

Изобретение относится к иммунологии и может быть использовано в стационарных и амбулаторных условиях для диагностики и контроля эффективности лечения заболеваний внутренних органов, например при обследовании больных коронарным атеросклерозом.

Известен способ определения липопроотеида печени в циркулирующих иммунных комплексах в крови (Ас. №1651214, G01N33/53), включающий связывание циркулирующих иммунных комплексов (ИК) субкомпонентом комплемента C1q и определение оптической плотности. После связывания ИК добавляют раствор конъюгата иммуноглобулина IgG к специфическому липопроотеиду печени с щелочной фосфатазой и при наличии 0,3 и более единиц оптической плотности определяют липопротеид, выделяемый при нарушении клеточных мембран.

Недостаток этого способа заключается в том, что он не предусматривает определение концентрации липопроотеида, т.е. проведение количественного анализа.

Известен способ определения иммунных комплексов, содержащих антиген лейкоцитов человека (HLA) (заявка РСТ №94/00760, G01N33/53, ИСМ, 1995, №84 - 09, С.51. Приоритет: США) - прототип, включающий связывание компонента комплемента C1g с твердым субстратом. Затем биологический образец, содержащий ИК, вводят в ячейки планшета для проведения иммуноферментного анализа, добавляют к биологическому образцу HLA антигена или антитело к HLA, связывают ИК с C1q и добавляют в качестве индикатора меченый реактив.

Недостатком прототипа является то, что он предусматривает качественное определение иммунных комплексов (МК), содержащих только один вид антигенов - антиген лейкоцитов человека (HLA), что сужает его область применения.

Следует заметить, что известный способ не учитывает способность C1q связывать не только ИК, но и другие компоненты сыворотки крови, например липопроотеины, что снижает его специфичность. Кроме того, данный способ не обеспечивает достаточную воспроизводимость результатов, т.к. он не предусматривает использование стандартного раствора и построение калибровочной кривой, что снижает точность исследований.

В основу изобретения поставлена задача: повышение специфичности и точности способа определения ИК, содержащих специфические антигены.

Для решения поставленной задачи авторами предложен способ, включающий связывание компонента комплемента C1q с твердым субстратом, фиксацию иммунных комплексов на комплемент C1q1 проведение иммуноферментного анализа с применением индикатора и определение оптической плотности субстратного реактива. До проведения исследования готовят стандартный раствор, перед фиксацией ИК исследуемую пробу обрабатывают раствором полиэтиленгликолем-6000 (ПЭГ-6000), а в качестве индикатора используют конъюгат антител к любому специфическому антигену в зависимости от патологического процесса.

Отличительными признаками изобретения являются:

- Дополнительно готовят стандартный раствор для построения калибровочной кривой, которую используют для определения концентрации иммунных комплексов в исследуемых пробах по величине оптической плотности.

- Перед фиксацией ИК на компоненте комплемента C1q исследуемую пробу обрабатывают раствором ПЭГ-6000.

- При проведении иммуноферментного анализа в качестве индикатора используют конъюгат антител к любому специфическому антигену в зависимости от патологического процесса.

Введение операции обработки исследуемой пробы раствором ПЭГ-6000 перед фиксацией ИК на компоненте комплемента C1q способствует повышению специфичности исследования, так как C1 по своим свойствам обладает способностью фиксировать не только ИК, но и другие компоненты сыворотки крови, а ПЭГ-6000 позволяет выделить из исследуемой пробы очищенный иммунный комплекс.

Предварительное приготовление стандартного раствора и построение калибровочной кривой, используемой для определения концентрации ИК в исследуемых пробах по величине оптической плотности, способствует повышению степени воспроизводимости и точности исследования, а также расширяет его функциональные возможности, так как позволяет проводить не только качественный анализ, но и количественный, т.е. концентрацию ИК.

Использование в качестве индикатора конъюгата антител к любому специфическому антигену позволяет расширить область применения заявляемого способа, т.е. предложенный способ может быть применен для определения ИК при различной патологии.

Отличительные признаки предложенного решения соответствуют критерию "новизна" и требованиям изобретательского уровня.

Исследования по данному способу и прототипу проведены в секторе иммунологии отдела биохимии и отделения атеросклероза и его осложнений в Институте терапии АМН Украины на 44 больных.

Использование предложенного способа в медицинской практике позволит повысить специфичность и точность способа, увеличить степень воспроизводимости и достоверности результатов исследования, а также дает возможность проводить качественный и количественный анализ и расширяет функциональные возможности способа. Кроме того, предложенный способ можно рассматривать как типовой процесс получения тест-системы определения ИК, содержащих специфические антигены.

В таблице показано преимущество заявляемого способа по сравнению с известным.

Заявляемый способ осуществляют следующим образом.

1. Приготавливают искусственные ИК с избытком антигена путем инкубации смеси растворов, содержащих ИК, например апопротеин В (Апо-В) и антитела к Апо-В, которые применяют в качестве стандарта. Инкубацию проводят при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение часа. Соотношение количества Апо-В к его антителу подбирают предварительно по реакции микропреципитации (образование осадка).

2. Разводят сыворотку крови в боратном буфере 0,1М, pH 8,4.

3. Смешивают разведенную сыворотку крови с равным объемом 5% - ного раствора полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ-6000) и инкубируют при $T = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 18 часов для осаждения иммунных комплексов.

4. Центрифугируют полученную смесь при $T = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

5. Промывают образовавшийся осадок в ПЭГ-6000 с концентрацией 2,5% и объемом, равным объему разведенной сыворотки крови.

6. Вторично центрифугируют пробы по п.4.

7. Растворяют полученный осадок в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), содержащем фосфатный буфер 0,05M pH 7,4.

8. Приготавливают последовательно разведение стандарта.

9. Смешивают пробы, подготовленные по пп.2 - 7, и последовательные разведения стандарта по п.8, с равным объемом ЗФР, содержащим 0,05% - ного Твин-20.

10. Инкубируют полученные пробы и разведения стандарта при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут и добавляют к ним ЗФР, содержащий 0,01M раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) и 0,05% - ного Твин-20.

11. Для связывания компонента комплимента C1q с твердым субстратом вносят раствор C1q в лунки планшета и инкубируют при $T = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 16 - 18 часов.

12. Вносят полученные растворы в лунки планшета и проводят иммуноферментный анализ, используя в качестве индикатора конъюгат антител к специфическому антигену, например аполипротеину-B (Апо-В), с пероксидазой с последующим измерением оптической плотности с помощью микрофотометра при длине волны 492нм.

13. Строят калибровочную кривую зависимости концентрации иммунных комплексов, например Апо-В, и оптической плотности последовательных разведений искусственных иммунных комплексов, принятых за стандарт.

14. Определяют концентрацию иммунных комплексов, содержащих специфические антигены, например Апо-В, по величине оптической плотности, используя полученную калибровочную кривую.

Осуществление заявляемого способа подтверждается на примере обследования больных коронарным атеросклерозом и контрольной группы (здоровых лиц).

Пример. Больной Б., 52 лет 21.04.95 поступил в клинику Института терапии АН Украины с диагнозом: ишемическая болезнь сердца (ИБС), стабильная стенокардия напряжения и покоя, III функциональный класс, постинфарктный (1993г.) кардиосклероз, недостаточность кровообращения II-A стадии, гипертоническая болезнь III стадии.

Для выявления участия иммунных механизмов в развитии коронарного атеросклероза больному Б. проводят исследование сыворотки крови по заявляемому способу. Предварительно готовят искусственные иммунные комплексы с избытком антигена - Апо-В. Затем у больного Б. берут натошак кровь из локтевой вены в количестве 2мл.

Перед фиксацией ИК на компоненте комплимента C1q исследуемую сыворотку крови обрабатывают раствором ПЭГ-6000 и готовят последовательные разведения стандарта: 32,4, 16,2, 5,4, 1,8, 0,6, 0,2мкг/мл. После этого добавляют забуференный физиологический раствор (ЗФР), содержащий 0,01M раствора ЭДТА и 0,05% - ного Твин-20. Для связывания компонента комплимента C1q с твердым субстратом вносят раствор C1q в лунки планшета и инкубируют при $T = 4^{\circ}\text{C}$ в течение 16 часов. Проводят иммуноферментный анализ, измеряют оптическую плотность с помощью микрофотометра при длине волны 492нм и по калибровочной кривой определяют концентрацию ИК, содержащих Апо-В.

В контрольной группе концентрация ИК, содержащих Апо-В, составила в среднем $1,736 \pm 0,067$. У больного Б. концентрация ИК, содержащих Апо-В, составила 6,518, т.е. у больного Б. содержание исследуемых ИК повышено по сравнению с их содержанием у лиц контрольной группы. Поэтому больному Б. показано назначение иммунокорректирующей терапии.

Заключение. Определение ИК, содержащих Апо-В, по предложенному способу позволило провести качественный и количественный анализ с высокой специфичностью и достоверностью, что дало возможность выявить участие иммунных механизмов в развитии коронарного атеросклероза.

Таблица

Контрольные показатели	Способы	
	Известный	Заявляемый
Воспроизводимость (Оценивают по коэффициенту вариации), %	9,7	4,9
Специфичность (Оценивают по величине оптической плотности проб, не содержащих ИК)	$0,187 \pm 0,023$	$0,101 \pm 0,008$
Функциональные возможности способа.	Возможен качественный анализ ИК, включающий один вид антигена.	Возможен качественный и количественный анализ ИК, включающий различные виды антигенов.