

# ВИДОВЕ РЕАКЦИИ АНТИГЕН- АНТИТЯЛО ИН ВИТРО; АГЛУТИНАЦИЯ И ПРЕЦИПИТАЦИЯ, ХЕМОЛИЗА, рск И ДР. ФАЗИ НА АГЛУТИНАЦИЯ И ФАКТОРИ , ОТ КОИТО ЗАВИСИ

Д-р Жанина Йорданова Иванова дм,



# АНТИГЕН- АНТИТЯЛО РЕАКЦИИ

- Антиген- антитяло реакцията е строго специфична и лежи в основата на всеки имунен отговор. Осъществява се между активния център на антитялото и детерминантата на кореспондиращият антиген.
- Фази на реакцията
  1. Фаза на фиксация
  2. Фаза на неутрализация

# АНТИГЕН-АНТИТЯЛО IN VIVO

АГЛУТИНАЦИЯ - реакция между антигените на клетъчната мембрана и кокреспондиращи антитела. Сложен процес, който в крайна фаза се характеризира с образуването на групи от клетки. В имунохематологията аглутинацията на еритроцитите се нарича хемаглутинация.

Фази на реакцията:

1. Първият етап на хемаглутинацията е свързване на антигена с антитялото и формиране на антиген-антитяло комплекси или сенсibiliзация на еритроцитите от антителата. В кръвногруповата серология антителата най-често са един от двата имуноглобулинови класа - IgM или IgG, но са описани и антитела от IgA клас.
2. Формиране на аглутинати

# Директна аглутинация

- Еритроцитите имат диаметър около 7-8 микрометра, а IgG имуноглобулините имат максимален размер около 14 нМ (нанометра). IgM и IgG молекулите свързват отделни еритроцити като разстоянието, на което са отдалечени, е около 30 нанометра. За да разберем какво означава това, трябва да си представим еритроцит с големина 50 метра свързан с IgG молекула с размери 7 сантиметра! Независимо, че молекулата на IgM е малко по-голяма от IgG и двата класа антитела трябва да се свържат с повече от една клетка, за да се реализира втория етап на хемаглутинацията. IgM молекулите в сравнение с IgG имат 5 пъти по-голяма възможност да предизвикат директна аглутинация на еритроцити. За да може IgG молекулите да предизвикат аглутинация на еритроцити, условията в реакционната среда трябва да се подобрят, така че еритроцитите да се доближат един до друг, за да могат IgG молекулите да се свържат образувайки мостчета между тях или пък да се използват други антитела, които да се присъединят към IgG молекулите и пак да доведат до образуване на аглутинация. Това е втория етап, който съществува както при директната, така и при индиректната аглутинация.

# Директна аглутинация

- ▶ Както самото име подсказва, директната аглутинация е директно следствие от реакцията антиген-антитяло. Обикновено антителата са от IgM имуноглобулинов клас и реакциите протичат оптимално при по-ниска от 37°C температура. Познати са примери и на IgG антитела, които също предизвикват директна аглутинация. Например такива са някои anti-A, anti-B и някои anti-M антитела. Това обаче е възможно, ако структурата, която носи антигенното продължение над еритроцитната повърхност е разположена така, че разстоянието между антигените на близко разположени клетки е по-малко от 14nm. Тази минимална дистанция между близко разположени клетки в условията на нормална йонна концентрация води до ефект на взаимно отблъскване поради негативния заряд на еритроцитите. Все пак IgG молекулите могат да осъществят свързване между две клетки и да образуват аглутинация. IgM антителата могат да осъществят захват на по-голяма дистанция и имат по-голям капацитет за образуване на връзки с антигени, което води до по-голяма готовност за предизвикване на директна аглутинация. Антигенната гъстота също оказва влияние. Колкото повече антигенни участъци имат клетките, толкова по-голям е шанса за образуване на антиген-антитяло комплекс и последваща аглутинация. Но близостта на антигените върху клетката не води непременно до аглутинация. Една молекула антитяло може да свърже само антигени от една клетка и да не образува мостове с други клетки, което се изисква за образуването на аглутинация.

# Директна аглутинация

В рутинната работа директната аглутинация се използва при определяне на АВО кръвногруповите антигени или при определяне на други еритроцитни антигени с човешки, поликлонални или моноклонални антитела, които директно предизвикват аглутинация. Използваните тестове могат да се осъществят на плочка, в епруветка, с технология използваща микроплаки с твърда и течна фаза или колонно аглутинационна техника без необходимост от потенциране на реакцията, за да се визуализира хемаглутинацията. Изследването на плочка или предметно стъкло не се препоръчва за начално, или окончателно определяне на антигени, особено при неонатални кръвни проби, тъй като не всички кръвногрупови антигени са напълно развити при раждането. Използването на относително нечувствителна техника може да пропусне определянето на антигени в някои случаи.

# Индиректна аглутинация

- ▶ Антитела, които не могат директно да аглутинират клетки, се откриват като се използва ензимна обработка на еритроцитната мембрана или антиглобулинов тест.
- ▶ **Ензимни техники-** В кръвногруповата серология се използват различни ензими. Най-често използваните протеази са бромелин, папаин и фицин, които имат широка специфичност да атакуват различни пептидни връзки, а трипсина и химотрипсина притежават по-прицизна специфичност при разграждане на пептидни връзки. Неураминидазата, която разцепва остатъците на сиаловата киселина, е най-ефективният ензим за намаляване на повърхностния електрически заряд на еритроцитите, но създава условия за поява на мембранната повърхност на Т-криптантгена. Еритроцити с активиран на повърхостта си Т-криптантген се аглутинират от естествените anti-T антитела, които съществуват във всеки нормален човешки серум. Протеазите отстраняват прикрепените остатъци от сиалова киселина към повърхностните пептиди. Това се използва за да се повиши способността и ефективността на определени антитела да предизвикат аглутинация. Използваните протеази не винаги причиняват Т активация.
- ▶ Ензимно третирани клетки се използват при скрининг за еритроантитела и най-вече при идентификацията им. Те са много полезни при определяне специфичността на смес от различни антитела, където едно или повече антитела са насочени срещу ензим-чувствителни антигени.
- ▶ Ензимните методи са трудни за стандартизиране. Традиционно ензимните разтвори се приготвят като се използва тегло за обемен метод. Обаче не всички прахообразни форми на ензими ще съдържат същото количество от активността след приготвяне на определен обем разтвор. Необходимо е всяка приготвена партида да се подложи на анализ, за да се гарантира на стандарта на теста. Например процедурата по папаинизиране на еритроцитите трябва внимателно да се наблюдава и контролира, за да не се допусне сенсibiliзация към криптантгени, какъвто е Т-антигена.

# Ефекти на протеазното въздействие върху еритроцитите

таблица 1. Някои ефекти при ензимно третиране на еритроцитите

<p>Отцепване на гликопротеин мембраната на еритроцита.</p> <p>Ефект 1</p>	<p>на носещ сиалова киселина (N-ацетил невраминова), най-големият носител на негативния заряд за еритроцита.</p>	<p>от намаляване на негативния заряд в мрежата.</p>	<p>Възможност за по-близък контакт на клетките и шанс за молекулите на антителата да запълнят празнината.</p>
<p>Отцепване на Гликопротеин мембраната на еритроцита.</p> <p>Ефект 2</p>	<p>от Гликопротеините са хидрофилни (привличат водните молекули).</p>	<p>Водните молекули ще бъдат в съседство с еритроцитите .</p>	<p>От това следва еритроцитите да са в много близък контакт.</p>
<p>Отцепване на гликопротеин мембраната на еритроцита.</p> <p>Ефект 3</p>	<p>на Гликопротеиновите структури се подават от еритроцитната мембрана.</p>	<p>от намалява се устойчивостта на стереоконфигурацията.</p>	<p>Антигените стават много по-достъпни за антителата.</p>
<p>Отцепване на гликопротеин мембраната на еритроцита.</p> <p>Ефект 4</p>	<p>на Гликопротеина носи определени еритроцитни антигени.</p>	<p>от загуба на антигени, най-вече от M, N, S и Duffy системи.</p>	<p>Антителата от тези специфичности не се улавят.</p>



# ВИДОВЕ РЕАКЦИИ

- ▶ **Преципитация** е реакция на антитяло и воднорастворим антиген в оптимално съотношение, което води до формирането на преципитати.
  1. Най-простата форма на преципитацияна реакция е надслояването на разтворимия антиген над малък обем антисерум.
  2. Реакцията се наблюдава в интерфазата на двата реагента. Образуват се преципитационен пръстени.
  3. Реакцията се влияе от количеството антиген и антитяло. Оптималното съотношение между двата се нарича еквивалентна зона.
- ▶ **Инхибиция**- реакцияна на антителата може да се инхибира чрез прибавяна не разтворими кръвногрупови антигени или субстанции с подобна терминални структура.
- ▶ **Пасивна аглутинация** - един разтворим антиген се фиксира върху клетка „носител“, която се аглутинира, когато се постави в контакт с хомоложно тяло.

# ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА АГЛУТИНАЦИЯТА

## ► Температура

1. Температурата влияе на различните видове химични връзки, образуващи се при реакциите между антигените и антителата.
2. Полярната връзка (на привличане), при която се разменят електрони между молекулите на донор и акцептор, протича във водна среда. Образуваните водородни връзки са екзотермични и са по-силни колкото е по-ниска температурата. Този тип връзки се асоциират с въглехидратните (карбохидратни) антигени.
3. Неполярните молекули образуват хидрофобни връзки чрез разход на вода и се срещат при по-висока температура. Тези връзки се асоциират с протеиновите антигени.
4. Температурният диапазон на действие на дадено антитяло е важна индикация за неговото клинично значение. Антителата, които предизвикват увеличена деструкция на еритроцитите *in vivo*, с изключение на антителата от АВО системата, са оптимално активни при 37°C (виж глава 6). Силното повишение на температурата може да доведе до увеличаване дисоциацията на комплекса антиген-антитяло. Този феномен се използва при метода елуция, за да се освободят антителата от свързаните с тях еритроцити, чрез нагриване до 56°C. При антитяло с оптимална температура на действие 37°C понижаването на температурата намалява възможността за свързване и е необходимо по-дълго време за инкубация или промяна на други тест параметри. Антителата с нисък авидитет могат да реагират при 37°C, но антиген-антитяло комплекса се дисоциира бързо. Тази дисоциация може да се ограничи, чрез понижаване на температурата след сенсibiliзация на 37°C.
- 5.

# ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА АГЛУТИНАЦИЯТА

- ▶ **Йонна сила и време** - За да се увеличи скоростта на реакцията между антигена и антитялото, йонната сила на средата може да се понижи. По този начин физиологичен разтвор, съдържащ по-малко  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  йони, отколкото нормалните изотонични солеви разтвори, ще пречи по-малко на комплементарното електростатично зареждане между антигена и антитялото. Това е така, защото струпаните наоколо йони неутрализират противоположните заряди на молекулите антигени и антитела. Чрез понижение броя на свободните йони в разтвора, неутрализиращият им ефект се намалява и по такъв начин нараства скоростта за формиране на комплексите антиген-антитяло. Такива разтвори в имунохематологията се означават като LISS (Low Ionic Strength Saline - разтвор с ниска йонна сила). Намалението на йонната сила трябва да е контролирано, за да не се допусне неспецифично разпознаване на имуноглобулини в „суб-LISS” условия.

# ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА АГЛУТИНАЦИЯТА

- ▶ рН - Оптималното рН на повече от антителата не е определено, въпреки че за някои от тях е известно, че реагират по-добре извън нормалната физиологична рН граница. Сигурни опити установяват, че анти-M антителата реагират оптимално при по-ниско от 7,0 рН и за да се идентифицира тяхната специфичност, трябва да се подкисли изследвания серум. При нормални условия рН 7,0 е приемливо, защото еритроцитите носят негативен заряд, а при рН 7-7,5 повече от молекулите на антителата са със слабо позитивен заряд. Това повишава привличането между реагентите по време на първата фаза от аглутинацията - сенсibiliзация. Използваният фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PSB-Phosphate Buffered Saline) вместо физиологичния разтвор в рутинните лабораторни тестове не е кисел. Значителното понижение на рН условията на средата увеличава дисоциацията на антиген-антитяло комплексите. Това свойство се използва при процедурите на метода кисела елуция, където се желае отделяне на антигена от свързаното с него антитяло.

# ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА АГЛУТИНАЦИЯТА

## ▶ Антигенна плътност

- ▶ Броя на антигените върху клетките и достъпа до тези антигени е от значение за свързване със съответното антитяло. В условия на излишък от антигени броят на молекулите на антителата, свързващи близко разположени клетки, е относително намален, поради което има слаба аглутинация или се формират само няколко по-големи аглутината. В рутинната практика, при различните тест методи, обикновено се използва излишък на антитела. При имунохематологичните реакции от много важно значение е съотношението на серума към клетките в него. Например, в условията на LISS, отношението серум / клетки изисква да бъде минимум 40:1. При по-ниско съотношение се констатира понижена чувствителност на теста. Отношението серум / клетки може да се изчисли по следната формула:

(обем на серума x 100)

-----  
(обем на клетките) x (% на еритроцитната суспензия)

- ▶ Например, при LISS техниката ако използваме 2 обема серум и 2 обема клетки при 1,5% на клетъчната суспензия, то отношението серум / клетки ( $2 \times 100 : 2 \times 1,5$ ) е около 66:1. При антитяло с ниска свързваща константа ( $K_0$ ) увеличението на броя на антителата повишава чувствителността на теста, но може да се изяви така наречения „зонов феномен“, при който излишъкът на антитела инхибира аглутинацията. Това се получава когато всички налични антигени по клетъчната повърхост са свързани с антитела. Няма свободно място по клетките, към което да се прикрепят антитела и да послужат като мостчета за свързване на отделните клетки в аглутинат. Често при тази ситуация се получават единични, малки аглутинати, но без видима аглутинация. При разреждане на антителата реакцията продължава с нормална аглутинираща сила (достига се до „зона на еквивалентност“ различна от „зоновия феномен“ с излишък на антитела).

**БЛАГОДАРЯ**

**ЗА ВНИМАНИЕТО**

