moodle/course/view.php?id=2563>