

антигена по той же схеме. Если в исследуемой пробе сыворотки есть антитела, соответствующие добавляемому антигену, то показатели оптической плотности будут постепенно нарастать, затем стабилизируются на одном уровне, затем начнут вновь уменьшаться. Опыт доказывает, что максимальное образование преципитата происходит при определенных соотношениях антигена и антитела.

ТЕМА 5: ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕНОВ И АНТИТЕЛ ИН ВИТРО. РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ЛИЗИСА, РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК).

Реакцию иммунного лизиса и реакцию связывания комплемента можно отнести к реакциям второго поколения. Принцип ее заключается в следующем: при любом взаимодействии антигена и специфических антител в среде, где присутствует сложная система сывороточных белков, называемая комплементом, происходит обязательное связывание комплемента, что феноменологически проявляется уменьшением содержания свободного комплемента в среде и лизисом антигена, если последний является клеткой. Такой вариант реакции называется иммунным лизисом. Если антиген неклеточный (вещество), то хотя связывание комплемента происходит, и количество его уменьшается в среде, видимых изменений не происходит.

Общая характеристика реакции, проявляющейся цитолизом, представлена в таблице 6. Как видно из таблицы, в реакции иммунного лизиса антиген всегда клеточный, антитела (цитотоксины), относятся к классам иммуноглобулинов А, М, G. Обязательным неспецифическим условием реакции является присутствие комплемента в достаточном количестве. Чаще всего в качестве комплемента используют сыворотку крови морской свинки, которая содержит большое количество комплемента. В отдельных случаях применяют кровь кролика, человека (АВ IV). Реакцию можно поставить в условиях ин vivo, а также ин vitro. (в пробирках, в лунках планшета, в геле). В таблице приведен в качестве примера реакции ин vivo феномен Исаева — Пфейфера, применяемый в инфекционной патологии и для идентификации холерного вибриона, когда чистую неизвестную культуру вибриона соединяют с противохолерными антителами и вводят в брюшную полость морской свинки, биологические жидкости которой богаты комплементом. Холерный вибрион в этих условиях лизируется, что видно под микроскопом. Холероподобные вибрионы остаются без изменений.

Реакцию можно поставить ин vitro, соединив клеточный антиген, антитела и комплемент в пробирках. Например, если в ка-

РЕАКЦИЯ ИММУННОГО ЦИТОЛИЗА

Антиген	Антитела	Неспецифические условия	Феномен	Технические варианты постановки	Примеры
Клеточный	Иммуноглобулины А, М, G (цитотоксины)	Наличие компонента	Лизис антигена клеточного характера	<p>Ин vivo</p> <p>Ин vitro: в жидкой фазе</p> <p>В лунках планшета</p> <p>Ин vitro: в геле</p>	<p>Реакция Исаева—Фрейффера для идентификации холерного вибриона (исследуемая культура вибриона + диагностическая сыворотка вводится в брюшную полость морской свинки)</p> <p>Учет под микроскопом по цитолизу вибриона</p> <p>Реакция гемолиза: исследуемые эритроциты + сыворотка, содержащая антитела к эритроцитам + комплемент. Положительная реакция — лаковая кровь</p> <p>Определение HLA антигенов (лимфоцитов): исследуемые лимфоциты + диагностические сыворотки + комплемент + эозин. Учет реакции микроскопический</p> <p>Реакция Иерне для определения антигенов продуцирующих клеток в эксперименте</p> <p>Реакция радиального гемолиза для диагностики краснухи. Эритроциты, sensibilizированные вирусными антигенами, и комплемент вводят в гелевую среду, исследуемую сыворотку вносят в лунки в толщу агара, появляются зоны гемолиза</p>

честве антигена взять ЭБ, антител-сыворотку, содержащую антитела к эритроцитам барана, а в качестве источника комплемента свежую сыворотку человека, то можно увидеть в пробирке при выдерживании в термостате при 37 °С растворение эритроцитов, появление лаковой крови, видимое на глаз появление цитолиза. Этот принцип лежит в основе количественного определения в сыворотке крови комплемента (таблица 7).

Реакцию можно поставить в жидкой фазе, но в лунках планшетов. Например, этот способ широко применяется в иммуногематологии для определения лимфоцитарных антигенов системы HLA: в лунки микротитратора микрошприцем вводят диагностические сыворотки (их получают из сыворотки крови женщин, имевших в анамнезе большое число родов и беременностей), затем добавляют исследуемые лимфоциты, комплемент (в данном случае используют сыворотку крови кроликов), после инкубации при комнатной температуре добавляют эозинового краситель, реакцию ведут под слоем вазелинового масла, учитывают под микроскопом. Лизировавшиеся, погибшие лимфоциты (положительная реакция) хорошо прокрашиваются в отличие от неповрежденных клеток.

Иногда реакцию иммунного гемолиза ставят в геле. Метод локального гемолиза широко применяется в экспериментальной иммунологии для выявления антителопродуцирующих клеток.

Для этого предварительно иммунизируют животных эритроцитами барана, затем получают взвесь клеток из селезенки, которые вместе с ЭБ смешивают с агаром и тонким слоем разливают в чашки Петри. Антителообразующие клетки (АОК) реагируют с ЭБ, при добавлении комплемента вокруг АОК образуются зоны гемолиза.

Реакцию в геле можно ставить, используя в качестве антигена эритроциты, обработанные (сенсibilизированные) каким-либо антигеном (например, вирусным). Нагруженные антигеном эритроциты вводят в агаровый гель вместе с комплементом, а исследуемую сыворотку, в которой требуется определить наличие антител к вирусному антигену, вносят в лунки, вырезанные в геле. После инкубации оценивают появление зон гемолиза вокруг луночек с исследуемыми сыворотками, зоны гемолиза хорошо видны на фоне остальной поверхности агара, содержащего целые эритроциты.

Как уже было отмечено выше, видимых изменений в системе антиген-антитело-комплемент не происходит, если в реакции используется не клеточный антиген. В этом случае прибегают к постановке реакции связывания комплемента. С целью визуализации результата реакции связывания комплемента в испытуемой системе туда вводят еще одну иммунологическую систему, индикаторную (рисунок 9). Испытуемая система имеет один неизвестный иммунологический компонент (либо антиген в варианте идентификации неизвестного антигена с помощью диагностической сыворотки, либо

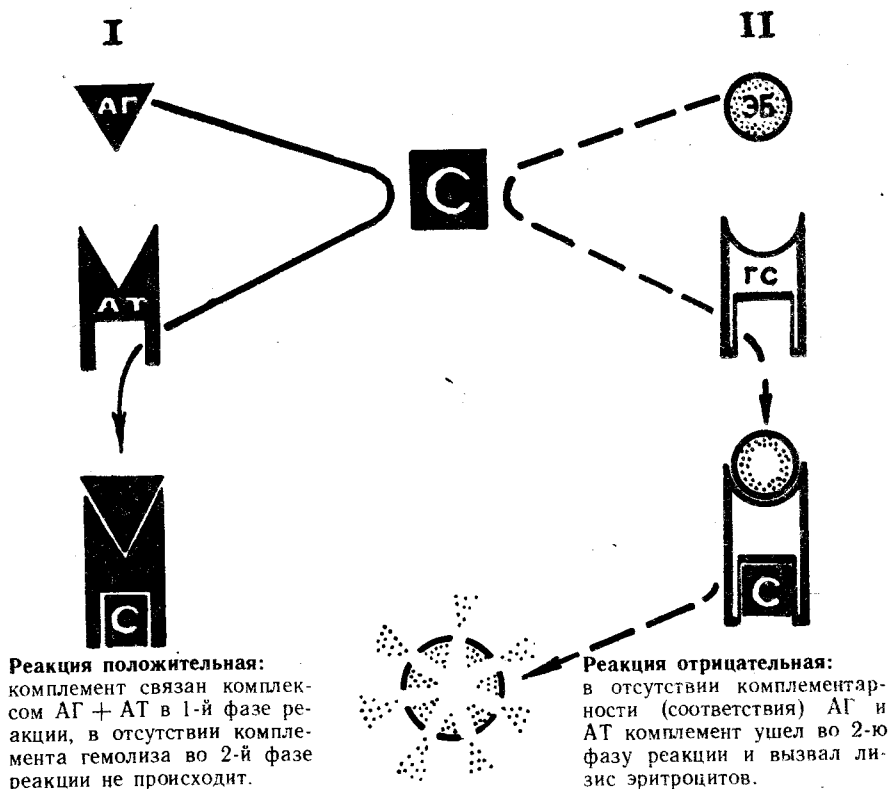


Рис. 9. Схема постановки реакции связывания комплемента

- I. испытуемая система
- II. индикаторная система
- ag — антиген
- at — антитело
- эб — эритроциты барана
- гс — гемолитическая сыворотка

антитела в варианте серодиагностики с помощью диагностикума). Индикаторная система всегда содержит оба известных иммунологических компонента: в качестве антигена в ней используют ЭБ, а в качестве антител — стандартную гемолитическую сыворотку, содержащую антитела к ЭБ. Как видно на рисунке 8, связующим звеном между двумя иммунологическими системами является комплемент. На первом этапе постановки реакции в нее вводят все компоненты испытуемой системы (известный и неизвестный), а также комплемент. После контакта компонентов испытуемой системы с комплементом, к ним добавляют готовую индикаторную систему и вновь выдерживают в термостате 30—60 минут. Если в испытуемой системе антиген и антитела соответствуют друг другу, то комплемент связывается уже на I этапе реакции с первой системой.

а индикаторная остается без изменений (реакция положительная). Если антиген и антитела в испытуемой системе не соответствуют друг другу, то оставшийся свободным после I этапа реакции комплемент вызовет лизис в индикаторной системе (реакция отрицательная).

РСК относится к чувствительным методам исследования и широко применяется в диагностике инфекционных заболеваний, а также в других областях клинической иммунологии: для определения антигенов или антител при аутоиммунных заболеваниях.

СОДЕРЖАНИЕ ЗАНЯТИЯ

1. Реакция иммунного лизиса, компоненты, условия реакции, варианты постановки, примеры.
2. РСК, компоненты реакции, техника постановки, учет реакции, примеры.

ДЕМОНСТРАЦИЯ

1. Реакция иммунного лизиса на примере определения активности комплемента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

1. Поставить реакцию связывания комплемента для определения антител к антигенам тканей почки.
2. Оформить протокол, сделать выводы.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

1. Пользуясь схемой титрования комплемента и готовым демонстрационным рядом, определить титр и рабочую дозу комплемента, внести данные в протокол.

2. Поставить РСК для определения антител к почечным антигенам.
Ингредиенты:

1. Исследуемая сыворотка, инактивированная нагреванием при 56 °С 30 минут, в разведении 1:5.
2. Антиген из тканей почки в рабочей дозе.
3. Комплемент в рабочей дозе.
4. Физиологический раствор.
5. Индикаторная гемолитическая система.

РСК основана на учете изменений количества свободного комплемента в среде, поэтому все ингредиенты реакции должны быть использованы в рабочей дозе, позволяющей уловить количественные изменения комплемента.

Исследуемая сыворотка подвергается тепловой инаktivации для разрушения собственного комплемента при 56 °С в течение 30 минут.

Антиген может обладать некоторой неспецифической связывающей способностью по отношению к комплементу, поэтому предварительно определяют рабочую дозу антигена, т. е. максимальное его количество, ко-