

**НОВЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОГО
РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА**

Пашкова О.Л.

*старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь
pashkova@blood.by;*

В данной статье рассмотрена технология разработки иммуноферментной тест-системы на основе использования пары собственных мышиных моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека. Показана эффективность и чувствительность данного набора реагентов для количественного определения растворимого рецептора трансферрина, сравнимость с коммерческим набором.

Ключевые слова: *растворимый рецептор трансферрина; моноклональное антитело; иммуноферментный анализ; дифференциальный диагноз; анемия*

**A NEW IMMUNO-ENZYMATE SET OF REAGENTS FOR
QUANTITATIVE DETERMINATION OF SOLUBLE TRANSFERRIN
RECEPTOR**

Pashkova O.L.

*Senior Researcher of the Laboratory of Biotechnology of Antibodies and Cytokines of the State Institution "Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus
pashkova@blood.by;*

This article discusses the technology for the development of an immunoassay test system based on the use of a pair of own mouse monoclonal antibodies to the soluble human transferrin receptor. It was shown the efficacy and sensitivity of this reagent kit for the quantitative determination of the soluble transferrin receptor as well as its comparable to the commercial kit.

Key words: *soluble transferrin receptor; monoclonal antibody; linked immunosorbent assay; differential diagnosis; anemia*

Любое заболевание, патологический процесс, а также ряд физиологических нарушений в организме человека в той или иной степени отражаются как на количественных характеристиках, так и на физико-химических свойствах компонентов крови и биологических жидкостей. Поэтому поиск специфических биомаркеров патологического процесса, которые позволили бы проводить не только диагностику того или иного заболевания, но и дифференцировать патогенетически близкие патологии, является актуальной задачей. На сегодняшний день, к такому специфическому иммунохимическому

биомаркеру относят растворимый рецептор трансферрина (sTfR). sTfR – это 85 кДа олигопептидная цепь, продуцируемая в результате протеолитического расщепления трансмембранного рецептора трансферрина 1 (190 кДа гликопротеина), который, в первую очередь, экспрессируется на поверхности клеток (в 80% случаев на эритроцитах), нуждающихся в железе. Считается, что концентрация sTfR в сыворотке крови отражает плотность рецепторов трансферрина на поверхности клеток и их общее количество, поэтому они тесно связаны с потребностями клеток в железе и скоростью пролиферации эритроидных клеток [1]. Таким образом, растворимый рецептор трансферрина становится одним из альтернативных параметров для оценки “статуса железа”, который, в отличие от классических биомаркеров – ферритина и трансферрина, в большинстве случаев не проявляет зависимости от наличия воспаления или хронических заболеваний, которые могут отягощать этиопатогенез анемий разной нозологии.

Несмотря на то, что о существовании рецептора трансферрина известно довольно давно, только сейчас определение его концентрации входит в лабораторную практику. Широкое распространение лабораторных тестов для выявления sTfR в Республике Беларусь сдерживается высокой стоимостью импортных диагностических наборов, а отечественного диагностикума нет. Тогда как в странах Евросоюза, США и России данный тест широко востребован и используется как для диагностики железодефицитной анемии, так и для дифференциальной диагностики данного типа анемии и анемии хронических заболеваний [2].

Целью нашего исследования явилась разработка отечественной иммуноферментной диагностической тест-системы для количественного определения растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови человека на основе использования пары мышинных моноклональных антител к sTfR.

Чтобы сделать количественный анализ растворимого рецептора трансферрина доступным для клинико-диагностических лабораторий, мы остановили свой выбор на иммуноферментном анализе (ИФА) из-за уникальной специфичности иммунохимической реакции, т.е. моноклональные антитела (МКА) связываются исключительно с определёнными антигенами. Имеет значение высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов, относительно низкая цена и удобство использования в клинико-лабораторной практике.

В ходе исследования были использованы инбредные линии мышей Balb/c из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино, Россия). Мышей иммунизировали нативным растворимым рецептором трансферрина человека (“Биалекса”, Россия) в присутствии полного и неполного адьюванта Фрейнда (“Sigma”, США) при первой и последующих иммунизациях, соответственно. Мышинные моноклональные антитела были получены с помощью гибридомной технологии слиянием иммунных спленоцитов мыши с клетками

несекретирующей ГАТ-чувствительной плазмацитомы P3X63/Ag8.653. Скрининг первичных гибридомных клонов, полученных при гибридизации спленоцитов, проводили методом прямого ИФА на антигене – sTfR. Очистку антител изотипа G из асцитной жидкости проводили методом аффинной хроматографии на колонке с белок-A-сефарозой («Amersham Biosciences», Англия). Вторые жидкофазные МКА для «сэндвич»-ИФА получали с помощью реагента NHS-биотин («Pierce», США) согласно инструкции производителя. ИФА разрабатывали по принципам, изложенным в [3]. В результате нами была получена диагностическая тест-система, принцип определения в которой основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием пары моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируются в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами мыши. Имеющийся в образцах и калибраторах sTfR связывается с иммобилизованными на твердой фазе антителами. Связавшийся sTfR взаимодействует при инкубации со вторыми биотинилированными антителами. На второй стадии связавшийся комплекс взаимодействует при инкубации с стрептовидин пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетра-метилбензидина (ТМБ). Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими растворимый рецептор. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации sTfR в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольном образце.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация sTfR в анализируемых образцах. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

Большой пласт работы был направлен на снижение «нулевого» сигнала и увеличение соотношения значимого сигнала к «нулевому» с сохранением максимально возможного линейного участка кривой. Поставленная задача решалась путем оптимизации разных этапов ИФА, включая следующие составляющие:

- концентрация иммобилизованных антител и условия сорбции;
- состав блокирующего и стабилизирующего буферных растворов и время инкубации для блокирования на пластике свободных мест связывания;
- состав буфера для промывки планшетов, время и количество промывок на разных этапах;
- состав инкубационного буфера;
- состав буфера для разведений образцов;

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

- количество биотинилированных жидких антител, специфичных к sTfR человека.

В ходе всех работ нами был получен диагностический набор реагентов со следующими характеристиками (таблица 1).

Таблица 1. - Перечень характеристик разработанного набора реагентов для определения растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа

Характеристики набора реагентов	Показатели
Специфичность	к нативному и рекомбинантному sTfR человека
Воспроизводимость	не превышает 10 %
Чувствительность	не превышает 10 нг/мл
Диапазон измерений	0,03-2 мкг/мл
Линейность	±10,0% в диапазоне концентраций 0,06-2 мкг/мл
Точность (процент «открытия»)	90-110%

Для проведения сравнительного анализа разработанного отечественного набора к sTfR с коммерческим, был использован диагностикум зарубежного производства «Quantikine IVD Soluble Transferrin Receptor ELISA» (“R&D Systems Inc.”, США). Принцип работы последнего основан также на «сэндвич»-иммуноферментном анализе с использованием 2-х различных моноклональных антител, специфичных к растворимому рецептору трансферрина. В качестве биологического материала была взята сыворотка крови практически здоровых лиц (n=15) – доноров отделения переливания крови Минского НПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии, обследованных предварительно согласно действующей инструкции по освидетельствованию доноров. Результаты уровня концентрации растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови доноров, оцененного с помощью двух разных диагностикумов, представлены в таблице 2.

Таблица 2. - Средние, минимальные и максимальные значения концентрации sTfR в сыворотке крови доноров, измеренные с использованием отечественного и коммерческого наборов

Концентрация sTfR, мг/л	
Разрабатываемая тест-система	Коммерческий набор R&D, США
2,34 (1,41-4,49)	2,63 (1,51-4,4)

Согласно литературным данным, значения концентрации sTfR в сыворотке крови у здоровых мужчин старше 18 лет находятся в диапазоне 2,2-5 мг/л, у женщин – 1,9-4,4 мг/мл [4]. Таким образом, полученные в ходе измерений значения концентрации растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови условно здоровых доноров сравнимы, как в случае использования разрабатываемой тест-системы, так и в случае применения коммерческого набора. Более того, проведенный статистический анализ между значениями концентрации sTfR в сыворотке крови (n=15), полученными с помощью разрабатываемой ИФА тест-системы и коммерческого набора, выявил сопоставимость результатов двух выборок с коэффициентом корреляции 0,95 (R=0,95).

Таким образом, в процессе выполнения исследования была разработана отечественная тест-система по количественному определению растворимого рецептора трансферрина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Она представляет собой твердофазный «сэндвич»-вариант ИФА к sTfR человека, в котором используются мышинные моноклональные антитела собственного производства: одно, иммобилизовано на твердой поверхности лунок стрипованного планшета, второе, конъюгировано с биотином. Продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность набора реагентов, а также возможность определять исследуемый биомаркер в широком диапазоне концентраций, сопоставимый со значениями, получаемыми при использовании коммерческого набора.

Работа выполнена в рамках ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», подпрограмма «Внутренние болезни».

Список литературы

1. Marijn, M. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor / M. Marijn [et al.] // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2010. – Vol. 47, iss. 5-6. – P. 213-228.
2. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations [Electronic resource]: WHO guidelines. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000124>. – Date of access: 12.03.2021.
3. Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays / P. Tijssen.; ed.: R.H. Burdon, P.H. Knippenberg. – Amsterdam, 1985. – 549 p.
4. Ярец, Ю.И. Биохимические тесты в практической медицине. Часть II: практическое пособие для врачей / Ю.И. Ярец. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2016. – 66 с.