

AZ IMMUNOLÓGIAI KUTATÁSOK MÓDSZERTANA ÉS AZ IMMUNOLÓGIA MINT KUTATÓ MÓDSZER*

PETRÁNYI GYULA, az MTA levelező tagja

Közlésre érkezett: 1976. VI. 7.

Az immunológiai kutatások klinikai (*in vivo*) megfigyelésekkel indultak. A Pirquet-féle bőrpróba volt az első általánosan elterjedt immunológiai vizsgálat (mely a pontosabb változatában mint Mantoux-próba máig is standard módszer) és őse az allergia (hyperszenzitivitás) ma is használt kimutatásának. Az *in vitro* módszerek is ugyancsak a századunk elején vátak ismertté az antitestek kimutatására (az antigen praecipitációja és agglutinációja), első sorban a fertőző betegségek elleni immunitás vizsgálatára a betegek, ill. védőoltásban részesültek séréumából. Ezzel kialakult tudományként a serologia, mely azonban a nevével szemben nem a serum összetételét elemző tudomány, hanem kizárólag az antitestek vizsgálatáé. Kiegészítette a serológiai módszereket a complement fölismerése és mérésének lehetősége haemolysin rendszerben, prototípusként a ma már kissé megtépett hírnevű, de a syphilis virágzása idején óriási jelentőségű Wassermann-reakcióval. Itt már két specifikus immunreakció kombinációja szerepel.

Ebből a nagyon rövid történeti felsorolásból is világos, hogy amikor az immunológia tudományá vált, már fölismerték, hogy minden más szerv-, szövet-funkció kutatásával szemben, a specificitás miatt az immun-funkció szinte kizárólag önmagával, önmaga módszereivel kutatható. Az antigén csak az immunreakcióval ismerhető fel antigénként, és a specifikus immunkészültséget csakis az antigenjével vizsgálhatjuk. Az is ismert már a századunk eleje, tehát a serologia kifejlődése óta, hogy a serológiai kimutatás érzékenysége az organikus kémiai analysis módszereit sokszorosan felülmúlja és így antigen tulajdonságú anyagok *in vitro* quantitative mérhetők semmilyen más módszerrel nem lehetséges minimális mennyiségben. Adva volt tehát az immunológiai methodikák két iránya:

1. Az első az immunológiának, a szervezeti specifikus immunreactivitás nagyon bonyolult rejtelseinek a kutatása az immunológiának a szervezettől eltanult saját módszereivel; ez orvosi szempontból 3 részre osztható: *a*) immunodiagnosztika, *b*) immunotherápia és *c*) az immunopreventio kutatására.

* Előadás. Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémia 1976. május 4-i ülésén

2. A második irány a rendkívül specifikusan reagáló antitestek révén az organikus immunokémiai analtika, az immunoassay, melyet rendkívül egyszerű super-mikromódszerként alkalmazunk antigen, ill. antigénné tehető anyagok kvantitatív in vitro meghatározására, elsősorban az orvosi és biológiai laboratóriumokban.

Az immunológia fejlődése meggyorsult a századunk közepe, de főleg a 60-as évek óta és mind a kétféle módszertan ma már mindennapos rutin a medicinában, és nélkülözhetetlen a biológiai kutatás minden ágában.

Az előadás célja — egy ilyen interdiszciplináris fórumon, hogy rámutasson az immunológia és vizsgálómódszerei általános biológiai jelentőségére.

Az előadási idő szűk kerete miatt részletekbe nem mehetek, hiszen a választott téma több kötetes monographia anyaga. Csak vázlatosan tudom az immunológiai kutatás módszertanát, valamint az immunoassayk óriási kiterjedtségét bemutatni, teljességre törekvés nélkül.

I.

A. Immunodiagnosztika. Az ember egyedi immun-funkcióinak vizsgálata, immun-funkciós próbák

A módszereket csoportosíthatjuk:

1. *az orvosi vizsgálat sorrendjében*: először felsoroljuk a szinte kötelező „rutin” vizsgálatokat, azután a megfelelő indoklással indikálhatókat; meghatározzuk tehát, hogy az immunfunkcióból mit akarunk vizsgálni és ehhez megnevezzük az immunológiai módszereket;

2. *a laboratóriumi lehetőségek szerint*; felsoroljuk a módszertípusokat és változataikat, megemlítve, hogy mit lehet velük vizsgálni.

Az első megfelelőbb az orvos részére, aki valamilyen célú vizsgálatot, kimutatást indikál, utóbbi megfelelőbb a laboratóriumi technikusnak, aki aránylag kis számú egyszerű módszertani repertoárral is sok mindenre képes.

A vizsgálható részleteket az I.-a-b-c-d táblázatok sorolják fel.

Az immunitás szerzett tulajdonság. Az indukciót (primertípusú immunválaszt), a produkciót, készültséget és a reindukciót (secunder típusú immunválaszt) külön-külön akkor érdemes vizsgálni, ha az immun-systéma teljesítőképességét, ill. az erre gyakorolt hatásokat vizsgáljuk (pl. immunostimulatiót, ill. immunosuppressziót). Külön-külön kell vizsgálnunk az immun-válasz két fő típusát, az antitest-képzést és a sejtközvetítette reakciót, valamint a kettő cooperatioját.

Az antitestekre vonatkozóan tudjuk, hogy a primer válasz főleg IgM osztályú antitesteket produkál, később pedig főleg IgG osztályúak termelődnek. Érdemes tehát megvizsgálni, hogy a protektív antitest titer, ill. titeremel-

I. Táblázat

AZ IMMUNITÁS RÉSZFUNKCIÓI

A. Az immun-válasz típusai szerint

1. Humoralis { immuno globulinok: IgG, IgA, IgM, IgE
spec. antitestek: "természetes" ag-k ellen
"mesterséges" ag-k ellen
2. Celluláris { B-sejtek plasma sejtek }
T-sejtek }
3. Cooperativ ——— anticoooperativ
T → B helper, suppressor (blokkolás)
LDA - ADCC

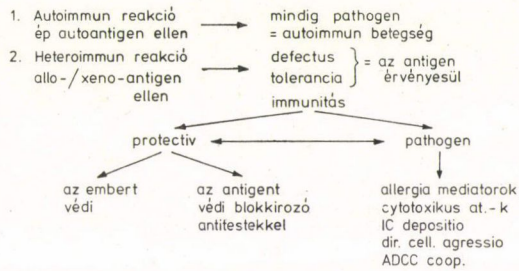
B. Az antigen-inger időpontja szerint

1. Első antigen inger = az immun válasz indukciója
induktív fázis, primaer immun-válasz
2. Második ill. későbbi antigen-inger = reindukció, secundaer immun-válasz
3. Fennálló immun készütség újabb antigen-inger nélkül

C. Az IR következményeinek a vizsgálata

1. Az IR hiánya congenitalis? szerzett? { totális = életképtelenség
partialis = agammaglobulinaemia
dysgammaglobulinaemia
cellularis (T-sejt) hiánya
2. Specifikus immun-tolerancia { high dose
low dose
3. Protectiv immunitas: "tünetmentes" IR (antitoxin stb.)
4. Pathogen IR : a.- allergia mediátorokkal (I.) (Histamin stb.)
cytotoxicus antitestekkel (II.)
pathogen immunkomplexekkel (III.)
b.- cytotoxicus lymphocytákkal (IV.)
k-sejtek
c.- cooperativ funkcióval

D. Az antigen származása szerint



kedés főleg az IgM vagy az IgG frakcióban található-e, ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy egy bizonyos antitest titer mikori infekcióra utal, hogy egy relatíve tünetmentes infekció (pl. rubeola) — akkor frissen érte-e a terhes nőt (ennek foetalis veszélyeivel), vagy csak a már régen fennálló immun-készütség fokozódott egy kivédett veszélytelen reinfekció által.

Külön kell vizsgálnunk, hogy az immun-válasz, ill. készütség bizonyos antigenekkel szemben milyen következményű. Az IR következményeinek a

vizsgálatát (I.c. tábl.) akkor végezzük, ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy milyen következményekkel fog járni az, ha nem óvatos kipuhatóldzással kapja a szervezet az antigent, hanem spontán, az élet viszontagságaiban esetleg nagy adagban: érvényesülhet-e az antigén egy esetleges immundefectus miatt vagy pathogen reactio (allergiás betegség) várható-e, vagy teljesen tünetmentes észrevétlen kivédés, vagy pedig antigen hordozás, pl. vírus-persistentia a maga epidemiologiai veszélyével.

Az antigén származásának a kutatásával diagnosztizálhatjuk a különbséget, amely az auto- és heteroimmun kórkép közt fennáll. A kérdés lényege az, hogy a heteroantigen (legalábbis elvileg) eliminálható. Ha a saját szövet necrotizál, már nem tekinthető ép sajátnek és az ellene irányuló „eltakarító” immun-reactio nem tévesztendő össze a saját ép egészséges szövetet megtámadó autoimmun reakcióval.

Az immunológia tette lehetővé az autoantigének kutatását. A human antigenek rendszereinek egyre tökéletesedő felismerése ad módot a reakciómentes allogen transzfúziókra és az egyre sikeresebb szervtranszplantációkra. A major hisztokompatibilitási rendszer felderítése azért is jelentős, mert génjei valószínűleg kapcsolatban vannak az IR gen(ek)el, amely kutatás további reményeket kelt a transzplantológiában.

Ha egy vizsgált antigen ellen egy ember serumában antitestet találunk és egyben az antigen hatásaival szemben az illető immunis, ebből még nem következik, hogy az immunitás e keringő specifikus antitest következménye, mert az antitest csak azt bizonyítja, hogy az antigen-stimuláció megtörtént, de azt már külön kell bizonyítanunk, hogy az immunitás (készültség, ill. reakciós következmény) az antitest, ill. spec. cellularis reakció vagy cooperativ funkció (LDA, ADCC) következménye.

Ha ismert antigen ellen van spec. antitestünk, akkor az *antitest* letisztítva (és esetleg még fluoresceinnel, radioaktivitással stb. nyomjelezve) *reagenssé válik*, mellyel az immunológia visszahatólag tovább kutatható. Így kereshetjük magukat az antitesteket, az egyes Ig osztályokat és alosztályokat is a vérben, nyirokban, nyirokszövetekben, csontvelőben stb. Kereshetjük a spec. antitesteket az őket termelő sejtjeik felületén, valamint az antigent hordozó struktúrákban, basalmembránokban in situ, post mortem vagy biopsiás anyagban. Persze lehetséges, hogy az antitest (AT) esetleg nem immunospecifikusan kötődött, hanem mint immun-complex (IC) deponálódott és akkor megint az IC antigenjét (AG) kell keresnünk, vagy egyszerűen az AG—AT formáció bizonyítására a complement jelenlétét is, megint csak nyomjelzett specifikus complement-faktorok elleni antitestek segítségével. Ha egy szövetben, sejtfelületen in situ IC-t találunk, abból tovább kell következtetnünk és újabb immunológiai diagnosztikai módszerek végzését indikálnunk: így a már említett IC-képző antigen megkeresésén kívül az IC jelenlétét a keringésben is, prognosticai célra és végül annak az okát, hogy miért képződhetett, ill.

képződik tartósan IC, azaz az IR miatt nem semmisíti meg az AG-t, mi az oka az AG persistenciának.

Ha — és ez többnyire valószínű — komplex antigenek ellen a serumban egyszerre többféle antitest is képződik, akkor az immunohistologia, mint módszer a legegyszerűbb a többféle antitest kimutatására, mert a fluorescens kötődési mintából (pl. sejtmagban suspenzió) az antinuclearis antitestek többféleségét egyszerre ránézéssel valószínűsíthetjük.

Az immun-funkció vizsgálatára szolgáló módszereknek hierarchiájuk van, az átlagos általános vizsgálatban rutinszerűen szereplőktől a különlegesen indikáltakig (II. tábl.).

II. Táblázat

AZ IMMUNFUNCTIOS PRÓBÁK SORRENDJE AZ ORVOSI DIAGNOSZTIKÁBAN

1. Rutin módszerek
 - Anamnesis !!!
 - Fizikális vizsgálat { nyirokcsomók, lép, máj
bőr és nyálkahártyák
 - Vérkép { rel. %
abs.-sejtszámok
 - Serum fehérjék, papír elfo: gammaglobulin { rel. %
conc. g %
2. Indikált immunológiai vizsgálatok
 - in vitro: serológiai
cytomorphológiai
supravitalis functios vizsgálatok
 - in vivo: provokációs, expozíciós próbák

A gyakorló orvos számára szolgáló diagnosztikai alapszabály az immunológiai diagnosztikára is érvényes: *a jó anamnesis* fél diagnosis, sőt néha teljes diagnosis, amely további vizsgálatokkal már csak megerősítésre vár. Fontos ez immun-defectusok, spec. allergiák (heteroimmun kórképek) és autoimmun kórképek kiderítésében, immunogenetikai adatok keresésében. A rutinvizsgálatok közül immunológiai diagnosztikai jelentőségű a *nyirokcsomók* aplasiájának vagy hyperplasiájának (nyirokcsomók, lép, tonsillák) a keresése, nyálkahártyák, bőr, hajzat alapos megtekintése, megtapintása az érzékszervi („fizikális”) vizsgálat során. A „blikk”-diagnosisnak az immunopathológiai diagnosztikában is nagyon-nagyon nagy a jelentősége.

A laboratóriumi rutin vizsgálatok közül a vérképet „haematológiai” vizsgálatként szokás végezni, pedig alapvetően fontos immunológiai adat, csak a rel. %-számok mellett az abs. sejtszámot is érdemes kiszámítani és értékelni, és a lymphocyta alakokra is érdemes figyelmet fordítani. A gyorsult vs. sülyedés mögött is a serum fehérjék, elsősorban az Ig frakciók megváltozására kell gondolnunk. Tudnunk kell, hogy a serumfehérje, ill. ezen belül a papírelfóval kapott gammaglobulin mennyiséget hogyan értékeljük. Az Ig-k

meghatározása automatizálható és valószínűleg rutin, sőt szűrővizsgálattá fog válni az óvodás-iskolás kor elején.

Rutin vizsgálat az *autoantigén* meghatározások közül az ABO-Rh vércsoport meghatározása (annyira, hogy ujjlenyomattal együtt a személyi igazolványban is helyet kellene kapnia). Nyilvánvaló, hogy az immunológiai vizsgálatok egy része tartós fölvilágosítást ad, tehát az ismételtetése az élet folyamán fölösleges, vagy csak különleges indikáció alapján válhat szükségessé.

A rutin vizeletvizsgálatból immunológiai jelentőségű a pozitív fehérje próba (immunopathogenezisű nephritisek, Bence—Jones-fehérje).

A *fertőző betegségek* diagnosztikájában jól ismert a spec. antitestek kimutatásának az értéke (precipitációs, agglutinációs és complement-kötési próbák, direkte vagy neutralisatioval, ill. gátlással). Ha feltételezett fertőzés (diphtheria, tetanus) adott esetében kellemetlen lehetne a beteg újraoltása vagy passív immunizálása, a nagy antitoxin titer ismerete ettől megkímélheti a beteget. Az állati serumok nagy veszélyeit ismerjük. Sokkal jobb módszer lenne a passív immunizálás human antitestekkel, pl. nagy titerű human antitetanus antitest — (Ig) — koncentratummal és a human immunotherapiás módszerek közül ma már törölni kellene a heterolog (állati, általában ló stb.) serumok alkalmazását.

A nyomjelzett antitesteket baktériumok kimutatására is jól lehet használni, antigen-differenciák, ill. azonosságok keresésére is. A vírus-betegségek diagnózisához az orvos gyakran kéri a nehezebb vírus-kimutatás mellett, ill. helyett a betegének aktuális betegsége szempontjából néha értékesebb anti-vírus-antitest keresését. Így pl. értékes lehet az infectios mononucleosis differencialdiagnosztikájában az EB vagy cytomegalia vírusok elleni antitest titer növekedésének (és az IgM és IgG osztályok közti megoszlásának) a kimutatása.

Az *in vivo* bőrpróbák közül a fertőző betegségekben ma már fölöslegessé vált a Dick-, Schick-, viszont a tuberculin próba (Mantoux) átmeneti visszaesés után továbbra is jelentős, mert a tbc-n kívül hasznos az egyéb betegségekben szenvedők (Hodgkin-kór, lymphomák,¹ egyéb tumrok, autoimmun betegségek) cellularis (késői típusú) immunreaktivitás-ingadozásának a mérésére, amennyiben előzőleg pozitív volt. Hasonló célra más infekciós késői hyperszenzitivitási bőrpróba is fölhasználható (mumps, trychophyton, DNCB stb.). Az antiinfekciós immunitás módszereinek tárgyalásakor is hangsúlyozni kell, hogy a spec. antitest csak a toxinok ellen ad teljes védelmet, tehát egyéb bakteriális és virális kórképekben csak jelzője, hogy a betegnek a védelmet adó cellularis immunitása is meglehet.

A bőrpróbák természetesen kellemetlenek a betegnek, ezért amennyire csak lehet, igyekszünk kerülni őket. Már etikai okokból sem alkalmazzuk egészséges emberek bevonását, így a Prausnitz—Küstner- vagy a „third man” teszteket. *Allergiás betegségekben* azonban mégis néha nem nélkülözhető a beteg

expositio próbája az egyénileg pathogen heteroantigen (allergen) megkeresésére, mert ezek pathogen spec. antitestjei *in vitro* még ma sem mutathatók ki (azért nevezték el ezeket az antitesteket reaginoknak). Ma ugyan már tudjuk, hogy ezek főleg az IgE-osztályban találhatóak, de az IgE koncentráció kicsi és mennyiségének fokozottsága csak utal arra, hogy több a „reagin”, de nem határozza meg a spec. antitestet és ezzel az allergént. További baj, hogy egyrészt nem minden allergia ad bőrreakciót (az egyéb *expositio* pedig annyira kellemetlen, sőt veszélyes, hogy elhagyásuk indokolt), másrészt a lehetséges allergenek száma nagyon nagy és így egyszerűbb egyrészt az anamnesisre, másrészt az eliminációs módszerre támaszkodni. A specifikus reagin-antitestekre kidolgozott legújabb radioimmunosorben teszt (RAST) értéke, haszna még bizonyításra szorul.

A legnagyobb jelentőségűvé az utóbbi időben az *autoimmun betegségek* diagnosztizálására alkalmas módszerek váltak, egyrészt az autoantitestek, másrészt a cellularis autoaggresszivitás kimutatásának a módszerei. Ezekkel a módszerekkel nemcsak a diagnosztikai, hanem egész orvosi, sőt általános biológiai gondolkodásunkban egy új világ nyílt meg. Csak a legfontosabb vizsgálatok neveit tudom felsorolni: az LE-sejt jelenség, antinuclearis, anti-DNS, anti-RNS, antihiston, antisubcellularis (antimitochondrialis, antimikrosomalis) antitestek, BM (pl. glomerularis basalmembran, GBM) elleni antitest, szervellenes antitestek (pajzsmirigy, gyomor-nyálkahártya, mellékvese, agyszövet stb.), vvs, fvs, thrombocytá elleni antitestek (anti-ABO, -Rh, -HL-A), az antiprotein, lipoprotein, antiglobulin, antienzym, anticoagulációs factor, antiintrinsic-factor stb. stb., antitestek. Végeredményben még nem is tudjuk, hány különböző antigen-struktúrából kombinálódik össze az egyén teljes hatalmas egyedi unicum antigén-mozaik képe, de azt már tudjuk, hogy elvileg antitest mindegyik ellen képződhet. Nagy jelentőségű diagnosztikailag az IC-ek kimutatása *in situ* a beteg szervekben, de prognosztikailag a vérből is.

A diagnosztikai módszerek összességükben a cél-igényt illetően tehát 4 csoportba oszthatók: 1. normális-e, átlagos-e az immunfunkciója az egyénnek (ált. immunfunkciós próbák), 2. nincs-e valamilyen immundefektus, 3. milyen antigenek (toxinok stb.) ellen van készültsége, 4. nincs-e pathogen reaktivitása egyes hetero-, ill. autoantigenekkel szemben.

B. Az immunotherápia és immunopreventio módszerei

1. Általánosságban immun-defectus, immunoinsufficiencia esetén a defectust kellene pótolni és az immunfunkciót stimulálni. Gyakran fölmerül az orvosi gyakorlatban egy nem-spec. ált. immunostimulációs módszer szükségessége is (kísérletek folynak Levamisol, CBP, BCG alkalmazásával). Ugyanígy experimentalis stádiumban van az immun-systema hiányában a T-sejtek pótlása implantációval a csecsemőkorban, immun-funkció kifejlesztés thymus

hormonnal, egyes részfunkciókra serkentés transferfactorral (TF). A B-sejt-funkció stimulálása ugyancsak kísérleti állapotban van, bár utólag gamma-globulin (Ig), ill. spec. human antitest transferrel sokkal könnyebben pótolható, mint az alapvetőbb T-sejt-funkció és cooperatio hiány.

2. Az allergia, ill. autoimmun reaktivitás lényegében funkciós kisiklás, tehát *immunokorrektív* terápiára szorulna, de ilyen módszerekkel nem rendelkezünk. Ezért empirikusan a mediator- és gyulladásgátláson kívül, akárcsak transzplantált allograft szerv védelmére az *immunosuppressio* módszereit alkalmazzuk (corticosteroidok nagy dosisa, lymphocytocid, ill. -statikus gyógyszerek, ALS, ill. ATG).

3. Az immunoterapia és preventio problémáinak egyik nagyon fontos kutatási iránya a tumor-immunológia.

C. Immunológiai laboratóriumi módszerek

Az igény tehát óriási, a kérdés az, hogy lehet a mai munkaerőhiányos szűk laboratóriumi keretek közt kielégíteni. A módszerek egy része (az immunokémia) közel áll a rutin laborok analytikai fölkészültségéhez, a másik része inkább cytologiai-biológiai és nagyobb, külön fölkészültséget kíván elméletileg is és fölszerelésben is.

A módszereknek vannak egészen egyszerű változatai, amelyek (bár elsősorban szűrővizsgálatokra valók, mégis) kis laboratóriumok részére is ideálisak. Egyszerűek a kvalitatív precipitációs-agglutinációs-flocculációs lemez-módszerek; ezekhez még kis laboratórium se kell, bárhol elvégezhető. Egyszerű és pontos a praecipitáció quantitatív módszere is (a komplikált cső-hígítás helyett) a Takátsy-készlettel; még egyszerűbb ha pl. a Mancini-féle radial-diffúzióhoz a célnak megfelelő lemezeket készen vásárolhatnak meg a laboratóriumok. Az LE-sejt jelenséghez — bár már munkaigényes, csak egy thermostat és fénymikroszkóp kell a hozzáértésen kívül. Ezzel szemben pl. az ANA mennyiségi becsléséhez és a szervellenes antitestek specifikus in situ kimutatásához kriosztát-metszés és UV mikroszkópia kell, tehát drága alapfölszerelés az ugyancsak drága immun-reagenseken kívül. A legkomplikáltabbak a sejt-tenyésztést (ly-culturát) igénylő módszerek, ezt megelőző lymphocytá separálással, mint pl. B és T sejt-szám meghatározás, a mitogen effectus, ill. blast-transformatio nonspec. és spec. vizsgálata, a MLC, az ADCC, a lymphokin-termelés (pl. MIF) mérése. Ezekre már csak kutató laboratóriumok vállalkoznak. A módszer fölsorolást a III. táblázat adja.

A nagy specificitású rendkívül érzékeny, mikromennyiségű antigének kimutatására végzett antigen-antitest reakciós, ill. kötési-kompetíciós módszerek természetesen nem immunológiai kutatásra is használhatók, és így alakult ki az antigen, ill. antigen tulajdonságúvá tehető anyagok meghatározására — mint laboratóriumi mérőmódszer — az immunoassay.

III. Táblázat

Az immunológia vizsgáló módszerei

I. Immunológiai módszerek

Antigen keresése az antitesttel
Antitest keresése az antigennel

A. In vitro

1. Immunokémia

Precipitáció: { kémcsőben
közvetlenül { capillarisban
 { tárgylemezen hígítási sorok
 { Takátsy-lemezen

{ Immunodiffusio,
Kettősdiffusio
Radiáldiffusio, quantitativ
Immunelectrophoresis
Electroimmunodiffusio
Ellen-immunoelfo

fentiek radioizotop nyomjelzéssel és autoradiografiával

Agglutináció:

activ { Enterobact. agglutinatio
(direkt) { ABO-vércsoport stb. agglutinatio

passiv { Passiv haemagglutinatio
{ Absorbens suspensio agglutinatio (latex stb.)

indirect: Agglutinatio gátlás

Összetett technikák

AT-AG kötés complement fölhasználással
Coombs-technika, anti-Ig-módszerek

2. Immunohistológia

Nyomjelzett antigennel, ill. antitesttel a neki spec. antitest, ill. antigen kimutatása in situ szövetekben, sejteken, sejtekben direkte vagy „szendvics” módszerrel.

3. Immunocytológia

Sejtfelületi receptorok, markerek keresése (B-sejtek stb.). A nyomjelzés történhet fluorescens anyaggal, radioactív izotóppal, enzyimmel (peroxydase).

4. Supravitalis módszerek

Szövet, ill. sejttenyészetek vizsgálata:

Cytotoxicitás,
ADCC (LDA) kimutatás,
Lymphokinek keresése (migratio stb.)
Mitogen-hatás: spec. antigennel és nem-spec. mitogénekkal (PHA stb.)
Rosetta (immunoaderencia) módszerek
Antitest-termeltetés in vitro
T sejt identifikálás (a fentiekkel)

B. In vivo1. *Állatkísérlet*

Passiv cutan anaphylaxia
 Cfu
 Transplantatum rejectio
 G. v. H-reakció
 Antigenitás erősségének vizsgálata
 Immun-reactivitás genetikája, phylo- és ontogenetica

2. *Ember vizsgálatok*

Antigen-eliminatio = allergiás reakció elmaradás (Továbbiak csak ha az in vitro módszerek után is okvetlenül szükséges):
 bőrpróba (óvatosság!)
 egyéb (nagyon kivételesen!!)
 Transferfaktor hatás

*II. Nem-immunológiai módszerek*1. *Cytomorphologia*a) *Vér*: fvs-szám, ly-szám

ly-alak-megoszlás (M.-G.-Giemsa festéssel, pyroninofilia stb.)
 generatios fázis vizsgálata (nyomjelzett DNS, ill. RNS főlvétele, impulsus-cytophotometria)

b) *Csontvelő*:

cytologia (kenet)
 histologia (beágyazás, metszet)

c) *Nyirokesomó* histológia, cytológiad) *Egyéb* (thymus, lép, ált. post mortem)2. *Fehérje-kémia*: antitest-globulinok analysise:

könnyű lánc,
 nehéz lánc
 V-regiók, Fab, Fc (szerkezet, aminosavsequentia stb.)

II.

*Immunológia mint módszer**Immunoassay.*

Az immunoassay lényege, hogy a vizsgálandó anyag önmagában erős és specifikus antigen legyen, vagy valamilyen módon azzá legyen tehető, ellene állatban (ló, kecske, nyúl) nagy titerű spec. antitest legyen termeltethető, mely a serumból jól tisztítva és koncentrálva standard reagensként használható. Ehhez megfelelő állattörzs kiválasztása szükséges. Az AG-AT kötés kimutatására azután különböző eljárások használhatók, melyek közül a legegyszerűbb a precipitáció radialis immunodiffúzióval. A módszer érzékenysége több nagyságrenddel fokozható radioactiv nyomjelzéssel, bár ehhez már megfelelő sugárzást mérő drága és service-igényes műszer kell. Ez azonban azután nagyon sokféle és egyszerre sok meghatározást tud végezni. Persze ehhez még újabb drága beszerzés: automata minta-váltó és eredmény-kiíró gép is kell, ami csak akkor fizetődik ki, ha valóban nagyon nagy a vizsgálatok száma.

Technikailag nehezebb az enzyμες nyomjelzés, de ezután már sokkal egyszerűbb a laboratóriumi módszer: az enzy-mediatoros immunoteszt (EMIT). Ezért újabban ez is terjedőben van.

Minden immunoassaynek van egy közös jellemvonása: az antigen-tulajdonságot és az antitestet kötő hely (haptén) mennyiségét méri, nem pedig az illető anyagra jellemző biológiai aktivitást, vagyis pl. nem a plasma-insulin vagy plasmarenin, vagy digitoxin stb. aktivitást. Ezért időnként meg kell vizsgálnia az előállítónak, hogy az aktivitásával és az antigenítésével meghatározva a bioaktiv anyagot, gyakorlatilag azonos eredményt kapjunk. Az aktivitást mérő biológiai módszerek bonyolultak, többnyire előzetes separálás, concentrálás szükséges, nagyok a hibaforrásaik, nagyok a szórásaik. Az immunoassay methodikailag sokkal, de sokkal egyszerűbb, csak éppen arra kell ügyelni, hogy az antigen-determinans, ill. haptén molekularész mérése jellemezze a bioeffektor rész mennyiségét is. Ha tehát pl. plasma renint mérünk a biológiai módszerrel, az eredményt plasma renin aktivitásban (PRA) kell megadni, de az immunoassayvel, ill. radioimmunoassayvel (RIA) plasmarenin koncentraciót adhatunk csak meg (PRC) és erre a finom, de elvileg lényeges különbségre ügyelni kell.

Módszertanilag az *in vitro* immunoassay, ill. érzékenyebb és pontosabb RIA az ún. saturatio analysisek csoportjába tartozik. Ennek elve a következő: 1. az első fő reagens a spec. antitest, lehetőleg lecentrifugálható hordozó suspensió anyaghoz kötve (szilárd fázis), mert így a praecipitatio quantitativ nehézségei elesnek, 2. ehhez adjuk a biológiai anyagban (serum stb.) levő meghatározandó, tehát ismeretlen mennyiségű oldott antigént, mely empirikusan kisebb mennyiségű, mint amelyet az antitest reagens meg tud kötni, 3. a megmaradt szabad kötési kapacitást „vissza-titráljuk” a másik fő reagenssel: oldott nyomjelzett tiszta spec. antigennel; 4. lecentrifugáljuk a saturált antitest suspensiót, a nyomjelzett antigen-reagens kötött része a precipitátumban, szabadon maradt része a felülúszóban található; 5. a kötött frakció radioaktivitását (beütés-számát) megmérjük, 6. ismert standardokkal készült kalibrációs görbéből visszakeressük a meghatározandó anyag koncentrációját (pl. ng/ml). A reakció „kulcsa” a megfelelő aviditású spec. antitest; tudnunk kell, hogy nem ad-e keresztreakciót a mérendő plasmában, sérumban levő más antigennel is (pl. jelenleg a növekedési hormon elleni antitestek terhes nő vérében a placentalis lactogennel, ami terhes nő vérében a STH meghatározást így közvetlenül a plasmában elő-separálás nélkül lehetetlenné teszi). Fontos a másik reagens: a meghatározandó antigen standardjának a tisztasága, azonos specificitása és kellően kötött nyomjelzettsége. A nyomjelző általában ¹²⁵I. A kötés nem időtálló, ezért ezt a reagenst a föltüntetett lejárati határidőn belül lehet csak használni. Mindezek miatt a reagensek egyelőre nehezen kaphatók, a kényesebb meghatározásokhoz elég drágák és a különböző gyártmányok megbízhatósága eltérő.

Az immunoassay (IA) radioimmunoassay (RIA) olyan sokféle biológiai anyag meghatározására áll rendelkezésre (hormonok, gyógyszerek stb.), hogy fölsorolásukba itt nem bocsátkozhatom. A medicinában számos biológiai aktiv mikromennyiségű anyag (pl. hormon stb.) meghatározást hovatovább rutinszerűen kellene végezni. Nagy baj azonban, hogy a hazai gyógyszer-serum és reagens ipar elaludt és még a hazai kutatók által kidolgozott eljárások reagensait, reagens összeállításait sem gyártja. A külföldi kiték pedig nekünk alig megfizethetők. Ezen a fórumon is hangsúlyozni kell azt a követelést, hogy a hazai ipar sürgősen pótolja a lemaradást és legalább a tömegvizsgálati igényt elégítse ki. Ha előadásom csak kissé is elősegítené ezt a célt, akkor nem ültünk itt hiába. Javasolom, hogy az itt jelenlevő osztályok az elnökségen át intézzenek egy nyílt követelést az illetékes vállalatok állami főhatóságához, hogy ebből a jól jövedelmező vállalkozásból sürgősen elégítsék ki a hazai igényeket.

Befejezés

Sajnálom, hogy az elméletileg és gyakorlatilag egyaránt fontos nagy témakörrel, nemcsak az orvostudományt, hanem egész biológiai szemléletünket megváltoztató immunológiai kutatás módszertanáról (az immunológiának elsősorban immunológiai módszerekkel való kutathatóságáról) és az immunológiai specificitás alapján kifejlesztett immunochemiai módszerekről ennyire vázlatos áttekintésre volt csak idő, hiszen a tudományban minden a módszeren múlik, ez termeli az eredményt és újabb módszereket kell kifejlesztünk, ha előbbre akarunk jutni a természet megismerésében, a jobb diagnosztikában, gyógyításban és megelőzésben.

IRODALOM

- Beregí, E.: Immunohistológiai módszerek. Autoimmun betegségek (szerk. Petrányi Gyula) Akadémiai Kiadó, Budapest, 407. o. (1974).
- Bobory J.: Humoralis reakciók, 335. o. és Cellularis immunreactivitas vizsgálata, 387. o. Autoimmun betegségek (szerk. Petrányi Gyula) Akadémiai Kiadó, Budapest, 407. o. (1974).
- Huber, H., Pastner, D., és Gabl, F.: Laboratoriumsdiagnose hämatologischer und immunologischer Erkrankungen, Springer, Berlin, (1972).
- Locsár, L., és Merétey, K.: Radioimmune reactions in vitro. Radioimmunoassay, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases, ed. E. Rajka and S. Korossy, Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 2. p. 439. (1974).
- Láng, H., Rick, W. és Róka L.: Anwendung immunologischer Methoden. Springer, Berlin, (1975).
- Nowotny, A.: Basic Exercises in Immunochemistry. A laboratory manual. Springer, Berlin, (1969).
- Petrányi, Gy.: The LE cell phenomenon, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases, ed. E. Rajka és S. Korossy, Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 3. p. 27. (1975).
- Petrányi, G. Gy.: Biological Tests of Histocompatibility, in: Immunological Aspects of Allergy and Allergic Diseases (Ed. E. Rajka és S. Korossy) Akadémiai Kiadó, Budapest, Vol. 2. p. 671. (1974).
- Rose N. R. és Bigazzi, P. E. Methods in Immunodiagnosis, John Wiley Sons, New York, (1973).