

Г.О. Тюрін, студент, *horhenirin@gmail.com*

Науковий керівник – доцент Юлевич О.І.

Миколаївський національний аграрний університет

У статті розглянуто проблема використання моноклональних антитіл у різних галузях. Наведено приклади застосування їх для визначення груп крові людини. Описано роботи щодо створення гібридом й отримання МКАТ проти ракових захворювань в Україні. Проведено аналіз ефективності їх застосування у сільськогосподарській сфері та медицині.

Ключові слова: антитіла, мієломи, моноклональні антитіла, імуноглобулін, антиген, терапія, кон'югати.

Постановка проблеми. Виробництво моноклональних антитіл (МКАТ) займає зараз одне з провідних місць у біотехнології. Крім широкого використання в фундаментальних дослідженнях вони застосовуються для отримання препаратів біологічно активних речовин високої чистоти, широко використовуються як діагностичні реагенти, наприклад для визначення груп крові. МКАТ виявились перспективними для лікування ряду захворювань, і в особливості для лікування хворих злоякісними пухлинами.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. У 2013 році О. Ю. Галкін, А. А. Савченко, К. І. Нікітіна, О. М. Дуган провели масштабне дослідження та одержали нові МКАТ до імуноглобулінів (ІГЛ) людини. У результаті якого було одержано оригінальний набір з 12 клонів гібридом, продуцентів моноклональних антитіл до ІГЛ людини та проведено поглиблене вивчення біологічних властивостей антитіл: встановлено їх специфічність, константу афінності та титр у культуральній рідині. А також здійснено порівняльну епітопну характеристику антитіл. Встановлено, що одержані МКАТ, спрямовані до двох епітопних регіонів на молекулі ІГЛ. Перша група МКАТ належить до епітопного регіону, що представлений трьома епітопами (два з яких перекриваються та один, що не перекривається з іншими). Другий епітопний регіон представлений лише одним епітопом [1].

У 2019 було офіційно затверджено ефективність застосування нового виду МКАТ при діагностиці бактерії *Chlamydia trachomatis* методом імуноензимного аналізу (ІЕА). Дослідження в цій сфері проводили О. Ю. Галкін, О. Б. Бесараб, Ю. В. Горшунов, О. М. Іванова, вони знайшли спосіб вдосконалити диференціальну діагностику (ІЕА). Цей метод підвищення ефективності виробництва ІЕА наборів, що призначені для діагностики хламідіозу полягає у використанні кон'югатів нормальних імуноглобулінів IgM з моноклональними антитілами до основного протеїну зовнішньої мембрани *Chlamydia trachomatis*. Результатом їх роботи стало одержання високоактивних та специфічних моноклональних антитіл до *C. trachomatis*, а також знання їхніх імунобіологічних властивостей, важливих для майбутнього біохімічного застосування [2].

Постановка завдання. Розглянути можливі напрямки використання моноклональних антитіл у сучасних дослідженнях, галузі охорони здоров'я та оцінити їх ефективність.

Матеріали і методика. В основу роботи покладено аналіз та систематизація наукової інформації у сфері використання моноклональних антитіл та аналіз ефективності методів їх застосування.

Результати досліджень. Моноклональні антитіла – результат сучасної наукової думки – фактично належать до довгоочікуваного «вічного двигуна» переважання здоров'я над хворобами. Марафон генерування МКАТ інтригує. Німецький учений П. Ерліх, який відкрив антитіла, відзначений у 1908 р. Нобелівською премією (разом з І. Мечниковим) за внесок у становлення імунології. Належно індивідуалізувати антитіла вдалося німецькому й аргентинському дослідникам Т. Келлеру і Ц. Мільштейну. Вони біотехнологічно створили гібридому – результат цілеспрямованого злиття певних клітин з різними фенотипічними характеристиками. За цю розробку у 1984 р. учених відзначили Нобелівською премією в галузі фізіології та медицини [3].

На початку 1980-х років в Україні також почалося використання моноклональних антитіл. У 2010 році в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна на основі гібридомної технології отримали МКАТ, що контролюють динаміку впливу фібриногену на утворення фібрину – речовини, що є одною з основ фізико-хімії кровообігу й гемостазу. Уперше в Україні в Інституті ім. Р. Є. Кавецького біотехнологічно створено гібридами й отримано МКАТ проти ракових концепцій. Їх використання дало змогу отримати ексклюзивні наукові дані, що стали основою для нової унітарної теорії кровотворення й уточнення сучасної класифікації гемобластозів. Імуноцитохімічні методи, які розроблено нині в Інституті ім. Р. Є. Кавецького і використовуються у створеній тут унікальній референтній лабораторії, застосовуються (у співробітництві з лікарями гематологами) у діагностичних дослідженнях в 20 областях України. Також Держслужба України з лікарських засобів розробку інституту «Антитіла моноклональні» (2011) внесла до Держреєстру медичної техніки та виробів медичного призначення [4].

Ряд захворювань, а також травматичні пошкодження, які супроводжуються великою крововтратою та розвитком геморагічного шоку, потребують переливання крові. Тому визначення груп крові, проб на сумісність крові донора і реципієнта є дуже важливим процесом. На даний час найпоширенішим методом визначення групи крові за системами АВ0 та Rh- фактора є метод з використанням моноклональних антитіл. Система АВ0 представлена двома груповими антигенами А і В (аглютиногенами) та груповим олігосахаридом Н, останній знаходиться на еритроцитах групи 0 і не має антигенної детермінанти. У межах антигену А спостерігається подальша антигенна диференціація на підгрупи А₁, А₂ та інші. Різновиди антигену В з'являються дуже рідко. Визначення груп крові за системою АВ0 ґрунтується на феномені аглютинації: на еритроцитах визначають наявність антигенів А, В за допомогою стандартних сироваток із специфічними

ізоаглютинінами чи моноклональних антитіл. МКАТ анти-А та анти-В призначені для визначення груп крові людини за системою АВ0 замість стандартних ізогемаглютинуючих сироваток [5].

Визначення груп крові за системою АВ0 у донорів і реципієнтів перехресним методом включає виявлення антигенів А і В в еритроцитах людини за допомогою МКАТ анти-А та анти-В, виявлення ізоаглютинінів а і b у сироватці або плазмі досліджуваної крові стандартними тест-еритроцитами всіх груп. Авідність, тобто час настання реакції аглютинації, її яскравість, у МКАТ анти-А та анти-В набагато вища, ніж у стандартних сироваток, особливо у випадку слабо виражених антигенів еритроцитів.

МКАТ не мають антитіл іншої специфічності і тому не викликають неспецифічної поліаглютинації еритроцитів. МКАТ анти-А та анти-В перевірені усіма поширеними методами визначення груп крові – паралельно з ізогемаглютинуючими сироватками АВ0. Результати довели надійність визначення груп крові у разі застосування моноклональних реагентів [6].

МКАТ, які використовують для імунодетекції, належать до імуноглобулінів класу G. Містять 2 важких (H) та 2 легких (L) пептидних ланцюжки, які з'єднані між собою дисульфідними місточками. Внаслідок ферментативного розщеплення утворюються 2 Fab-фрагменти – F(ab')₂- та Fc-фрагменти, де F(ab')₂-фрагмент, що еквівалентний двом фрагментам Fab.

Для імуносцинтиграфії перевагу надають не цілим молекулам, а F(ab')₂- або Fab-фрагментам. Ціла молекула метаболізується в печінці та ретикуло-ендотеліальній системі, тоді як Fab-фрагменти виділяються нирками. У разі використання F(ab')₂-фрагментів зв'язок радіоактивності в системі пухлина-фон вищий, ніж за використання цілих молекул. Цілі молекули імуноглобулінів можуть взаємодіяти з Fc-рецепторами клітин людини та призводити до хибно позитивних результатів, чого не буває в разі застосування фрагментів. Крім того, фрагменти моноклональних антитіл глибше проникають у пухлину, ніж інтактні молекули [7].

Терапія з використанням моноклональних антитіл – це метод, який використовує МКАТ 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 МКАТ, мічені певними радіоактивними ізотопами, що локалізують мічену клітинну лінію і викликають загибель уражених клітин [8].

Раніше, антитіла використовували для зв'язування з молекулами, які беруть участь у регуляції лімфоцитарних T-клітин, для видалення гальмівних шляхів, що блокують імунну відповідь T-клітин. Цей метод відомий як «чек-поінт терапія». Можна створити МКАТ, 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.

Радіоімунотерапія передбачає використання радіоактивно-кон'югованих мишачих антитіл проти клітинних антигенів. Більшість досліджень передбачає їх застосування до лімфом, оскільки це високочутливі злоякісні утворення. Для обмеження радіаційного впливу були обрані мишачі антитіла, оскільки їх висока імуногенність сприяє швидкому кліренсу пухлини.

Антитіло-спрямована ферментна лікувальна терапія передбачає застосування рак-асоційованих моноклональних антитіл, пов'язаних з ферментом, активованим лікарським препаратом. Системне введення нетоксичного агента призводить до перетворення антитіла в токсичні ліки, що викликає цитотоксичний ефект, який може бути спрямований на злоякісні клітини. Однак, клінічний успіх такого типу лікування поки обмежений.

Антитіло-лікарські кон'югати (АЛК) – це антитіла, що пов'язані з однією або декількома молекулами препарату. Зазвичай, коли АЛК зустрічається з клітиною-мішенню (наприклад, раковою клітиною), лікарський засіб запускається для її знищення. У наш час багато варіантів АЛК знаходяться на до клінічному дослідженні.

Імуноліпосоми є кон'югованими антитілами ліпосоми. Ліпосоми можуть переносити лікарські засоби або терапевтичні нуклеотиди і, коли вони кон'югуються з моноклональними антитілами, можуть бути спрямовані проти злоякісних клітин. Імуноліпосоми успішно застосовуються *in vivo* для передачі пухлин-супресуючих генів у пухлини, використовується при цьому фрагмент антитіла проти рецептора трансферину людини. У тканинах мозку та молочної залози, що були уражені клітинами раку, було досягнуто тканинно-специфічна доставка генів за допомогою імуноліпосом.

Чек-поінт терапія використовує антитіла та інші шляхи для обходу захисних бар'єрів, з допомогою яких пухлини пригнічують імунну систему. Комплексна терапія поєднує антитіла для придушення декількох захисних шарів мікросередовища пухлини [9].

Останнім часом з'явилися повідомлення про успішне застосування імуномодулюючої терапії з використанням моноклональних антитіл, здатних блокувати мультипротеїновий комплекс на поверхні Т-лімфоцитів – головної причини розвитку цукрового діабету (ЦД). Результати дослідження показали високу ефективність проведення одноразового курсу МКАТ для уповільнення прогресування ЦД та його клінічного розвитку в осіб, що належать до групи високого ризику, але без ознак захворювання, які мали аномальні результати перорального тесту на толерантність до глюкози [10].

МКАТ також успішно використовують для ідентифікації на лікування важких захворювань сільськогосподарських тварин. Наприклад, в наш використання МКАТ у діагностиці африканської чуми свиней (АЧС) є найефективнішим методом боротьби з цим захворюванням. Незважаючи на значні кошти, час і зусилля витрачені науковцями на розробку в наш час ефективної вакцини проти АЧС не існує. Тому основними засобами контролю та ерадикації хвороби залишаються швидка, коректна діагностика та застосування суворих ветеринарно-санітарних заходів. На даний час

розроблена велика кількість високочутливих і високоспецифічних методів діагностики АЧС. Антитіла проти вірусу вироблюються на останніх стадіях хвороби (7-12 днів після інфікування) і залишаються тривалій період. Діагностика АЧС може бути спрямована і на випробовування (самої дії вірусу, його антигенів, геному) та антитілу проти нього. У лабораторії досліджували: селезінку, лімфатичні вузли, мигдалеподібне тіло, нірки, сироватку крові, стабілізовану кров.

Виявлення антигену вірусу АЧС методом імуноферментного аналізу (ІФА) засновано на «сандвіч» варіанті методу. Суть його полягає в тому, що в лунки полістеролового планшета, на дні яких знаходяться адсорбовані МКАТ до вірусного білку, додають дослідні зразки, якщо зразок містить антиген вірусу, то він зв'яжеться з моноклональними антитілами. Після промивання додають вторинні МКАТ до вірусного білку (специфічні до різних епітопів), які зв'язані з пероксидазою. Якщо лунка містить зафіксований моноклональними антитілами антиген, то кон'югат (МКАТ зв'язані з пероксидазою) зв'язується з ним і після додавання відповідного субстрату, за рахунок розщеплення його пероксидазою, спостерігається забарвлення. Перевагою цього методу є придатність для дослідження великої кількості зразків. Недоліками є те, що метод придатний лише для діагностики надгострої форми АЧС, при підгострій і хронічній формі його чутливість різко знижується, в зв'язку з формуванням комплексу антиген-антитіло між антигеном вірусу і антитілами, які виробляються в організмі проти них [11].

Висновки і перспективи подальших досліджень. Терапія моноклональними антитілами може бути практично корисною для раку, аутоімунних захворювань та неврологічних порушень, які призводять до дегенерації клітин, наприклад, хвороби Альцгеймера.

Терапія моноклональними антитілами може допомогти імунній системі, оскільки вроджена імунна система реагує на фактори навколишнього середовища, з якими стикається, розрізняючи чужорідні клітини від клітин організму. Пухлинні клітини, що проліферують з високою швидкістю, або клітини тіла, які гинуть, що в подальшому спричиняє фізіологічні проблеми, як правило, спеціально не спрямовані на імунну систему, оскільки вони є власними клітинами організму. Пухлинні клітини, однак, є аномальними, і більшість них створюють незвичайні антигени, які є невідповідними для типу клітини або її середовища. МКАТ можуть мітити пухлинні клітини або аномальні клітини в організмі та ідентифікувати їх.

Поряд з безсумнівними перевагами МКАТ мають і недоліки. Вони нестабільні за зберігання у висушеному вигляді, в той час як суміш звичайних (поліклональних) антитіл завжди містить групу антитіл стійких при обраних умовах.

МКАТ часто мають надто низьку спорідненість до антигена і надмірно вузьку специфічність, що не дозволяє їх використання проти мінливих антигенів, які характерні для інфекційних агентів і пухлинних клітин. Тому одним із завдань біотехнології є розробка методів, засобів, прийомів клітинної інженерії, що будуть сприяти створенню нових форм продуцентів

або формуванню принципово нових способів їх культивування.

Однак, використання МКАТ у діагностиці різних захворювань досить успішно здійснюється у всьому світі, що лише підтверджує ефективність їх застосування як в медицині, так і в сільськогосподарських цілях.

Список використаних джерел

1. Галкін О. Ю., Савченко А. А., Нікітіна К. І., Дуган О. М. Одержання та дослідження властивостей нових моноклональних антитіл до IgE людини. *Український біохімічний журнал*, 2013. №5 (85).
2. Галкін О. Ю., Бесараб О. Б., Горшунов Ю. В., Іванова О. М. Нові моноклональні антитіла до основного протеїну зовнішньої мембрани *Chlamydia Trachomatis* та їхні імунобіологічні властивості. *Український біохімічний журнал*, 2019. №3 (91). С. 90 – 98.
3. Моноклональні антитіла – результат сучасної наукової думки – фактично належать до довгоочікуваного «вічного двигуна» переважання здоров'я над хворобами. Режим доступу: http://www.nas.gov.ua/siaz/Ways_of_development_of_Ukrainian_science/
4. У 2010 році в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна на основі гібридомної технології отримали МКАТ, що контролюють динаміку впливу фібриногену на утворення фібрину. Режим доступу: <https://dt.ua/TECHNOLOGIES/>
5. На даний час найпоширенішим методом визначення групи крові за системами АВ0 та Rh-фактора є метод з використанням моноклональних антитіл. Режим доступу: <https://ips.ligazakon.net/>
6. Закон України «Про затвердження інструкцій, регламентуючих діяльність закладів служби крові України»: чинне законодавство станом на 05 липня 1999 N 164
7. Для імуносцинтиграфії перевагу надають не цілим молекулам, а F(ab')₂- або Fab-фрагментам. Режим доступу: <https://zakononline.com.ua/>
8. Терапія з використанням моноклональних антитіл – це метод, який використовує МКАТ для моноспецифічного зв'язування з певними клітинами або білками. Режим доступу: <https://www.umsa.edu.ua/>
9. Paul Travers; Mark Walport; Mark Shlomchik (2001). *Immunobiology; Fifth Edition*. New York and London: Garland Science.
10. Моноклональні антитіла запобігають розвитку цукрового діабету 1-го типу. Режим доступу: <https://www.umj.com.ua/>
11. Африканська чума свиней: еволюція та експансія. Науково-практичне видання /уклад: В. А. Прискока, В. М. Горжеєв, В. О. Загребельний. – Київ : ДНДІЛДВСЕ, 2012. –167 с.

H.Tiurin. DIRECTIONS FOR THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES

The article deals with the problem of using monoclonal antibodies in various fields. Examples are given of their use to determine human blood groups. The paper describes the creation of a hybrid and obtaining ICAT against cancer in Ukraine. The analysis of The effectiveness of their application in the agricultural field and medicine is carried out.

Keywords: antibodies, myeloma, monoclonal antibodies, immunoglobulin, antigen, therapy, conjugates.