

УДК 573.6

Г.И. Андреев (6 курс, каф. ФХОМ),  
В.А. Головаченко, зав. лаб. биотехнологий, ЗАО «Алкор Био»

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПАРЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В настоящее время в нашей стране существует довольно большая группа людей, страдающих анемией. Возникновение и развитие этого серьёзного патологического состояния может быть связано со многими причинами: патологии органов кроветворения (красный костный мозг, печень, селезёнка), кровотечения, неблагоприятная экологическая ситуация, недостаточность или несбалансированность питания, воздействие различных стрессовых ситуаций и другие.

Негативные проявления данного заболевания также разнообразны и тяжело переносятся. Это синдром хронической усталости, внезапная потеря сознания, нарушения менструального цикла, извращение вкусовых ощущений, нарушения психики. Кажущаяся странность, несерьёзность симптомов (сонливость, быстрая утомляемость) заставляют людей долгое время не обращаться к врачу с чёткими жалобами. Патология же прогрессирует и в итоге может привести к серьёзным, порой необратимым нарушениям функций организма.

Поэтому доступность достоверного анализа, способного выявить наличие анемии, определить её тип (причину дефицита эритроцитов), для широкого круга населения особенно актуальна на сегодняшний день.

Одной из причин развития анемии является дефицит содержания железа в организме, что ведёт к невозможности синтеза необходимого количества полноценного гема и, следовательно, созревания функционально полноценных эритроцитов.

Достоверным критерием, по которому можно судить о количестве железа, содержащегося в организме, является концентрация белка ферритина в сыворотке крови.

Ферритин – один из основных компонентов сложной системы метаболизма железа в организме человека и животных. Основная функция ферритина заключается в хранении железа в стабильной, растворимой и нетоксичной форме до момента возникновения дополнительной потребности в нём в организме. Это белок гетерополимерной структуры (общая молекулярная масса ~450 кДа), состоящий из 2-х субъединиц двух типов (H с молекулярной массой ~21 кДа и L ~19 кДа). Он имеет форму полой глобулы, внутри которой может содержаться до 4500 атомов железа ( $Fe^{3+}$ ) в виде комплекса гидроокиси и фосфата железа. Ферритин содержится в цитоплазме клеток практически всех тканей, но наибольшее его содержание наблюдается в селезёнке, печени, костном мозге. В небольших количествах ферритин присутствует в сыворотке крови, где выполняет функцию транспорта железа от ретикулоэндотелиальных к паренхиматозным клеткам печени.

Содержание ферритина в сыворотке в норме составляет для взрослых мужчин 85-130 нг/мл и 60...150 нг/мл у женщин. О латентном дефиците железа в организме говорят при содержании ферритина в сыворотке ниже 40 нг/мл, а о железодефицитной анемии – при концентрациях менее 12 нг/мл.

Возможно использовать определение ферритина для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. В органах и тканях с новообразованиями (острый миелобластный и лимфобластный лейкоз, лимфогранулематоз, опухоли печени) нарушается депонирование железа, что приводит к увеличению содержания ферритина в сыворотке, а также усиленному выходу его из клеток при их гибели. О перегрузке железом, протекании воспалительных или злокачественных процессов в организме свидетельствуют концентрации ферритина в сыворотке у взрослых более 220 нг/мл.

Целью данной работы является создание набора реагентов для диагностики железodefицитной анемии (т.е. определения содержания белка ферритина в сыворотке крови) иммуноферментным методом.

Имуноферментный анализ является очень перспективным методом количественного определения широкого спектра веществ в образцах разной природы. Он основан на высоко-специфичной реакции связывания исследуемого антигена комплементарными антителами с высокой константой аффинности. Среди многочисленных достоинств метода можно выделить высокую чувствительность и точность, относительную простоту методики проведения анализа и короткое время, необходимое для его протекания, возможность использования для скрининговых обследований населения.

Особенностью антигенной структуры ферритина является наличие неперекрывающихся повторяющихся эпитопов к различным антителам. Это даёт возможность используя разные антитела для иммобилизации и связывания с пероксидазой, и исключая тем самым конкуренцию между ними за центры связывания на антигене, проводить анализ в одну стадию, что по сравнению с двухстадийной модификацией «сэндвич»-технологии требует на 1 – 1,5 ч меньше времени.

В проведенной работе исследовались иммунохимические свойства двух различных моноклональных антител субкласса IgG2a к ферритину.

Выяснено, что в очищенных образцах асцитной жидкости после хранения её в замороженном виде иммунологическая активность сохранилась. В качестве стандарта использовался раствор высокоочищенного селезеночного ферритина человека известной концентрации. Выбран искусственный матрикс для приготовления калибровочных растворов. Получены калибровочные кривые для разных комбинаций антител, охватывающие возможный диапазон концентраций ферритина в сыворотке при различных физиологических состояниях. Определены оптимальные концентрации иммуноглобулинов для адсорбции на пластике в посадочных растворах. На основании анализа соотношения «сигнал/фон» в результатах как одностадийных, так и двухстадийных анализов были выбраны две из четырех возможных комбинаций антител. Выявлены оптимальные титры верхних антител, конъюгированных с пероксидазой.

Проведена предварительная клиническая проверка сформированного набора реагентов на репрезентативной выборке сывороток крови 20 пациентов и стандартах фирмы BioRad. Результаты клинической проверки оказались неудовлетворительными: большое завышение полученных значений концентраций по сравнению с референтными значениями, определёнными с помощью аналогичных наборов фирм Immulite и Cobas Core. Корреляция измерений, выполненных нами, со стандартами BioRad составила 99%, а с референтными значениями концентраций сывороток – всего лишь 75%. Такой характер результатов вероятнее всего связан с повреждением антител в процессе хранения и частичной потерей их иммунологической специфичности.

Однако принципиальная возможность формирования набора реагентов для иммунологического определения концентрации ферритина в сыворотке крови человека с применением имеющихся в распоряжении лаборатории стандартных химических реагентов и растворов доказана в ходе проведенной серии опытов. К настоящему времени выбраны новые антитела, иммунологические свойства которых необходимо аналогично исследовать, и, возможно, с их применением удастся удовлетворить всем требованиям, обеспечивающим получение точного и достоверного результата анализа.