

С. А. ФИЛИНА

## О МЕХАНИЗМЕ РЕАКЦИИ С КРАСИТЕЛЕМ СЭБИН—ФЕЛЬДМАНА

Реакция с красителем предложена Сэбином и Фельдманом для диагностики токсоплазмоза в 1948 г. [9]. Сущность этой реакции заключается в том, что токсоплазмы при воздействии на них сыворотки человека или животных, содержащей антитела, утрачивают способность окрашиваться метиленовой синькой.

Для выполнения реакции Сэбин—Фельдмана требуются живые токсоплазмы, неспецифический термолабильный добавочный фактор или активатор, затем щелочной раствор метиленовой синьки и испытуемая сыворотка.

Живые токсоплазмы поддерживаются на мышах путем внутрибрюшинных перевивок.

В реакции применяется перитонеальный экссудат, полученный от мышей на 3—4-й день после заражения, содержащий живые неизмененные паразиты. Позднее в организме мышей накапливаются антитела, под воздействием которых токсоплазмы могут измениться, из-за чего результаты реакции могут быть неправильными.

В качестве добавочного фактора или активатора в реакции используется свежая сыворотка донора, активность которой предварительно определяется по окраске токсоплазм метиленовой синькой. Для этого в пробирке смешивается 1 часть физиологического раствора, 2 части свежей сыворотки человека и 1 часть перитонеального экссудата (живые токсоплазмы), смесь подогревается 1 ч. на водяной бане при 37°, затем добавляются 2 части щелочного раствора метиленовой синьки. После тщательного смешивания одна капля помещается на предметное стекло и, прикрыв покровным, под микроскопом подсчитывается количество окрашенных и неокрашенных паразитов. Активность сыворотки считается пригодной для реакции, когда окрашиваются 90 токсоплазм из 100. Перед постановкой опыта она смешивается с перитонеальным экссудатом мыши в отношении 5:1, встряхивается в течение 7 мин. и в таком виде применяется в реакции не позже 1 ч. после приготовления. Щелочной раствор метиленовой синьки готовится перед употреблением из 2 заранее приготовленных растворов: насыщенного спиртового раствора метиленовой синьки и буферного раствора двууглекислой соды и буры (рН=10,8) в отношении 1:9.

Методика реакции: испытуемые сыворотки исследуются в инактивированном состоянии после прогревания их на водяной бане при 56° в течение 30 мин., т. е. лишенные комплемента. Они разводятся физиологическим раствором поваренной соли 1:2, 1:4, 1:8 и т. д., разливаются по 0,1 мл в ряд пробирок, куда прибавляется 0,3 мл взвеси живых

токсоплазм (перитонеальный экссудат зараженных мышей) в активаторе—в свежей активной донорской сыворотке, в соотношении 1 : 5.

Пробирки встряхивают и ставят в водную баню при 37° на один час. Затем в каждую пробирку прибавляется по 0,2 мл раствора метиленовой синьки. Пробирки снова встряхивают, затем берут из каждой пробирки одну каплю содержимого, помещают на предметное стекло, прикрывают покровным и под микроскопом подсчитывают количество окрашенных и неокрашенных паразитов.

Реакция Сэбин—Фельдмана считается положительной, т. е. испытуемая сыворотка содержит специфические антитела, если больше 50% токсоплазм остаются неокрашенными. Диагностический титр должен быть не ниже 1 : 64.

При отрицательной реакции 90 или 100% паразитов окрашиваются в синий цвет, что указывает на отсутствие в исследуемой сыворотке специфических антител против токсоплазм.

Почему же токсоплазмы в присутствии антитела теряют способность окрашиваться метиленовой синькой?

Одни исследователи усматривают причину этого явления в гибели паразитов, другие—пытаются объяснить потерю способности паразитов окрашиваться нарушением проницаемости их оболочек под воздействием антител.

Высказывается также предположение, что токсоплазмы не могут окрашиваться в присутствии специфических антител вследствие растворения или исчезновения из них рибонуклеиновой кислоты [6, 7].

Последней теории придерживаются Д. Н. Засухин, С. Г. Васина, Е. А. Шевкунова и Л. И. Грачева [2, 3].

Из описания методики реакции Сэбин—Фельдмана и предложенных теорий для объяснения механизма ее становится очевидным, что под действием специфического амбоцептора, содержащегося в сыворотке больного токсоплазмозом человека и комплемента (активатора) происходит разрушение токсоплазм. Вначале, по-видимому, нарушается проницаемость оболочки, в результате чего, содержимое паразита, воспринимающее краску, в том числе и рибонуклеиновая кислота, выходят из него. Сохранившаяся оболочка не окрашивается метиленовой синькой, остается бесцветной и незаметной. Как видно, для объяснения механизма реакции с красителем действительны все теории одновременно.

Наличие специфических антител в сыворотке крови больных токсоплазмозом признается всеми исследователями единогласно. Бесспорным также является факт разрушения комплемента в такой сыворотке путем прогревания ее перед исследованием на водяной бане при 56° в течение 30 мин., после чего в ней сохраняется только специфический амбоцептор против токсоплазм. Не может вызывать сомнения и то, что неспецифический термолабильный добавочный фактор, который находится в свежих сыворотках человека и прибавляется к живым токсоплазмам (перитонеальный экссудат) в качестве активатора, представляет собой нечто иное, как комплемент.

В реакции Сэбин—Фельдмана с предельной ясностью показано, что для лизиса паразитов необходимо наличие двух компонентов: специфического амбоцептора и неспецифического компонента—активатора.

Комплемент сам по себе не действует на токсоплазмы, так как при смешивании живых паразитов, содержащихся в перитонеальном экссудате мышей на 3—4-й день после их заражения, с свежей активной в комплементарном отношении сывороткой донора, токсоплазмы не изменяются и хорошо воспринимают метиленовую синьку даже через час после выдерживания смеси в термостате. Об этом свидетельствуют и отрицательные результаты, получаемые от реакции с красителем, с сыворотками, не содержащими специфических антител—неизмененные токсоплазмы окрашиваются метиленовой синькой.

В присутствии специфического амбоцептора, который содержится в сыворотке больных токсоплазмозом, комплемент воздействует на паразитов, нарушает проницаемость их оболочки, через которую выходит цитоплазма, окрашивающаяся метиленовой синькой. Остающаяся оболочка не воспринимает краску, остается бесцветной, невидимой.

Подтверждением выдвинутой гипотезы могут служить результаты, полученные академиком Н. Ф. Гамалея, от воздействия различных биологических факторов на бактерии. По его мнению, происходит один и тот же процесс: нарушение целостности оболочки бактерий, вызывающее выхождение содержимого, которое обычно красится анилиновыми красками. Строма бактерий хотя и сохраняется, но она ничем не красится, оставаясь бесцветной и совершенно невидимой. То же самое явление наблюдается, по мнению Гамалея, и при гемолизе, т. е. растворении красных кровяных телец: под влиянием специфического амбоцептора и комплемента нарушается проницаемость оболочки, и из эритроцита выходит гемоглобин, оставляя пустую строму [1].

Аналогичные изменения отмечают Н. И. Ходукин и М. С. Софиев [4, 5] у лейшманий под влиянием антител.

Такой же процесс разрушения наблюдали Лурна, Андерсон и Дельбрюк [8] под электронным микроскопом у стафилококков под влиянием бактериофага. Вначале частички фага абсорбировались оболочкой бактерий. Через 15 мин. воздействия оболочки становились проницаемыми и начинала вытекать протоплазма. В дальнейшем от бактерий оставались только тени клеток с отверстиями в клеточной оболочке.

Выдвинутая для объяснения механизма реакции Сэбин—Фельдмана гипотеза вполне согласуется с понятием о биологическом лизисе и не противоречит отдельным теоретическим предпосылкам других исследователей.

Реакция с красителем «капризна», она требует точного выполнения указанной методики, но если все ингредиенты, входящие в эту реакцию, проверены (особенно активатор), то реакция дает надежные результаты [3].

Приведенная характеристика реакции также не расходится с гипотезой, так как без активатора или комплемента один амбоцептор не

может вызвать изменений в токсоплазмах, не может нарушить их восприимчивость к окрашиванию.

Имея в виду вышензложенное, желательно испытать в реакции Сэбин—Фельдмана в качестве активатора вместо человеческой—сыворотку морской свинки, обладающую высокой комплементарной активностью.

Необходимо приготовить антиген (фиксированные токсоплазмы) более длительного срока действия (наподобие диагностикумов), что даст возможность внедрить в повседневную лабораторную практику ценную для диагностики токсоплазмоза высокочувствительную реакцию с красителем.

Научно-исследовательский институт  
гематологии и переливания крови

Поступило 25.1 1963 г.

Ս. Ա. ՖԻԼԻՆԱ

ՍԵՔԻՆ—ՖԵԼԴՄԱՆԻ ՌԵՍՍՈՒԿՅԱՅԻ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու լ մ

Տորսոպլազմայի դիագնոստիկայի համար առաջարկված է Սեքին—Ֆելդմանի ռեակցիան: Այդ ռեակցիայի էությունն այն է, որ տորսոպլազմաները նրանց վրա մարդու կամ կենդանու շիճուկով ազդելիս, որը պարունակում է հակամարմիններ, կորցնում են մեթիլեն կապույտով ներկվելու իրենց ընդունակությունը:

Սեքին—Ֆելդմանի ռեակցիայի մեթոդիկայի նկարագրությունից և նրա մեխանիզմի բացատրության համար առաջարկված թեորիաներից սլարզ է դառնում, որ սպեցիֆիկ ամբոցեպտորը, որը պարունակվում է տորսոպլազմոզով հիվանդ մարդու շիճուկում և կոմպլեմենտի (ակտիվատորի) ազդեցության տակ կատարվում է տորսոպլազմայի քայքայում:

Սկզբից, ըստ երևույթին, խախտվում է թաղանթի թափանցիկությունը, որի հետևանքով պարազիտի պարունակությունը, որը ընդունում է ներկը, այդ թվում նաև ռիբոնուկլեինաթթուն, դուրս է գալիս նրանից: Պահպանված թաղանթը չի ներկվում մեթիլեն կապույտով, մնում է անպույն և աննշմար: Այնպես, որ ներկերի հետ ռեակցիայի մեխանիզմի բացատրության համար բոլոր տեսությունները միաժամանակ ճիշտ են:

Տորսոպլազմոզով հիվանդների շիճուկում սպեցիֆիկ հակամարմինների առկայությունն ընդունվում է բոլոր հետազոտողների կողմից:

Նկատի ունենալով վերը նշվածը, պանկայի է Սեքին—Ֆելդմանի ռեակցիայում, մարդկային շիճուկի փոխարեն որպես ակտիվատոր փորձել ծովախոյուկի շիճուկը, որն ունի բարձր կոմպլեմենտար ակտիվություն:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гамалея Н. Ф. ЖМЭИ, 8, 3—6, 1955.
2. Засухин Д. Н. Акуш. и гинекология, 1, 60—64, 1956.
3. Засухин Д. Н., Васина С. Г., Шевкунова Е. А. и Грачева Л. И. Медгиз, 99—118, 1962.
4. Ходукин Н. И. Успехи совр. биологии, вып. 1 (4), т. 26, 559—614, 1948.
5. Ходукин Н. И. и Софиев М. С. Мед. мысль Узбекистана, 1, 5—19, 1929.
6. Брингмен, Хольц Цитированы по Засухину Д. Н.
7. Kulasiri C., Dasgupta B. J. Parasit., 49,3—4. 586—593, 1959.
8. Luria S. E., Delbrüsv. M. J., Bacter., 46, 57—77, 1943.
9. Sabin A., Feldman H. Pediatric, 660—664, 1949.