

Е.Д. Чумакова

Использование метода аналитического микроэлектрофореза клеток крови для выявления комплекса антиген – антитело на поверхности эритроцитов

Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии

Методом аналитического микроэлектрофореза клеток крови установлены изменения электрофоретической подвижности эритроцитов, в присутствии на их поверхности комплекса антиген–антитело. Сделан вывод о различном влиянии полных (иммуноглобулины М) и неполных (иммуноглобулины G) антител на величину электрофоретической подвижности эритроцитов.

Ключевые слова: антитела, электрофоретическая подвижность эритроцитов, иммуноглобулины.

Несмотря на достигнутые успехи в разработке автоматизированных методов выявления антиэритроцитарных антител и наличие большого выбора весьма эффективных серологических методик, поиск новых принципов учета результатов реакции антиген–антитело является актуальной задачей, решение которой позволит не только повысить иммунологическую безопасность трансфузионной терапии, но и диагностировать аутоиммунный характер заболевания на его раннем этапе. Оптимальным подходом для оценки результатов реакции антиген–антитело с нашей точки зрения является определение электрофоретической подвижности клеток с использованием метода аналитического микроэлектрофореза клеток крови. Вышеуказанный метод, основанный на определении электрофоретической подвижности (ЭФП) клеток – основной способ изучения величины заряда клеточной поверхности [1, 2]. Принимая во внимание, установленные методом аналитического микроэлектрофореза клеток крови, изменения ЭФП эритроцитов в условиях специфической и неспецифической сорбции белка на их поверхности и возможности установления характера сорбции белковых молекул, нам представлялось возможным применение данного метода для идентификации комплексов антиген – антитело на поверхности эритроцитов [3, 4].

Целью исследования явилось изучение изменений ЭФП эритроцитов обусловленные образованием комплекса антиген–антитело на поверхности тест-клеток, под влиянием антител к антигенным детерминантам эритроцитов, имеющих наибольшее клиническое значение и относящихся к различным классам иммуноглобулинов.

Материалы и методы. В экспериментах использовали эритроциты периферической крови доноров, заготовленной с использованием антикоагулянта, либо эритроциты третьей фракции крови, образующейся после ее свертывания (клетки, не включенные в кровяной сгусток, располагающийся на дне пробирки) на поверхности которых экспрессированы различные сочетания антигенов систем АВ0, Резус, MNS и Kell. В качестве антисывороток применяли стандартные изогемагглютинирующие сыворотки анти-А и анти-В, аллогенные и ксеногенные анти-М сыворотки, анти-Kell сыворотки и антирезус сыворотки анти-Д, анти-С, анти-с, анти-Е, анти-е. Обработку тест-эритроцитов

сыворотками (анти-А, анти-В, анти-е, анти-М), содержащими антитела в полной форме, осуществляли после их разведения до доз, не вызывающих агглютинации клеток при 18–25°C. В случаях использования сывороток крови, содержащих неполные антитела (анти-Д, анти-С, анти-с, анти-Е, анти-Kell), клетки инкубировали в них в течение 45 мин при 37°C. Сенсibilизация эритроцитов подтверждалась положительными результатами непрямой пробы Кумбса. Пробы Кумбса выполняли с использованием антиглобулиновых сывороток, полученных нами по разработанной схеме иммунизации кроликов (шесть субконъюнктивальных введений антигена на фоне одного подкожного со стимулятором Фрейнда). ЭФП эритроцитов определяли на цитоферометре фирмы «Orton» (Германия). В качестве катафоретической среды использовали фосфатный буфер (рН 7,4) в смеси с 6%-ным раствором глюкозы в соотношении 1:3. Измерения проводили с клетками, трижды отмытыми изотоническим раствором хлорида натрия, что позволяло удалить неспецифически сорбированные белковые молекулы с их поверхности [3]. Величину ЭФП рассчитывали по формуле: $V=S/E \cdot t$, где S – расстояние, на которое передвинулись эритроциты; t – время, в течение которого они проходят это расстояние, с; E – напряженность электрического поля, В/см. Для каждого образца эритроцитов определяли ЭФП не менее 15 клеток в одну и другую стороны и высчитывали ее среднее значение для образца в целом. Для математической обработки и статистического анализа полученных данных использовали программы Microsoft Excel и Statistica 6.0. Результаты изучения ЭФП эритроцитов человека обрабатывали с использованием параметрических методов статистики. Для сравнительного анализа определяли среднее значение (M), ошибку среднего (m), уровень значимости (p). Все эксперименты выполнены на 55 образцах эритроцитов и 60 образцах антисывороток.

Результаты и их обсуждение. В первой серии экспериментов исследовании изменения ЭФП эритроцитов под влиянием неполных антиэритроцитарных антител (иммуноглобулинов G). Показано, что образование иммунных комплексов из антигенов D и направленных к ним неполных анти-D антител (иммуноглобулины G), вызывало статистически достоверное ($p < 0,05$) изменение величины ЭФП эритроцитов по отношению к контрольным образцам (интактные эритроциты – $1,18 \pm 0,007$ мкм \times с-1 \times В-1 \times см, сенсibilизированные анти-D антителами – $1,24 \pm 0,01$ мкм \times с-1 \times В-1 \times см). Сходные данные получены и при инкубации эритроцитов в сыворотках крови, содержащих, анти-С антитела в неполной форме. И в этом случае отмечалось увеличение ЭФП эритроцитов (интактные эритроциты – $1,20 \pm 0,01$ мкм \times с-1 \times В-1 \times см, сенсibilизированные анти-С антителами – $1,26 \pm 0,009$ мкм \times с-1 \times В-1 \times см, $p < 0,05$). Аналогичные результаты получены и в опытах, в которых эритроциты сенсibilизировались неполными анти-с или анти-Е антителами. В этих постановках также было показано, что во всех случаях специфическое взаимодействие антигенов системы Резус (с или Е), с направленными к ним неполными антителами (иммуноглобулинами G), приводило к достоверному увеличению ЭФП эритроцитов (сенсibilизированные анти-с антителами эритроциты – $1,24 \pm 0,01$ мкм \times с-1 \times В-1 \times см по сравнению с интактными –

1,18±0,009 мкм·с-1·В-1·см; sensibilizированные анти-Е антителами – 1,28±0,008 мкм·с-1·В-1·см по сравнению с интактными – 1,20±0,008 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$ для всех случаев). Подобный эффект отмечен и во всех случаях инкубации эритроцитов с сыворотками, содержащими неполные анти-Kell антитела (интактные эритроциты – 1,15±0,01 мкм·с-1·В-1·см, sensibilizированные анти-Kell антителами – 1,19± 0,01 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$).

Таким образом, на основании полученных в этой серии опытов данных можно заключить, что специфическое взаимодействие неполных антител (иммуноглобулинов G) не зависимо от их специфичности с антигенами, экспрессированными на поверхности эритроцитов, приводит к увеличению ЭФП эритроцитов по сравнению с контрольными образцами.

Иные результаты получены во второй серии опытов при исследовании ЭФП эритроцитов, под влиянием антиэритроцитарных антител в полной форме (иммуноглобулины M). В этой серии опытов инкубация эритроцитов в анти-е сыворотках, приводила к фиксации полных анти-е антител на поверхности эритроцитов в составе иммунных комплексов, что вызывало не увеличение ЭФП клеток-мишеней по сравнению с интактным вариантом, как во всех предыдущих экспериментах, а напротив, приводило к снижению ЭФП (интактные эритроциты – 1,13±0,01 мкм·с-1·В-1·см, sensibilizированные анти-е антителами – 1,02±0,02 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$). Однотипное изменение ЭФП тест-клеток наблюдалось и в случаях их sensibilizации полными анти-А или анти-В антителами (интактные эритроциты – 1,15±0,003 мкм·с-1·В-1·см, sensibilizированные анти-А или анти-В антителами – 1,05±0,006 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$). Аналогичный по своей направленности эффект был получен и при инкубации эритроцитов с сыворотками, содержащими аллогенные анти-м антитела в полной форме. В присутствии полных аллогенных анти-М антител (иммуноглобулинов M) на мембранах тест-клеток, во всех случаях наблюдалось снижение ЭФП исследуемых эритроцитов (1,07±0,01 мкм·с-1·В-1·см) по сравнению с интактными образцами (1,17±0,008 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$). Такое же влияние на уровень ЭФП эритроцитов оказывали и полные анти-М антитела ксеногенного происхождения (интактные эритроциты – 1,20±0,006 мкм·с-1·В-1·см, sensibilizированные ксеногенными анти-М антителами – 1,14±0,01 мкм·с-1·В-1·см, $p < 0,05$).

Полученные в этой серии опытов результаты доказывают, что специфическое взаимодействие полных антиэритроцитарных антител (иммуноглобулинов M) с поверхностными антигенами клеток-мишеней приводит к снижению ЭФП эритроцитов по сравнению с интактными образцами. По результатам этих серий экспериментов можно утверждать, что специфическое взаимодействие любых антигенов, экспрессированных на клеточной поверхности с направленными к ним антителами сопровождается изменением ЭФП эритроцитов, что позволяет рекомендовать метод аналитического микроэлектрофореза клеток крови для идентификации присутствия на клеточной поверхности комплексов антиген–антитело. Выявленный в проведенных исследованиях разнонаправленный характер влияния антител на

величину ЭФП эритроцитов, обусловленный их принадлежностью к различным классам иммуноглобулинов, позволяет рассматривать метод аналитического микроэлектрофореза клеток крови как возможный инструмент дифференцировки полных (иммуноглобулинов М) и неполных (иммуноглобулинов G) антител по направленности изменений ЭФП клеток-мишеней.

Учитывая, что в сыворотке крови в процессе сенсibilизации могут одновременно присутствовать антиэритроцитарные антитела, как в полной, так и в неполной форме, была исследована возможность их выявления методом аналитического микроэлектрофореза клеток крови. В этой серии опытов в присутствии только неполных анти-Е антител на поверхности эритроцитов, как было показано ранее, ЭФП тест-клеток увеличивалась ($1,24 \pm 0,01$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см). В то время как инкубация эритроцитов с сывороткой, содержащей смесь полных и неполных анти-Е антител, не вызывала изменений ЭФП эритроцитов ($1,17 \pm 0,01$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см) по сравнению с контрольными образцами ($1,18 \pm 0,009$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см). Аналогичные результаты, получены в экспериментах по оценке влияния на ЭФП эритроцитов смеси антител не только различного серологического типа, но и различной специфичности. Присутствие фиксированных на поверхности эритроцитов только неполных анти-Д антител, как было показано ранее, приводило к достоверному увеличению ЭФП клеток (интактные эритроциты – $1,16 \pm 0,008$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см, сенсibilизированные анти-Д антителами – $1,22 \pm 0,01$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см, $p < 0,05$). В отличие от неполных анти-Д антител, наличие на поверхности эритроцитов только полных анти-А или полных анти-В антител, вызывало снижение ЭФП клеток-мишеней ($1,11 \pm 0,007$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см, $p < 0,05$) по сравнению с интактными образцами. Обработка уже сенсibilизированных неполными анти-Д антителами эритроцитов сыворотками крови, содержащими полные анти-А или анти-В антитела, приводила к снижению ЭФП клеток-мишеней ($1,18 \pm 0,009$ мкм · с⁻¹ · В⁻¹ · см) до уровня ЭФП интактных эритроцитов. Таким образом, одновременное присутствие на поверхности эритроцитов иммунных комплексов, в состав которых включены как антитела в полной, так и в неполной формах, не зависимо от их специфичности, не вызывает достоверных изменений ЭФП клеток. Такой эффект сочетанного влияния полных и неполных антител на ЭФП эритроцитов не позволяет установить наличие или отсутствие их в сыворотке крови методом аналитического микроэлектрофореза клеток крови.

Выводы

1. Обнаружено, что специфическое взаимодействие любых рецепторов, экспрессированных на поверхности эритроцитов, с направленными к ним антиэритроцитарными антителами различной специфичности (анти-Д, анти-С, анти-с, анти-Е, анти-е, анти-М, анти-Kell) и принадлежащих к различным классам иммуноглобулинов (полные антитела – иммуноглобулины М, неполные антитела – иммуноглобулины G), приводящее к образованию иммунных комплексов на клеточной поверхности, вызывает изменение ЭФП эритроцитов, что дает возможность рекомендовать метод аналитического микроэлектрофореза клеток крови для идентификации комплекса антиген–

антитело.

2. Выявленный разнонаправленный характер влияния антител на величину ЭФП эритроцитов, обусловленный их принадлежностью к различным классам иммуноглобулинов, позволяет рассматривать метод аналитического микроэлектрофореза клеток крови как возможный инструмент дифференцировки полных (иммуноглобулинов G) и неполных (иммуноглобулинов M) антител по направленности изменений ЭФП клеток-мишеней. Повышение ЭФП эритроцитов свидетельствует об их сенсibilизации неполными антителами (иммуноглобулинами G), снижение – полными (иммуноглобулинами M).

3. Установлено, что одновременное присутствие в составе иммунных комплексов на поверхности эритроцитов как полных, так и неполных антиэритроцитарных антител не позволяет установить их наличие методом аналитического микроэлектрофореза клеток крови.

Литература

1. Харамоненко, С. С. Электрофорез клеток крови в норме и патологии / С. С. Харамоненко, А. А. Ракитянская // Минск: Беларусь, 1974. 143 с.

2. Ошевенский, Л. В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов / В. В. Ошевенский [и др.]. Нижний Новгород: ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2005. С. 20–22.

3. Чумакова, Е. Д. Повышение чувствительности проб Кумбса с использованием метода аналитического микроэлектрофореза клеток крови / Е. Д. Чумакова, В. И. Левин, Л. С. Луц // Здоровоохранение. 2008. № 8. С. 51–54.

4. Левин, В. И. Влияние сорбции белка на электрофоретическую подвижность клеток крови / В. И. Левин, Е. Д. Чумакова, Л. С. Луц // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии: сб. научн. трудов VI съезда гематологов и трансфузиологов РБ, Минск, 24–25 мая 2007 г. / РНПЦ гематологии и трансфузиологии МЗ РБ; под ред. А. И. Свирновского и М. П. Потапнева. Минск, 2007. С. 42–43.