

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

Эргашева Фарангиз Илхом кизи

*Студентка педиатрического факультета Самаркандского
Государственного Медицинского Университета, г. Самарканд, Узбекистан*

Асатова Фарангиз Шерзодовна

*Студентка педиатрического факультета Самаркандского
Государственного Медицинского Университета, г. Самарканд, Узбекистан*

Научный руководитель – Ким Оксана Владиславовна

*Кафедра биологической химии, Самаркандский Государственный
Медицинский Университет, г. Самарканд, Узбекистан*

Аннотация: В клинико-лабораторной практике иммунохимические методы широко используются для определения традиционных биохимических объектов — белков, ферментов, гормонов, медиаторов, фармакологических препаратов и др. Их преимуществом является высокая чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: иммунохимические методы, клиническая биохимия, медицина, диагноз, объект.

Внедрение иммунохимических методов является одним из путей дальнейшего совершенствования диагностики заболеваний сельскохозяйственных животных, поскольку многие серологические и аллергические методы, используемые в настоящее время для диагностики ряда важных заболеваний (туберкулез, бруцеллез, колибактериоз, сальмонеллез и др.), не дают результатов. Обладают достаточной чувствительностью и специфичностью. Основой успеха иммунохимических исследований является получение иммунных сывороток высокого титра и желаемой специфичности. Способы получения иммунных сывороток до настоящего времени остаются в основном эмпирическими. Различия в иммунологической реактивности у разных животных могут зависеть от возраста, пола, массы тела, состояния нервной и эндокринной систем, полноценности рациона, условий содержания и ухода, а также ряда других факторов, порой очень важных. Сложно учитывать и стандартизировать. Поэтому иммунные сыворотки, полученные даже от

животных одного вида и при одной и той же схеме иммунизации, могут резко различаться как по титру, так и по набору антител. При приеме иммунных сывороток необходимо учитывать следующие основные условия.

1. Получение антигена. Он должен быть максимально очищен от примесей, что предотвращает появление антител различной специфичности. При этом очень важно учитывать лабильность антигенов, низкую устойчивость к различным факторам и возможность их денатурации при очистке.

2. Наиболее подходящая схема иммунизации для каждого конкретного случая подбирается эмпирически. Для стимуляции образования антител используются различные адъюванты. Лучше принимать небольшие дозы антигена, так как в этом случае снижается расход ценных препаратов и снижается вероятность образования побочных антител.

3. Оценка полученной сыворотки обязательна, так как заранее спрогнозировать ее качество невозможно. Верификации обычно подлежат титр антисыворотки, ее специфичность и avidность антител. Иммунная сыворотка должна быть максимально титровой и специфичной, т. е. она должна реагировать только с теми антигенами, которые исследуются. Высокая avidность указывает на выраженное сродство антигена и антитела. При проведении клинико-биохимических исследований наибольшее распространение получили гель-иммунодиффузионная реакция (РИД), иммуноэлектрофорез, радиоиммунологический анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА) и некоторые другие.

Реакцию гель-иммунодиффузии (РИД) применяют для анализа многокомпонентных белковых систем, сравнительного анализа антигенной структуры белков и других антигенов. Этот метод основан на способности антигенов и антител диффундировать с разной скоростью, в результате чего достигаются эквивалентные соотношения определенных антигенов и антител в разных частях геля, где формируются соответствующие линии преципитации.

Согласно этому методу, анализ проводится на плоской пластинке агара, что позволяет разместить вокруг резервуара с иммунной сывороткой несколько различных антигенов и тем самым провести их сравнительный анализ. Основными положениями, которые необходимо учитывать при организации двойной диффузии в геле, являются следующие:

1. Образование осадка происходит в достаточно узкой зоне эквивалентности, соответствующей такой концентрации антигена и антител, при которой оба компонента полностью включены в осадок.
2. Один антиген дает только одну зону преципитации.
3. Если в растворе присутствует не один, а несколько антигенов, они ведут себя независимо друг от друга. Образуется столько линий преципитации, сколько существует пар антиген-антитело.
4. Количество образующихся зон преципитации соответствует минимуму присутствующих в системе комплексов антиген-антитело.
5. Антигены и антитела, имеющие примерно равный коэффициент диффузии, образуют прямую полосу преципитации.
6. Если оба компонента используются примерно в эквивалентных количествах, то полоса преципитации располагается на равном расстоянии от резервуара с антигеном и антителом.
7. Если концентрация антигенов выше концентрации антител, то полоса преципитации располагается ближе к резервуару, содержащему антитела, и наоборот. При значительном избытке одного из компонентов линия преципитации может «загнаться» либо в резервуар с антигеном, либо в резервуар с антисывороткой и вообще не наблюдаться.
8. Если линия преципитации образована антигеном с низкой молекулярной массой, то полоса преципитации при прочих равных условиях располагается ближе к резервуару с иммунной сывороткой.

Различают три основных варианта результата двойной диффузии в геле: слияние линий преципитации (реакция идентичности), пересечение линий преципитации (реакция неидентичности), сочетание первого и второго случаев (реакция частичной идентичности - «шпора»). или «двойная шпора»). Радиоиммунологический анализ (РИА). Впервые этот метод был разработан для количественного определения инсулина с использованием гормона, меченного радиоактивным изотопом йода. Метод основан на конкуренции между нативным инсулином плазмы и меченым ^{131}I -инсулином за ограниченное количество сайтов специфического связывания на антителах к инсулину.

Помимо классического РИА, его можно проводить в твердофазном варианте. Принцип метода заключается в том, что твердую поверхность (обычно пластиковую таблетку) загружают антителами, а затем добавляют

тестируемый раствор, содержащий определяемый антиген. К образовавшемуся на носителе комплексу антиген-антитело после отмывки несвязавшегося антигена добавляют избыток радиоактивно меченых антител. Количество связанной радиоактивной метки будет зависеть от количества антигена, зафиксированного на твердом носителе.

Твердофазный радиоиммунологический анализ можно провести путем адсорбции на пластиковой панели антигена, связывающего исследуемые антитела (например, Ig G, содержащийся в сыворотке крови овцы). После отмывки оставшихся белков количество связанных антител определяют путем добавления меченых кроличьих антител ^{125}I к Ig G овцы, а затем удаления избытка меченого реагента. Количество радиоактивной метки, связанной в лунках пластиковой панели, пропорционально количеству определенных антител.

Радиоиммунологический метод можно использовать и для определения низкомолекулярных соединений. При этом определяемые вещества конъюгируют с белками или другими высокомолекулярными соединениями для придания им антигенности. Именно таким образом были разработаны радиоиммунологические методы определения простагландинов.

В настоящее время радиоиммунологический анализ проводится с использованием стандартных диагностических наборов, включающих в себя все необходимое (реагенты, посуда, инструкция по применению), изготовленных в заводских условиях. При наличии таких наборов радиоиммунологическое определение биологических объектов сводится к последовательному выполнению определенных операций и измерению радиоактивности.

Метод иммуоферментного анализа имел ряд преимуществ перед методом радиоиммунологического анализа.

1. Здесь не использовались радиоактивные изотопы. Отсутствие радиационной опасности значительно упростило условия проведения мероприятия (специальные помещения, оборудование и т.п.).
2. Гораздо большая стабильность меченых соединений (в РИА она определяется периодом полураспада изотопов).
3. Возможность быстрого определения результатов ферментативной реакции с помощью обычных общедоступных приборов (фотометров). Возможность даже визуальной оценки реакции.

4. ОВОС легко автоматизировать.

В настоящее время разработано множество вариантов анализа ОВОС. Выбор схемы анализа зависит от многих факторов, основными из которых являются молекулярная масса и валентность антигена, необходимый предел чувствительности, состав среды, в которой необходимо определить антиген, свойства фермента, возможность получения антигенов и антител в чистом виде и многое другое.

Принцип метода определения антигенов заключается в том, что к иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и синтезированный конъюгат антигена с ферментом. Идентифицированные и меченые антигены конкурируют за центры связывания антител. После определенного времени инкубации ферментный конъюгат перераспределяется между раствором и носителем. Измеренная в растворе или в твердой фазе после промывки концентрация метки пропорциональна (количественно связана) начальной концентрации определяемого антигена и после предварительной калибровки системы служит характеристикой его содержания в анализируемом веществе.\

Список литературы:

1. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. Меньшикова в.в. – москва: медицина, 1987.
2. Ubaydulloyevna z. G. Antithesis-contradiction of meanings //academia: an international multidisciplinary research journal. – 2021. – т. 11. – №. 6. – с. 693-697.
3. Абдуллаева м. Х., башарова г. Г., рахматова о. К. Преимущества индивидуального подхода в образовательном процессе //проблемы современной науки и образования. – 2019. – №. 12-1 (145).
4. Лелевич, с.в. Клиническая лабораторная диагностика / с.в. Лелевич, в.в. Воробьев, т.н. Гриневич. – гродно: гргму, 2011. – 167 с.
5. Ugli n. S. D. Types of transformer overload protection //asian journal of multidimensional research. – 2021. – т. 10. – №. 4. – с. 552-556.
6. Nabievna k. B. The study of quantitatively in linguistics //academia: an international multidisciplinary research journal. – 2021. – т. 11. – №. 3. – с. 1848-1854.
7. Farxodjonqizi f. N., dilshodjonugli n. S. Innovative processes and trends in the educational process in uzbekistan //academia: an international multidisciplinary research journal. – 2020. – т. 10. – №. 4. – с. 621-626.