

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет технології виробництва і переробки
продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології**

**Кафедра генетики,
годувлі тварин та біотехнології**

ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

**щодо виконання лабораторно-практичних робіт з
дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «Магістр»
спеціальності 162 - «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання**

**Миколаїв
2020**

УДК 577.27

I - 55

Методична розробка для занять з дисципліни „Імунобіотехнологія” студентам денної форми навчання освітньої спеціальності 162 – «Біотехнології та біотінженерія» СВО «Магістр» підготовлено: професором, доктором біологічних наук, академіком Нью-Йоркської АН США Горбатенком І.Ю., професором, доктором с.-г. наук, академіком НАН ВО України Гиль М.І., доцентом, кандидатом с.-г. наук Галушко І.А., магістром Кугут Н.С.

Рекомендовано для студентів факультету ТВППТСБ.

Рекомендовано науково-методичною комісією факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету, протокол №5 від “24” грудня 2020 р.

Укладачі: Горбатенко Ігор Юрійович, Гиль Михайло Іванович, Галушко Ірина Анатоліївна, Кугут Наталія Сергіївна

Рецензенти: завідувач кафедри екології та природоохоронних технологій, докт. техн. наук, канд. біол. наук, професор Національного університету кораблебудування імені адмірала Макарова Трохименко Г.Г.;

завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського НАУ, кандидат біол. наук, доцент Кот С.П.

Відповідальний за випуск: завідувач кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, доцент, доктор с.-г. наук Луговий С.І.

Редактор

© Миколаївський національний аграрний університет, 2020

ЗМІСТ

Вступ		4
1. Лабораторна робота №1	Історія розвитку уявлень про імунітет, та основні поняття	5
2. Лабораторна робота №2	Значення вродженого імунітету в захисті організму від патогенів	8
3. Лабораторна робота №3	Структура і функції системи набутого імунітету	11
4. Лабораторна робота № 4	Процеси імунної відповіді	16
5. Лабораторна робота №5	Механізми регуляції імунної відповіді	20
6. Лабораторна робота № 6	Основи протибактеріального та противірусного імунітетів	25
7. Лабораторна робота №7	Основи протигрибкового імунітету	31
8. Лабораторна робота № 8	Лабораторні методи оцінки імунного статусу	35
9. Лабораторна робота № 9	Визначення, класифікація і клінічні прояви дисфункції імунної системи	40
10.Лабораторна робота № 10	Визначення поняття алергія, класифікація і стадії алергічних реакцій	45
11.Лабораторна робота № 11	Імунологія пухлин	50
12.Лабораторна робота №12	Імунодіагностика пухлин	55
Література		60

ВСТУП

У всьому світі вчення про імунітет займає одне з центральних місць у підготовці спеціалістів, що мають справу з живими організмами. Це пов'язано з тим, що імунна система, що стоїть на сторожі антигенного гомеостазу, є однією з важливіших систем адаптації організму. Відомо, що імунні розлади закономірно призводять до погіршення перебігу гострого процесу, генералізації, хронізації та рецидивів різноманітних захворювань, що в свою чергу є причиною ряду патологічних станів. Неприятлива екологічна обстановка, стреси, порушення харчування, деякі лікарські препарати, оперативні втручання і багато інших чинників знижують реактивність організму і його опірність інфекційним агентам.

В даний час розроблені доступні методи діагностики імунодефіцитних і імунopatологічних станів. Існують досить ефективні способи їх корекції та імунореабілітації. Сьогодні не можна визнати лікування кваліфікованим без урахування імунного статусу хворого, в зв'язку з чим необхідний певний рівень підготовки спеціалістів в області імунології.

З метою підготовки фахівців що відповідають сучасному рівню науки, викладання предмету імунобіотехнології в обґрунтовано наступними досягненнями в галузі прикладної імунології:

- напрацюванням великої кількості імунних тестів і методів імунологічного обстеження, що сприяють кращій і ранній діагностиці;
- розширенням знань про роль імунних механізмів в розвитку захворювань і можливості впливу на систему імунітету, що значно змінюється протягом цих захворювань;
- швидким збільшенням рівня виявлення хворих з імунодефіцитними захворюваннями (ІДЗ) різного генезу; • виявленням захворювань, пов'язаних з імунними порушеннями на ранніх етапах становлення імунної системи для своєчасної імунокорекції, імунореабілітації;
- активним розвитком імунореабілітації і появою нових методів, заснованих на сучасних уявленнях про функціонування імунної системи.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1

Тема: Історія розвитку уявлень про імунітет, та основні поняття

Трансформація уявлень про імунітет в історичному аспекті

Термін **імунітет** (*immunis*) використовували ще до нашої ери. Так, в Древньому Римі під імунітетом розуміли звільнення від сплати податків і виконання повинностей. Перші експериментальні підтвердження захисних механізмів проти інфекції отримав англійський лікар Е. Дженнер, який провів успішну вакцинацію проти натуральної віспи. Надалі Луї Пастер обґрунтував теорію вакцинації проти інфекційних хвороб. З того часу під імунітетом стали розуміти несприйнятливість до інфекційних агентів - бактеріям і вірусам. Поняття про імунітет істотно розширилися завдяки працям Н.Ф. Гамалії - виявилось, що в організмі існують захисні механізми проти пухлин і генетично чужорідних клітин, фундаментальним стало відкриття І.І. Мечниковим явища фагоцитозу. Він же вперше довів можливість відторгнення організмом власних старих або пошкоджених клітин. Відкриття фагоцитозу було першим поясненням механізму знищення патогенів імунними факторами. Майже одночасно з відкриттям клітинних механізмів П. Ерліхом були відкриті гуморальні фактори імунітета, що отримали назву антитіла. Початок клінічної імунології пов'язане з ім'ям О. Брутона, який описав клінічний випадок спадкової агаммаглобулінемії. Це було перше підтвердження того, що дефіцит імунних факторів може призводити до розвитку хвороб людини. Узагальнивши накопичені дані, Ф. Бернет в середині ХХ ст. обґрунтував уявлення про імунітет як про систему, що здійснює контроль за сталістю генетичного складу організму. Однак відповідно до сучасних уявлень імунітет працює не на рівні генотипу, а з фенотиповими проявами спадкової інформації, Ф. Бернет запропонував клонально-селекційну теорію імунітету, відповідно до якої на певний антиген в імунній системі відбувається селекція (відбір) специфічного лімфоцита. Останній шляхом розмноження створює клон іммуноцитів (популяцію ідентичних клітин). Одне з найбільш чітких і лаконічних визначень імунітету належить Р.В. Петрову. **Імунітет - це спосіб захисту від живих тіл і речовин, що несуть в собі ознаки генетичної чужеродності.**

Сьогодні під антигенами розуміють речовини або ті форми речовин, які при введенні у внутрішнє середовище організму здатні індукувати на себе імунну відповідь у вигляді продукції специфічних антитіл і / або імунних Т-лімфоцитів (Р.М. Хаїтов). Патогенами прийнято називати цілісні об'єкти (бактеріальна клітина, вірус, частка пилу і т.д.), які при потраплянні в організм призводять до патологічних змін в ньому. Зазвичай патоген містить безліч антигенів. Термін **антиген** (анти - проти, ген - дискретна одиниця спадковості) розшифровується як щось, структура чого суперечить спадковій інформації організму-господаря. Така назва є не зовсім коректною, оскільки власні структури макроорганізму також можуть мати антигенні властивості. Їх прийнято називати **аутоантигенами**. Правильніше вважати, що антиген -

це субстанція, здатна зв'язати антигенрозрізняльні рецептори імунокомпетентних клітин, тобто антигенність визначається не стільки внутрішніми властивостями самого антигену, скільки можливостями розпізнавання його (ідентифікації як антигену) клітинами імунної системи організму-господаря. Тому більш коректним є термін **іммуноген**, що позначає, що при попаданні в макроорганізм дана речовина здатна викликати на себе імунну відповідь. Зокрема, імунна система забезпечує синтез спеціальних глікопротеїнів (антитіл), здатних специфічно зв'язувати певні іммуногени.

По хімічній структурі антигени (іммуногени) можуть бути білками, глікопротеїнами, ліпопротеїнами, полісахаридами і фосфоліпіди. Головна умова - достатня молекулярна маса, завдяки якій антигени є макромолекулами. В іншому випадку імунна система навіть не «перевіряє» наявність антигенних властивостей у чужорідній субстанції. Справа в тому, що для активації лімфоцитів потрібно попереднє розгортання так званих доімунних реакцій, до яких належать **фагоцитуючі клітини**. Останні здійснюють захоплення цілісних об'єктів або макромолекул і перетворюють їх з корпускулярної (корпускула - частка) в молекулярну форму, доступну для розпізнавання імунокомпетентними клетками.

Процес взаємодії антигену з імунною системою називається **імунізація**. В алергології аналогічне явище називають **сенсibiliзацією**. Для того щоб відбулася імунізація, що надійшли антигени повинні зв'язатися з антигенрозпізнавальними рецепторами лімфоцитів. Інші клітини організму не містять таких рецепторів, тому не можуть забезпечити розвиток специфічної імунної відповіді. У зв'язку з цим саме лімфоцити називають імунокомпетентними клітинами. Рецептор лімфоцитів не розпізнає весь антиген, а здатний безпосередньо взаємодіяти лише з його окремим фрагментом, названим епітопом (для В-лімфоцитів) або імуногенним пептидом (для Т-лімфоцитів). Раніше вважали, що кожен антигенрозпізнавальний рецептор здатний взаємодіяти лише з однією антигенною детермінантою специфічної структурию. Саме з цією властивістю пов'язували специфічність імунної відповіді. Згідно з останніми даними кожен рецептор може взаємодіяти з декількома антигенними детермінантами (епітопами), що володіють певними структурними відмінностями. У той же час принцип специфічності імунної розпізнавання не втратив свого сенсу. Справа в тому, що має значення не сам факт зв'язування епітопа, а сила взаємодії рецептора і антигенної детермінанти, що визначається комплементарністю між цими молекулами.

Слід відмітити, що один і той же антиген може індукувати імунну відповідь різної сили в залежності від умов його проникнення в макроорганізм. Так, існують речовини, що підвищують ефективність розпізнавання антигенів імунною системою. Вони називаються **ад'ювантами**. Одночасне надходження антигенів з ад'ювантами істотно підвищує силу імунної відповіді на антигени. Цей феномен широко

використовують в дослідних і лікувальних цілях. Ад'юванти можуть бути природними і штучними. Наприклад, природними ад'ювантами можна вважати **доїмунні цитокіни** (медіатори імунних реакцій), синтезовані різними клітинами в вогнищі ураження і залучають лімфоцити в процес розпізнавання надійшовших антигенів. Класичним штучним ад'ювантом є **ад'ювант Фрейнда**, що представляє собою суміш вазелінових масел з інактивованими мікобактеріями туберкулеза.

В той же час багато мікроорганізмів містять антигенні субстанції, які порушують механізм специфічного розпізнавання, тим самим знижуючи ефективність імунних реакцій. Вони були названі **суперантигеном**. Суперантигени пов'язують ділянки антигенних рецепторів, які не відповідають за специфічність розпізнавання (а значить, є однаковими у лімфоцитів різних клонів). Зазначена властивість забезпечує поліклональну активацію імунокомпетентних клітин, що призводить до недостатньо прицільної імунної відповіді. Класичним прикладом суперантигена є - **протеїн М** стрептококів. Наявність суперантигенів являється захисним механізмом патогенних мікроорганізмів і істотно підвищує їхню здатність до виживання в умовах імунної агресії.

Таким чином, можна зробити наступні висновки:

1. Для реалізації імунної відповіді антиген (іммуноген) повинен бути генетично чужорідним.
2. Для того щоб імунна система відреагувала на генетичну чужорідність антигену, він повинен бути макромолекулою або принаймні утворити високомолекулярний комплекс з елементами власних тканин макроорганізма.
3. Для коректного розпізнавання антиген повинен перебувати в молекулярній формі, тобто патоген попередньо перетвориться з корпускулярної форми в молекулярну. Це має на увазі наявність доїмунних захисних механізмів, що підготовляють антиген для розпізнавання лімфоцитами.
4. Антигени не підлягають дії природного відбору і є випадковими.
5. Так як антигени - випадкові з'єднання, можна отримати антитіла до чого завгодно і використовувати їх як специфічні реагенти, здатні зв'язати що завгодно.
6. Імунітет не контролює власне генетичний гомеостаз організму, оскільки геном як такий не є об'єктом для дії імунітету. Імунна система за своєю природою розпізнає субстанції, що є фенотиповим проявом генотипу.

Питання для самоконтролю:

1. Що таке «імунітет»?
2. Яка роль фагоцитуючих клітин в імунній відповіді?
3. Що таке «ад'юванти», які вони бувають та яка їх роль?
4. Навіщо організму потрібні «суперантигени»?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

Тема: Значення вродженого імунітету в захисті організму від патогенів

Стратегія і тактика розпізнавання патогенів факторами вродженого імунітету

Імунна система традиційно поділяється на вроджений і набутий компоненти, кожен з яких виконує специфічну функцію і роль. Однак власне імунними сьогодні прийнято називати тільки ті процеси, які реалізуються за безпосередньої участі імунокомпетентних клітин (так званий набутий імунітет). Набутий імунітет пов'язаний з двома класами спеціалізованих клітин - Т- і В-лімфоцитів. Т-клітини розвиваються в тимусі, в зв'язку з чим і отримали свою назву. В-лімфоцити є тимуснезалежні, оскільки утворюються в червоному кістковому мозку. Назва цих імунокомпетентних клітин походить від сумки, або бурси Фабріціуса (*bursa Fabricii*) птахів, де відбуваються активні В-клітинні реакції.

Кожен лімфоцит містить тільки один структурно унікальний рецептор до певного антигену, а репертуар антигенних рецепторів на всіх лімфоцитах надзвичайно великий і різноманітний. Обсяг і різноманітність такого репертуару збільшує ймовірність зустрічі специфічного лімфоцита з тим антигеном, який може вибірково зв'язатися з його рецептором, запускаючи тим самим активацію і проліферацію цієї клітини. Даний процес, названий **клональний відбором лімфоцитів**, пояснює більшість основних властивостей імунної системи.

Ефекторні механізми вродженого захисту, які включають антимікробні пептиди, фагоцити, альтернативний шлях активації комплементу, після моменту інфікування моментально активуються і швидко пригнічують розмноження інфекційного агента. Завдяки таким процесам здійснюється стримування розвитку інфекції до того часу, коли дозріють відповідні лімфоцити. Це і є головною функцією вродженого імунітету. Однак накопичуються дані про те, що вроджені механізми резистентності більш специфічні, ніж вважалось раніше, і грають істотну роль в імунному захисті.

Порівняльна характеристика стратегій розпізнавання антигенів факторами вродженого і набутого імунітету. Головна відмінність між компонентами вродженої резистентності і імунокомпетентними клітинами полягає в механізмах і рецепторах, які використовуються для розпізнавання антигена. Гени антигенраспізнаючих рецепторів Т-і В-лімфоцитів генеруються на протязі розвитку організму. Так як ці гени не достались у спадщину, а випадково сформовані самим організмом, вони не призначені для розпізнавання будь-яких конкретних антигенів. Лімфоцити, відбираються при клональній селекції пізніше, після зустрічі з відповідними антигенами. На жаль, такі рецептори не успадковуються, хоча вони могли б дати певні переваги нащадкам. Незалежно від того, наскільки корисними могли б бути

ті чи інші рецептори, останні повинні бути повторно «винайдені» кожним наступним поколінням. Так як специфічні місця рецепторів, безпосередньо взаємодіють з антигеном, утворюються в результаті випадкових генетичних механізмів, репертуар рецепторів такий, що вони можуть реагувати не тільки на патогенні мікроорганізми, а й безпечні екзогенні та власні антигени. У цих випадках активація імунної відповіді може завдати шкоди організму, оскільки імунні реакції до подібних антигенів приведуть до розвитку алергічних або аутоімунних хвороб.

Вроджені механізми резистентності, ґрунтуючись на спадковому матеріалі, не в змозі розпізнати кожен можливий антиген, а, швидше за все, зосереджуються на деяких найбільш поширених (типових, шаблонних) структурах, представлених серед більшості мікроорганізмів. Такі структури називаються **патогенними молекулярними шаблонами**, а рецептори до них – **шаблонні рецептори**. Найбільш типовими прикладами таких шаблонів є наступні структури: бактеріальні ліпополісахариди, пептидоглікани, ліпотьохоева кислота, маннани, бактеріальна ДНК, двухспіральної вірусної РНК і гліюкани.

Шаблонрозпізнавальні рецептори. Шаблонрозпізнавальні рецептори утворюються на так званих професійних антиген клітинах, до яких відносяться дендритні клітини, макрофаги і В-лімфоцити. При цьому експресія таких рецепторів не є клональної. Це означає, що всі рецепторні молекули одного типу мають ідентичні властивості.

Функціонально рецептори шаблонного розпізнавання розділені на три класи: **секреторні, клітинні та сигнальні**. Секреторні шаблонрозпізнавальні рецептори функціонують як опсоніни зв'язуючись з мікробними шаблонами і позначаючи їх для подальшого розпізнавання системою комплементу або фагоцитами. Слід зазначити, що **опсонінами** називають своєрідні біологічні «мітки», які, фіксуєючи на різних об'єктах, полегшують їх розпізнавання факторами вродженої резистентності. Найбільш відомий секреторний рецептор шаблонного розпізнавання - маннозозв'язуючий лектин (лектин - це білок, здатний зв'язувати вуглеводи), який синтезується в печінці і циркулює в плазмі крові в пошуку патогенів.

Клітинні шаблонрозпізнавальні рецептори знаходяться на поверхні фагоцитів. Якщо такі рецептори розпізнають патогенний молекулярний шаблон на мікробній клітці, то вони ініціюють захоплення фагоцитом носія такої шаблонної молекули з формуванням специфічної ендодітарної вакуолі - **фагосоми**. В подальшому фагосома зливається з лизосомою з утворенням фаголізосоми, де і відбувається деструкція патогена.

Сигнальні шаблонрозпізнавальні рецептори при взаємодії з шаблонами активують внутрішньоклітинні молекулярні каскади, що стимулюють експресію багатьох генів імунної відповіді, що кодуєють структуру прозапальних субстанцій. До цієї групи належать toll-like-рецептори (TLR). Розшифровано сигнальний шлях, підготовлений до запуску такими рецепторами при розпізнаванні мікробних ліпополісахаридів (рис. 1).

Сьогодні відомо 11 різновидів TLR антигенпрезентуючих клітин, здатних розпізнавати шаблонні структури мікроорганізмів, найпростіших і навіть власного організму.

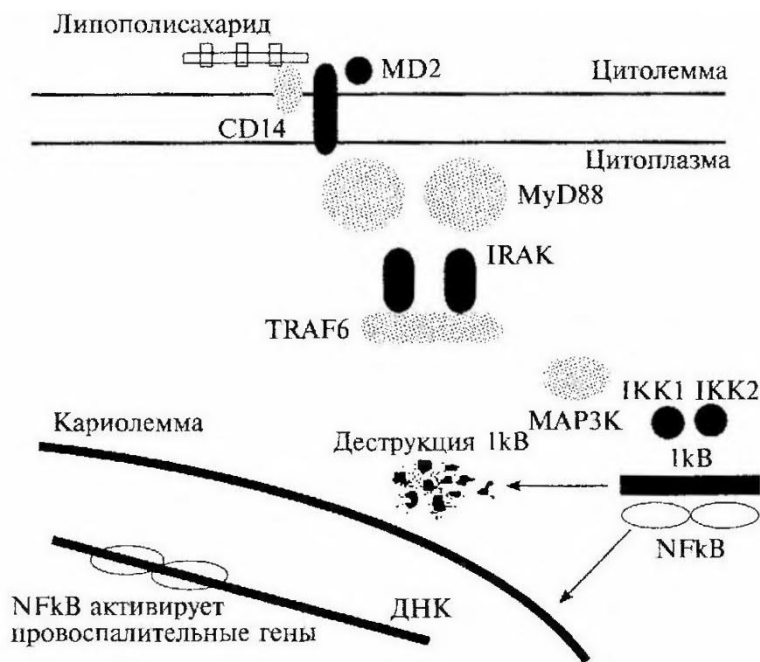


Рис. 1. MyD88-залежний цитоплазматический молекулярний каскад, ініційований активацією toll-like-рецептора при розпізнаванні бактеріального ліпополісахаріда

Бактеріальний ліпополісахарид взаємодіє з плазмовим білком, що має назву ліпополісахаридзакрепляючим. Саме він передає виявлений ліпополісахарид CD14 рецептору антиген представлених клітин. Для того щоб повноцінно відреагував toll-like-рецептора, необхідно також приєднання білка MD2. Таким чином, комплекс розпізнавання ліпополісахаріда має принаймні три компонента - CD 14, власне TLR і MD2. При активації TLR відбувається залучення в каскад білка-адаптера MyD88, що працює з внутрішньої сторони цитолемми. При цьому активується цитоплазматичний молекулярний каскад, що призводить до звільнення **нуклеарного фактора κВ**. Останній мігрує в ядро, є білком, що адаптує різні TLR до запалення.

Однако слід зауважити, що фагоцити можуть захоплювати і презентувати компоненти власних тканин (при руйнуванні старих клітин, при запальних реакціях), що не виключає можливості аутоімунних реакцій. Для повноцінної активації Т-лімфоцити необхідно додаткова взаємодія його молекули CD28 з молекулами CD80 (або CD86) антигенових клітини. Така взаємодія називається **костимулюючою**.

Питання для самоконтролю:

1. Яка різниця між факторами вродженого і набутого імунітету?
2. Як поділяють шаблонрозпізнавальні рецептори? Що означає кожен з них?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

Тема: Структура і функції системи набутого імунітету

Імунна система - це сукупність лімфоїдних органів, тканин і клітин, що забезпечують біохімічну, структурну і функціональну індивідуальність організму шляхом елімінації з нього носіїв чужорідної генетичної інформації (П.Ф. Литвицький, 1992) .

Основна функція імунної системи - здійснення імунної відповіді, тобто захисту організму від ендо- та екзогенних речовин, що мають ознаки чужорідної генетичної інформації. Виділяють центральні та периферичні органи імунної системи. **Центральними органами** є тимус і червоний кістковий мозок, а **периферійними** - селезінка, лімфатичні вузли, лімфоїдна тканина кишечника (Пейерових бляшки, солітарні фолікули, апендикс). У центральних органах зароджуються і розвиваються клітини імунної системи, а в периферичних вони функціонують, тобто специфічно розпізнають різноманітні антигени. Таким чином, в центральних імунних органах відбувається антигеннезалежний етап дозрівання імуннокомпетентних клітин, а в периферичній – антигензавісний

Поняття про імунокомпетентні клітини

Носіями імунної функції є імунокомпетентні клітини (лімфоцити), в залежності від місця дозрівання розрізняють тимус-залежні (Т-лімфоцити) і тимус-незалежні (В-лімфоцити) клітини. Принциповою особливістю імунокомпетентних клітин є наявність на їх поверхні спеціальних рецепторів для розпізнавання антигенів. Так, Т-лімфоцити містять Т-клітинні антигенрозпізнаючі рецептори (ТАГ-РР), а В-лімфоцити - імуноглобулінові рецептори (мономери IgM). Від кількості молекул, які зв'яжуться з антигеном, залежить інтенсивність активаційного сигналу, що надходить в цитоплазму В-лімфоцити. Через 5-10 діб з однієї активно проліферируючої В-клітини утворюється до 1 мільйону клітин з імуноглобуліновими рецепторами з ідентичною специфічністю. Паралельно утворюється клон антигенспецифічних Т-лімфоцитів. Таким чином, за своєю природою імунна відповідь є специфічною і клональною.

Етапи дозрівання імунокомпетентних клітин

Стовбурові клітини червоного кісткового мозку є попередниками всіх клітин крові, в тому числі - клітин імунної системи. Під впливом цитокінів вона здатна або мігрувати в тимус, де перетворюється в Т-лімфоїт, або залишатися в кістковому мозку, де трансформується в В-лімфоцит. Таким чином, напрямок диференціювання стовбурових клітин визначається її специфічним мікрооточенням.

I етап - дозрівання імунокомпетентних клітин називається **етапом ранніх попередників**. На стовбурових клітинах з'являються рецептори, що визначаються не тільки характер міграції клітини, але і процеси її проліферації. Якщо на стовбуровій клітині з'являється **L-ланцюг** (сурогатна ланцюг імуноглобуліну), клітина диференціюється в В-лімфоцит, а якщо

глікопротеїн з молекулярною масою 33 кДальтон (ДП 33 кД), вона стає раннім попередником Т-лімфоцитів. При появі таких поверхневих рецепторів запускається процес інтенсивної проліферації попередників лімфоцитів, в зв'язку з чим протягом тижня їх кількість збільшується більш ніж в 100 раз.

II етап - дозрівання імунокомпетентних клітин називається **етапом зрілих попередників**. На цій стадії на попередниках В-лімфоцитів виникає IgM у вигляді мономера, а на попередниках Т-лімфоцитів - Т-клітинний антигенрозпізнаючий рецептор (ТАТРР). На етапі зрілих попередників формуються лімфоцити, кожен з яких містить рецептор тільки однієї специфічності (до одного конкретного антигену). Важливо відмітити, що специфічні Т-і В-лімфоцити утворюються в організмі апіорі але, ще до зустрічі зі «своїм» антигеном.

III етап - селекція (відбір) Т- і В-лімфоцитів, які не здатні реагувати з власними антигенами. На цьому етапі відбувається усунення від можливої імунної відповіді аутореактивних лімфоцитів, тобто формування **імунної толерантності**. Процес формування імунної толерантності в свою чергу складається з двох етапів: 1. Формування імунної толерантності в центральних органах імунної системи шляхом делеції - руйнування аутореактивних Т- і В-лімфоцитів за механізмом апоптозу (запрограмованої загибелі клітини) . 2.Формування імунної толерантності в периферичних органах шляхом індукції анергії - переведення аутореактивних Т- і В-лімфоцитів в довічний стан спокою (функціональної бездіяльності) .

IV етап дозрівання імунокомпетентних клітин полягає в формуванні зрілих Т- і В-лімфоцитів, які перебувають в стані відносного спокою, але здатних до імунної відповіді на специфічний антиген.

Гуморальні і клітинні ланки набутого імунітету

Імунітет поділяють на гуморальний і клітинний. **Гуморальними реакціями** імунітету називають такі реакції, при яких відбувається активація антигенспецифічних В-лімфоцитів, подальша трансформація їх в плазмоцити, які синтезують антитіла. Антитіла безпосередньо не вражають носія антигенів, але вони можуть виступати в якості опсонінов і залучати компоненти вроджених механізмів резистентності (фагоцити, комплемент, природні кілери), що здійснюють безпосереднє пошкодження патогену. Таким чином, головною функцією гуморальної ланки імунітету є захист від позаклітинних збудників (бактерій), до яких можливий вільний доступ антитіл, а в гуморальних реакціях беруть участь тимус-незалежні клітини (В-лімфоцити). Встановлено, що імуноглобуліни класу G здатні до інтранейтрального проникнення. При цьому захоплення антитіл здійснюється переважно моторними волокнами в області синапсів, а переміщення захоплених імуноглобулінів до тіла клітини відбувається шляхом ретроградного аксонального транспорту.

Клітинні реакції імунітету здійснюються за рахунок Т-лімфоцитів і забезпечують безпосереднє знищення змінених клітин макроорганізма, в тому числі і тих, які містять внутрішньоклітинних збудників, а також

забезпечують регуляцію імунної відповіді в цілому. Таким чином, **основними функціями клітинних імунних реакцій є:**

- захист проти внутрішньоклітинних паразитів (вірусів, грибкових агентів, деяких бактерій, протозойних мікроорганізмів);
- протипухлинний захист;
- здійснення реакції «трансплантат проти господаря».

Відповідно міжнародній класифікації всі основні антигенні маркери лімфоцитів та інших клітин імунної системи об'єднані в групи і позначаються як **кластери диференціації**, або **CD** (англ. clusters of differentiation). Рецептори CD - це антигени та інші структури, які перебувають на мембрані клітин крові. Набір різних CD на окремій клітці становить унікальний фенотип. Важливо відзначити, що, на відміну від В-лімфоцитів, Т-клітини розпізнають не натуральний антиген, а тільки його частину - так званий імуногенний пептид. Виділяють кілька субпопуляцій Т-лімфоцитів; Т-хелпери, регуляторні Т-лімфоцити, цитотоксичні Т-клітини (Т-кілери) і Т-клітини пам'яті.

Антигенрозпізнаючі рецептори за структурою дуже схожі на молекулу імуноглобуліна, але не ідентичний йому; дві константних ділянки «утримують» його на мембрані цитоплазми, а дві варіабельних ділянки приймають участь в розпізнаванні антигену.

CD2 - це поверхневий антиген, який виявлено на всіх зрілих периферичних Т-лімфоцитах. Існує методика для кількісного визначення Т-лімфоцитів), яка ґрунтується на взаємодії з цим рецептором. CD2 рецептор бере участь в процесі активації Т-клітин, що важливо для проліферації клітин в тимусі.

CD3 - структура, яка є сигнальною частиною рецептора Т-лімфоцитів. Зв'язування пептиду антигену, асоційованого з молекулою головного комплексу гістосумісності II, є специфічним сигналом для активації зрілої Т-клітини. При розпізнаванні чужорідного антигену отриманий сигнал по CD3 структурі передається всередину клітини.

Рецептор до мітогенів - при взаємодії деяких лектинів рослинного походження виникає активація, трансформація і проліферація Т-лімфоцитів в культурі *in vitro*. Ця властивість використовується для оцінки проліферативної активності Т-лімфоцитів (реакція бласттрансформації - РБТЛ).

CD4 - це молекула, яка перебуває на субпопуляції Т-хелперів і необхідна для взаємодії рецептора з молекулою HLA класу II.

CD8 - поверхневий маркер, що експресується на мембранах цитотоксичних Т-лімфоцитів. Молекули CD8 виступають в ролі корецептора під час взаємодії антигенрозпізнавального рецептора Т-кіллера з комплексом молекули HLA класу II, Т - імуногенний пептид, який експресується на поверхні скомпрометованої клітки.

Т-хелпери (англ. To help - допомагати), або CD4⁺ Т-клітини, - це лімфоцити, що виконують регуляторну роль при імунній відповіді, в

буквальному сенсі допомагаючи розмноження і диференціювання клітин інших типів. Існують принаймні чотири типи хелперів - Т-хелпери 0-го типу (Th0), Т-хелпери 1-го типу (Th 1), Т-хелпери 2-го типу (Th2) і Т-хелпери 3-го типу (Th3), які відрізняються продукцією інтерлейкинів (ІЛ), а значить, спо- можності направляти імунну відповідь у визначене русло.

Спектр основних поверхневих молекул Т-хелпера наведено на рис. 2.

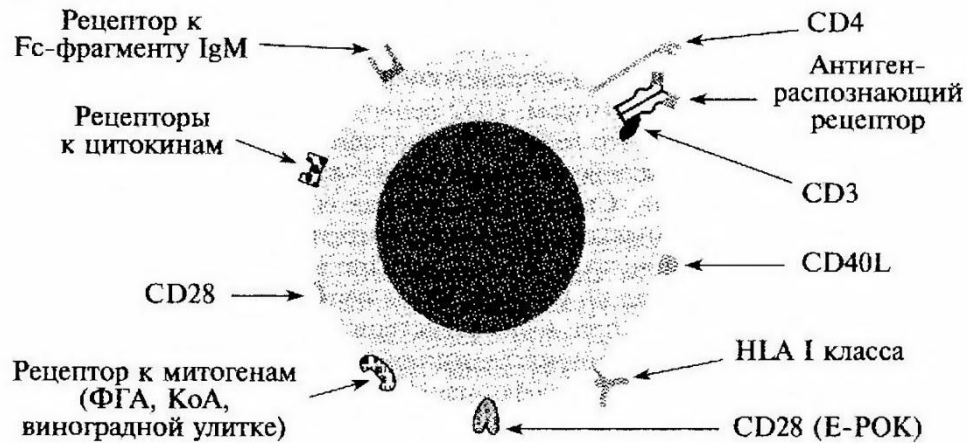


Рис. 2. Поверхневі молекули Т-хелпера

Цитотоксичні Т-лімфоцити, або Т-кілери (від англ. To kill - вбивати), - імуніцити, наділені безпосередніми ефекторними функціями. Часто Т-кіллери називають CD8 Т-лімфоцитами, оскільки маркером цієї субпопуляції служить корецептор CD8. Існують принаймні дві групи цих клітин, а саме: Тс 1 і Тс 2, кожна з яких продукує особливий комплект цитокінів.

В циркуляції цитотоксичні Т-лімфоцити існують у вигляді клітин попередників. Для їх активації і дозрівання, що відбувається при співдії Т-хелперів, необхідний певний час (близько 7-10 днів). Т-кілери містять антигенрозпізнавальні рецептори, тому вони, як і Т-хелпери, здатні до здійснення специфічного розпізнавання.

Т-супресори. Сьогодні не виділяють окремої субпопуляції Т-супресорів, оскільки було встановлено, що супресорною активністю при певних умовах можуть володіти практично всі Т-лімфоцити і навіть В-клітини. Особливо активні в цьому відношенні регуляторні Т-клітини (CD4 ^ CD25 + Т-лімфоцити). Таким клітинам відводять особливу роль у підтримці імунної толерантності та обмеження імунної відповіді на екзогенні та ендогенні антигени, що попереджає виникнення алергічних і гіперергічних реакцій.

Т-клітини пам'яті утворюються при будь-якій імунній відповіді і існують протягом тривалого часу після його завершення (від декількох місяців до десятків років). Завдяки цим лімфоцитів виникає вторинна імунний відповідь при повторному надходженні антигену, який пв порівнянні з первинним характеризується коротшою латентною фазою, більш інтен- пасивного антитілоутворення з переважною продукцією IgG, а також більш високою активністю цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Питання для самоконтролю:

1. Яка основна функція імунної системи?
2. Поясніть етапи дозрівання імунокомпетентних клітин.
3. Які існують гуморальні реакції імунітету?
4. Які бувають клітинні реакції імунітету?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

Тема: Процеси імунної відповіді

Ініціація запалення

Для забезпечення повноцінної імунної відповіді патоген повинен воодіти принаймні двома властивостями. По-перше, йому необхідно адгезуватися на поверхні клітин макроорганізму, по-друге, надавати прямий чи опосередований пошкоджуючий ефект на клітинні елементи і компоненти міжклітинного матриксу. Саме цими властивостями наділені всі патогенні мікроорганізми. В іншому випадку вони не змогли б проникнути в макроорганізм і поширитися в ньому в зв'язку з бар'єрними функціями його тканин.

В першу чергу організм реагує на патоген розвитком **запалення** - неспецифічна захисна реакція, опосередкована факторами вродженої резистентності, але ініційованої самими пошкодженими клітинами .

Найчастіше мікробної агресії піддаються клітини, що вистилають барєрні органи, а також клітинні елементи судин, що містяться в них. Тому розвиток запалення найчастіше ініціюють кератиноцити, епітеліоцити шлункового і респіраторного трактів, фібробласти, а також ендотеліоцити капілярів шкіри і власної пластинки слизових оболонок. У відповідь на агресію з боку патогена в клітинах макроорганізму активуються гени, що забезпечують синтез доїмунних цитокінів (ІЛ-1 | 3, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12 та ін.). Саме ці речовини активують клітини вродженої резистентності (нейтрофіли і моноцити крові, тканинні макрофаги, дендритні клітини).

Синтез інтерлейкінів - не єдиний спосіб для уражених клітин заявити про вторгнення мікробних агентів. Так, вірус-інфіковані клітини виробляють **інтерферони** (α, γ), що забезпечують резистентність здорових клітин до вторгнення вірусу. Важливо, що найбільша концентрація інтерферонів досягається в місці пошкодження, що створює навколо вогнища репродукції вірусу нездоланий бар'єр з резистентних клітин, тобто забезпечує локалізацію інфекції. Крім того, інтерферони активують деякі клітини (наприклад, природні кілери), задіяні в протівірусному захисті. З іншого боку, на поверхні пошкоджених клітин утворюються **білки теплового шоку**, що дозволяють вступати в дію так званим інтраепітеліальним Т-лімфоцитам.

Таким чином, клітини різноманітних тканин, будучи пошкодженими патогенами , змінюють свій метаболізм з метою активації факторів вродженої резистентності, тобто ініціації запальної реакції.

Міграція лейкоцитів у вогнище перебування патогена.

Хемотаксис, хемокінез і хемоаттрактанти. Прийнято вважати, що першими реагують нейтрофіли, дещо пізніше в осередок прибувають макрофаги. Активація цих клітин полягає в інтенсифікації метаболізму, особливо тих шляхів обміну, які забезпечують продукцію факторів агресії. Крім того, підвищується експресія мембранних адгезійних молекул, за рахунок чого поверхня активованих клітин стає «липкою». Також

збільшується рухливість (**хемотаксис**), хемотаксис обумовлений активацією актоміозінових комплексів, що містяться в цитоплазмі. Для переміщення ниток актину по відношенню до фібрил міозину необхідна енергія, зосереджена в молекулах АТФ, тому активовані фагоцити починають посилено вживати глюкозу. У свою чергу інтенсивний метаболізм і підвищений хемотаксис забезпечують можливість ефективного **хемотаксису** (направленого переміщення) клітин вродженої резистентності в місце перебування патогена. Хемотаксис обумовлений дією **хемоаттрактантів** – спеціальних речовин, що виділяються клітинами пошкоджених тканин для залучення фагоцитів. Орієнтиром для їх спрямованого переміщення служить **хемотаксичний градієнт**, обумовлений тим, що в місці продукції хемоаттрактантів їх концентрація надзвичайно висока, а в міру віддалення від вогнища поступово зменшується.

Слід зазначити, що в активованих фагоцитах різко зростає експресія мембранних рецепторів до хемотаксичних речовин, при цьому відбувається переміщення їх на той полюс мембрани, де концентрація хемоаттрактантів вище.

Тонкі механізми міграції лейкоцитів.

Міграція лейкоцитів з плазми крові в осередок перебування патогена є одним з ключових процесів при запаленні. В ході міграції виділяють два етапи;

1. Етап трансендотеліальної міграції, що складається у фіксації лейкоцитів на ендотелії і подальшому протискуванні між клітинами судин в позасудинному просторі.

2. Етап міграції по позаклітинному матриксу позасудинного простору.

Етап трансендотеліальної міграції.

На міграцію лейкоцитів через ендотелій судин впливає принаймні 3 основні фактори:

1. Величина поверхневого заряду взаємодіючих клітин. Чим нижче такий заряд, тим ефективніше міграція, так як менш виражено електростатичне відштовхування однойменно заряджених клітин.

2. Сила гемодинамічного змиву в посудині.

3. Експресія комплементарних молекул адгезії на мігруючих лейкоцитах і ендотелії.

Виходячи з цих вимог, найбільш зручними для міграції є посткапілярні венули, де поверхневий заряд ендотеліоцитів низький, сила гемодинамічного змиву невисока, а ступінь експресії адгезійних молекул достатня.

Етап міграції в позаклітинному матриксі.

Покинувши посудину, нейтрофіл продовжує міграцію в міжклітинному матриксі пошкодженої тканини. Для адаптації до нових умов переміщення змінюється набір поверхневих молекул нейтрофіла. При цьому на його поверхні з'являються такзвані **дуже пізні антигени** (англ. Very 'late antigens, VLA). Вони забезпечують прикріплення до елементів міжклітинного

матриксу (фібронектину, колагену і ін.). Вони отримали свою назву в зв'язку з довгим часом експресії (в завершальній фазі міграції).

Генералізовані реакції при запаленнях.

Дія цитокінів лише на початковому етапі запалення обмежується осередком, а пізніше поширюється на весь організм. Одночасно реалізується безліч механізмів, що сприяють недопущенню генералізації інфекційного агента. Принципово важливою властивістю макрофагів є синтез потужних **прозапальних цитокінів** (в першу чергу, ФНП-а, ІЛ-1 β , ІЛ-6), котрі, з одного боку, підтримують розвиток запальної реакції, а з іншої - активують імунокомпетентні клітини, готуючи їх до наступної антигенної презентації. Саме з вивільненням макрофагальних цитокінів пов'язані метаболічні перебудови при запаленні і виникненні симптомів інтоксикації.

Самим потужним цитокіном цієї групи є **фактор некрозу пухлини α** (ФНП- α). Він виконує ряд найважливіших функцій:

- стимулює фагоцитоз і продукцію вільних радикалів фагоцитами;
- підсилює експресію адгезійних молекул ендотелієм (наприклад, E-селектину);
- є хемоаттрактантом для макрофагів і клітин Лангерганса;
- збільшує продукцію гепатоцитами білків гострої фази;
- активує ліпопротеїназу, сприяючи тим самим мобілізації ліпідів з депо;
- діє на терморегуляторний центр (через вивільнення ПГЕ₂), підвищуючи температуру тела.

Крім цього, ФНПа здатний самостійно індукувати **апоптоз** скомпрометованих клітин шляхом взаємодії з мембранним білком р55 (звідси і не зовсім правильна назва даного цитокіну) .

Функції фактора некрозу пухлини частково перекриваються ІЛ-1 β та ІЛ-6, тому тандем цих цитокінів практично нерозривно діє у вогнищі запалення.

Так , ІЛ-1 β стимулює Т-лімфоцити і підвищує синтез інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) та експресію рецептора до ІЛ-2. При дії ІЛ-1 β преактивовані В-лімфоцити підсилюють проліферацію, а також експресію поверхневих молекул НІА ІІ і рецепторів до ІЛ-2.

Натуральні кілери також відповідають на дію ІЛ-1 β посиленням експресії рецептора до ІЛ-2. У макрофагів посилюється фагоцитоз , синтез вільних радикалів, підвищується експресія молекул НІА ІІ, синтез ФНП-а, ІЛ-6 і самого ІЛ-1 β .

Ендотеліоцити під впливом ІЛ-1 β посилюють експресію молекул адгезії, починають підвищений синтез простагліцину, з чим пов'язана підвищення судинної проникності .ІЛ-1 β викликає викид біогенних амінів, в першу чергу гістаміну з тучних клітин. У кісткової, хрящової і м'язових тканинах ІЛ-1 β індукує синтез протеїназ, що обумовлює розвиток остеопорозу. Даний цитокін також впливає на клітини мієлоїдного ряду, діючи синергічно з ГМ-КСФ. Одночасно пригнічується еритропоез, так як

ІЛ-1 β є антагоністом еритропоєтину. У табл. 1 перераховані основні ефекти ІЛ-1 β .

Таблиця 1

Основні ефекти цитокіну ІЛ-1 β

Мішень	Ефект
Т-лімфоцити	Підвищення синтезу ІЛ-2, збільшення експресії рецепторів до ІЛ-2
В-лімфоцити	Посилення експресії HLA II
Природні кіллери	Підвищення експресії рецепторів до ІЛ-2
Макрофаги	Посилення фагоцитозу, продукції вільних радикалів і прозапальних цитокінів, підвищення експресії HLA II
Ендотеліоцити	Посилення експресії молекул адгезії і синтезу простагліцину
Тучні клітини (мастоцити)	Викид гістамінів

ІЛ-6 надає деякі контррегуляторні ефекти по відношенню до ІЛ-1 β і ФНП-а, проте стимулює вплив на синтез білків гострої фази гепатоцитами дозволяє віднести його до прозапальних цитокінів.

Питання для самоконтролю:

1. Що таке «запалення» та як воно ініціюється?
2. Як відбувається міграція лейкоцитів у вогнище запалення?
3. Які розрізняють етапи міграції?
4. Функції фактору некрозу пухлин?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5

Тема: Механізми регуляції імунної відповіді

Механізми самопосилення імунної відповіді.

Відзначено, що сила імунної відповіді значно перевищує силу антигенного роздратування. Це передбачає наявність механізмів самопосилення імунної відповіді. Серед більшості таких механізмів слід виділяти але принаймні два найважливіших. Перший механізм опосередкований ІЛ-2. Відомо, що інтерлейкін-2 являється продуктом активованих Т-хелперів і виступає в ролі їх ростового фактора. Після успішної антигенної презентації Т-хелперів починає синтез ІЛ-2, що викликає проліферацію як самої клітини-продуцента, так і сусідніх східних клітин. При цьому утворюється кількість Т-лімфоцитів, що значно перевищує антигенне навантаження.

Другий механізм реалізується в системі ІЛ2-ІЛ12. ІЛ-2, що продукується Т-хелперами 1-го типу, впливає на макрофаги, посилюючи продукцію ними ІЛ-12. Останній сприяє переважному дозріванню Т-хелперів 1-го типу, які в свою чергу продукують нові порції ІЛ-2. Завдяки цьому позитивному зворотному зв'язку відбувається «закріплення» Th 1 шляху імунної відповіді.

Механізми самообмеження імунної відповіді.

Відомо, що макрофаги активують антигенспецифічні Т-лімфоцити шляхом здійснення антигенної презентації, продукції ІЛ-1 α і ФНП-а. Однак існує і негативний зворотний зв'язок, що забезпечує коректну ступінь активації Т-лімфоцита. Один з її аспектів - синтез активованим макрофагом простагландину, яка пригнічувала Т-клітини. Простагландин, надає неспецифічний вплив на Т-лімфоцити, тобто діє як на антигенспецифічні, так і на антигеннеспецифічні клітини. Пригнічення таких лімфоцитів попереджає їх запрограмовану загибель, тобто забезпечує саногенетичну функцію.

Другий механізм негативного зворотного зв'язку полягає в продукції макрофагами ферменту, що здійснює синтез вітаміну D₃ (кальцитріолу) з попередника. Синтезований вітамін D₃ має інгібуючий вплив на Т-лімфоцити. Цей механізм забезпечує обмеження зростання гранулем. Оскільки гранулематозне скупчення клітин формується при резистентному до чинників агресії макрофагів патогені, теоретично гранульома в зв'язку з постійно підтриманою клітиною імунною відповіддю мала б необмежене зростання. Однак в дійсності цього не відбувається, оскільки макрофаги надають регулюючий вплив на ступінь активації Т-лімфоцитів. Клінічно значний біохімічний ефект синтезованого макрофагами кальцитріола стає в умовах тривалого існування гранульом (при саркоїдозі, туберкульозі). У таких випадках розвивається гіперкальціємія і гіперкальціурія. В результаті зазначених біохімічних зрушень відбувається кальціфікація судин і сполучної тканини внутрішніх органів, а також розвиток нефролітіаза.

Механізми пригнічення запального процесу.

Згортання імунної реакції відбувається за рахунок діяльності макрофагів завдяки їх унікальній властивості здійснювати антигенну презентацію без відриву від вогнища перебування патогена. Оскільки макрофаги продовжують виконувати функцію фагоцитозу і цитотоксичності, саме ці клітини володіють достовірною інформацією про поточний стан патогена. У випадку елімінації припиняється антигенна презентація і експресія костимулюючих молекул, продукції макрофагальних прозапальних цитокінів і стимуляції вироблення адгезійних молекул. Перераховані фактори стримують активовані лімфоцити від спонтанного апоптозу. Тому в разі виключення макрофагів з роботи, що буває при повній елімінації патогена, відбувається масова загибель лімфоцитів, задіяних в здійсненні імунної реакції. Виживають лише **клітини пам'яті** - популяція антигенспецифічних лімфоцитів, що відрізняються резистентністю до спонтанного апоптозу. Саме ці клітини і забезпечать більш швидку ефективну імунну відповідь при повторному надходженні антигену. При згортанні імунних реакцій макрофаги синтезують переважно **трансформуючий фактор росту β (ТФР)**. Цей цитокін пригнічує експресію ФНП-а і стимулює хемотаксис фібробластів до вогнища запалення. З другого боку, ТФР індукує продукцію фактора росту фібробластів, що обумовлює їх активну проліферацію, а також забезпечує підвищення функціональної активності цих клітин, тобто сприяє продукції ними компонентів міжклітинного матриксу - колагенів, фібронектину, протеогліканів. Також цей цитокін стимулює вироблення фактора росту нервів і активує процеси неоангіогенезу в осередку. Крім того, процес згортання імунної відповіді відбувається за рахунок ІЛ-10 Th 2. Все це забезпечує протікання процесів репарації і усунення пошкоджень, нанесених запальною реакцією.

Основні принципи імунної відповіді.

Следует звернути увагу на кілька важливих моментів, що являються принциповими при реалізації механізму імунної відповіді (рис.3). Імунною системою антиген розпізнається в двох формах - в натуральному вигляді імуноглобуліновими рецепторами В-лімфоцитів і у вигляді імуно-генного пептиду антигенрозпізнавальних рецепторів Т-хелперів. Це необхідно для здійснення коректної імунної відповіді. Відомо, що саме фактори вродженої резистентності можуть встановити чужерідність патогена. Імунокомпетентні клітини позбавлені цієї властивості, що пов'язано з особливостями формування їх рецепторів антигенного розпізнавання. Тому деякі В-лімфоцити здатні розпізнавати антигени, котрі аж ніяк не є чужерідними. Але самотійно вони не можуть розвивати імунну відповідь, оскільки вимагають стимулюючих впливів з боку активованих Т-хелперів, що розпізнають відповідний імуногенний пептид. А утворення пептиду відбувається за рахунок діяльності факторів вродженої резистентності (макрофагів, дендритних клітин), тому активація Т-хелперів відбувається тільки при попаданні чужерідного патогена.

В разі взаємодії з Т-кліткою В-лімфоцит виступає в якості антигенпрезентуючої клітини (АПК), презентуючи імуногенний пептид антигену, напередодні специфічно розпізнаного його імуноглобуліновим рецептором. Якщо дендритні клітини взаємодіють з наївними Т-лімфоцитами, тобто по суті ініціюють розгортання імунних реакцій, то В-клітини здійснюють антигенну презентацію компетентним Т-хелперам - імуноцитам, що вже отримали інформацію про антиген від інших АПК. Тому В-лімфоцити не в змозі викликати імунну реакцію на «свій» антиген, хоча і є АПК, подібно макрофагів і дендритних клітин. Активовані В-лімфоцити можуть лише сприяти напрямку реалізується імунної відповіді в бік гуморальних реакцій, що супроводжуються синтезом специфічних антитіл.

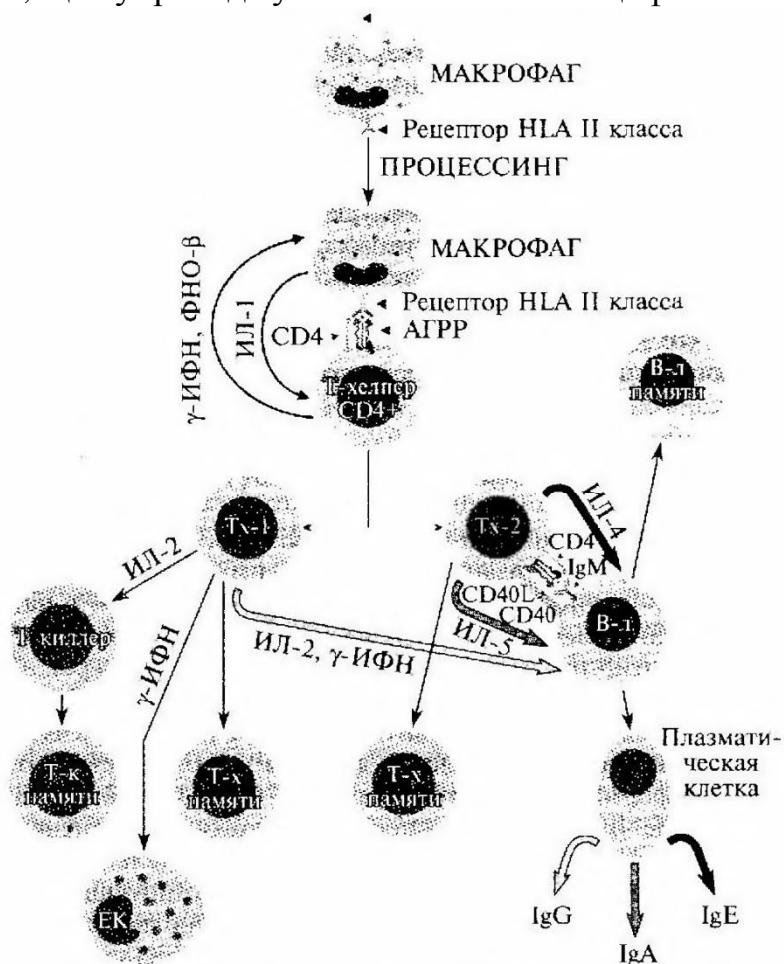


Рис. 3. Спрощена схема імунної відповіді на патоген

Антигенна презентація повідомляє Т-лімфоцитам про те, що у внутрішньому середовищі організму з'явилися субстанції (чужорідні або вивільнені власні), що порушують звичний антигенний склад. Розпізнавання молекул HLA II сигналізує про те, що антигенна презентація здійснюється власною АПК, тому інформація про зміну антигенного гомеостазу достовірна. Слід зазначити, що іноді може скластися ситуація, при яких АПК будуть презентувати деякі власні антигени (наприклад, при масивному руйнуванні власних тканин). Тому в імунній системі працює ще один

принцип надійності. Він забезпечується необхідністю експресії коstimулюючих молекул при презентації антигену. Поява поверхневих коstimулюючих молекул свідчить про ступінь чужорідності розпізнаного об'єкта, тому ці сигнали в значній мірою визначають поведінку Т-хелперів після антигенної презентації (активація, анергія або апоптоз). При відсутності експресії коstimуляторів Т-лімфоцити обмежуються анергією (бездіяльністю), так як отримують інформацію про те, що, хоча й розпізнана АПК субстанція і порушує первинний склад антигенних структур організму, вона не є достатньо чужерідною, щоб належати патогенним мікроорганізмам. Тому розвиток повноцінної імунної відповіді проти неї є недоцільним. Якщо ж є загроза формування аутоімунної реакції, що буває при презентації аутоантигенів на достатньому активаційному тлі (в умовах дії прозапальних цитокінів та експресії адгезійних молекул), то аутореактивні Т-хелпери при антигенній презентації зазнають апоптоз (запрограмовану загибель). Справа в тому, що прозапальні цитокіни поряд з активацією Т-клітин підвищують їх чутливість до апоптозу. Таким чином, забезпечується ефективний механізм регуляції кількості активно проліферуючих клітин. Тому активований іммуногенним пептидом аутореактивний Т-хелпер стає дуже чутливим до запрограмованої загибелі, яку повинні скасувати в першу чергу коstimулюючі молекули. В разі порушення в цій тонкій системі в лімфоциті реалізується каскад апоптоза.

Через загибель антигенспецифічної Т-клітини в рецепторном репертуарі утворюється «діра» і імунна система вже не здатна розвивати повноцінну відповідь на даний антиген. Цей механізм лежить в основі **імінної толерантності** - унікальної властивості імунної системи розпізнавати власні антигени, але не реагувати на них розвитком ефektorних механізмів .

Таким чином, можна сформулювати основні умови реалізації імунного розпізнавання, яке є ключовим процесом в імунній відповіді:

1. АПК повинна «зробити» оптимальну кількість пептидів з чужорідного або власного антигенного матеріалу, а пептидзв'язуючі борозди її HLA II - бути в змозі зв'язати ці пептиди. Цей етап названо селекцією антигенних детермінант.

2. Імунна система конкретної людини повинна мати достатній репертуар Т-лімфоцитів, де містився б АГ-розпізнаючий рецептор, здатний розпізнати даний чужорідний пептид. Якщо ж такі Т-лімфоцити відсутні (є «дірки» в репертуарі Т-лімфоцитів), створюються умови, при яких імунна система не здатна розпізнавати деякі антигени.

3. Припускають, що за допомогою пептидів і відповідного цитокінового фону включаються механізми запуску імунної відповіді з включенням переважно Th I і Th 2.

4. Сила імунної відповіді залежить від характеру пептиду і молекул HLA, а також від ступеня відповідності між антигеном і максимально комплементарним антигенрозпізнавальним рецептором, наявними в рецепторному репертуарі імунної системи даного організму.

Питання для самоконтролю:

1. Поясніть механізм самопосилення імунної відповіді.
2. Поясніть механізм самообмеження імунної відповіді.
3. Поясніть механізми пригнічення запального процесу

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

Тема: Основи протибактеріального та противірусного імунітетів

Основи протибактеріального імунітету

Основним механізмом протибактеріального імунітету являється **фагоцитоз**, здійснюваний нейтрофілами і макрофагами. Як відомо, нейтрофіли також секретують **фактори агресії** (вільні радикали, протеолітичні ферменти, антивітамінні, антінутрієнти) в тканинну рідину для знищення бактерій. Етапи фагоцитоза:

1. Розпізнавання об'єкту фагоцитозу і фіксація на ньому фагоцита. Механізм подібного розпізнавання неспецифічний і ґрунтується на взаємодії спеціальних мембранних рецепторів фагоцитів з молекулярними шаблонами патогену, що входять до складу поверхневих структур бактеріальних клітин. Найчастіше в якості молекулярних шаблонів виступають **ліпополісахариди, залишки манози і ліпотейхової кислоти**. При цьому важливий не сам факт присутності молекул того або іншого шаблону на поверхні клітин, а щільність їх розподілу на тій ділянці поверхні бактерії, з яким безпосередньо взаємодіє фагоцит. Так, поодинокі залишки манози можуть зустрічатися і на власних клітинах організму, особливо при частковій втраті поверхневих екранізуючих молекул. У той же час на бактеріальних клітинах міститься величезна кількість залишків манози, що дозволяє фагоцитам щільно фіксуватися на бактерії і створює достатній по силі активаційний сигнал для перебудови цитоскелету в місці фіксації об'єкта і подальшої його **інтерналізації** (поглинання). Слід відзначити, що навіть при високій щільності експресії молекулярних шаблонів захоплення об'єктів, опосередковано їх розпізнаванням, у багатьох випадках є недостатньо ефективним. Для вирішення цієї проблеми в процесі імунної відповіді для фагоцитів утворюється новий спосіб розпізнавання об'єктів - за допомогою **опсононів-антитіл**. Синтезовані імуноглобуліни, фіксуючи своїми антигензв'язуючими центрами на поверхневих молекулах (здійснюючи специфічне розпізнавання), густо покривають поверхню бактеріальної клітини, «визуалізуючи» її для фагоцитів.

2. Поглинання (інтерналізація) об'єкта фагоцитозу ініціюється активаційними сигналами, які надходять всередину фагоцитуючої клітини при взаємодії її рецепторів з опсонінами чи молекулярними шаблонами. В основі процесу поглинання лежить перебудова цитоскелета фагоцита, який, як відомо, визначає форму клітини. В результаті подібної перебудови відбувається інвагінація (втягування) тієї ділянки мембрани, на котрій зафіксований патоген. Останній поглинається все глибше всередину цитоплазми, поки не настане момент, коли мембрана над ним зійдеться і він виявиться оточеним своєрідним мембранним мішком, який отримав назву фагоцитарної вакуолі, або **фагосоми**. Важливо відзначити, що в фагосомах бактеріальні клітини залишаються цілком життєздатними. Зниження рН сердовища за рахунок посиленої роботи протонних насосів, що містяться в

мембрані фагосом ,найчастіше призводить лише до інактивації мікроорганізмів. Для їх повного знищення необхідне надходження чинників агресії, сконцентрованих в інших органелах - лізосомах. Подібні механізми складають субстрат наступного етапу фагоцитозу.

3. Злиття фагосом з первинними лізосомами фагоцитів і руйнування патогена. Первинними називають лізосоми, що містять фактори агресії, але позбавлені об'єкта фагоцитозу. При злитті з фагосомах первинні лізосоми трансформуються в фаголізосоми, або вторинні лізосоми. Саме тут за допомогою як кисень-залежних, так і кисень-незалежних механізмів здійснюється деструкція захопленого патогена. До кисень-залежних механізмів фагоцитів відносять ушкодження патогенів за допомогою **супероксиданіону, синглетного кисню, гідроксильного аніона, перекису водню, йону хлору і гіпохлоридної кислоти (НСІО)**. Слід відмітити, що дія двох останніх компонентів багато в чому аналогічно дії хлорного вапна (NaClO). До кисень-незалежних механізмів відносять ефекти **лактоферину, лізоциму, катіонних білків, катепсинів, протеїназ**, в основному спрямованих на грампозитивні бактерії і заснованих на пошкодженні клітинної стінки і порушення деяких важливих метаболічних процесів.

4. Екзоцитоз фрагментів зруйнованого патогена. Коли захоплена бактеріальна клітина виявиться повністю зруйнована на дрібні фрагменти, залишки видаляються з фагоциту шляхом екзоцитозу. При цьому пептиди недеяких антигенів транспортуються на поверхню клітини, де зв'язуються з молекулами гістосумісності II класу, відбувається підготовка до здійснення антигенної презентації, яка забезпечує як ініціацію імунної відповіді, так і його подальше підтримання. У цьому заключається спадкоємність імунних реакцій, оскільки реалізація механізмів, первинно пошкоджуючих патоген, одночасно є передумовою для включення подальших процесів, спрямованих на підвищення якості механізмів противомікробного захисту.

Оскільки фагоцитоз є найбільш ефективним компонентом протибактеріальної відповіді, захисні механізми, які здійснюються бактеріальними клітинами, в основному спрямовані на дану ланку. Йдеться про різні патоген-опосередковані реакції, що порушують третій етап фагоцитозу, оскільки це - одночасно і найважливіший, і найбільш чутливий механізм:

1. Блокада фаголізосомального злиття, що дозволяє мікроорганізму персистувати в фагосомах, які, як відомо, позбавлені факторів агресії. Особливо ефективно цей механізм здійснюється мікобактеріями.

2. Резистентність до дії лізосомальних ферментів; досить висока у стафілококів і гонококів.

3. Здатність швидко залишати фагосоми ще до моменту їх злиття з первинними лізосомами. Цією властивістю наділені шигелі і риккетсії. В протибактеріальному імунитеті крім фагоцитів активну участь приймають і інші фактори вродженої резистентності: лізоцим, комплемент, С-реактивний

білок, природні антитіла і т.д. Порядок залучення тих чи інших факторів визначається властивостями поверхневих структур бактеріальних клітин.

Основи противірусного імунітету

Особливий інтерес до імунології вірусних інфекцій викликаний унікальною характеристикою біології їх збудників. Вірус - облігатний внутрішньоклітинний паразит, який використовує для синтезу своїх білків біохімічний апарат клітини-господаря. Шкіра та слизові - основні природні бар'єри для вірусного вторгнення, до хімічних бар'єрів відносять шлунковий сік і жовч, які швидко знищують чутливі до них віруси. Після подолання цих бар'єрів вірус розмножується в первинному вогнищі і звідти поширюється по всьому організму, викликаючи ті чи інші клінічні прояви інфекції. Кінцевий результат хвороби залежить від функціональної активності захисних механізмів організму, в першу чергу факторів вродженої резистентності (рис.4).

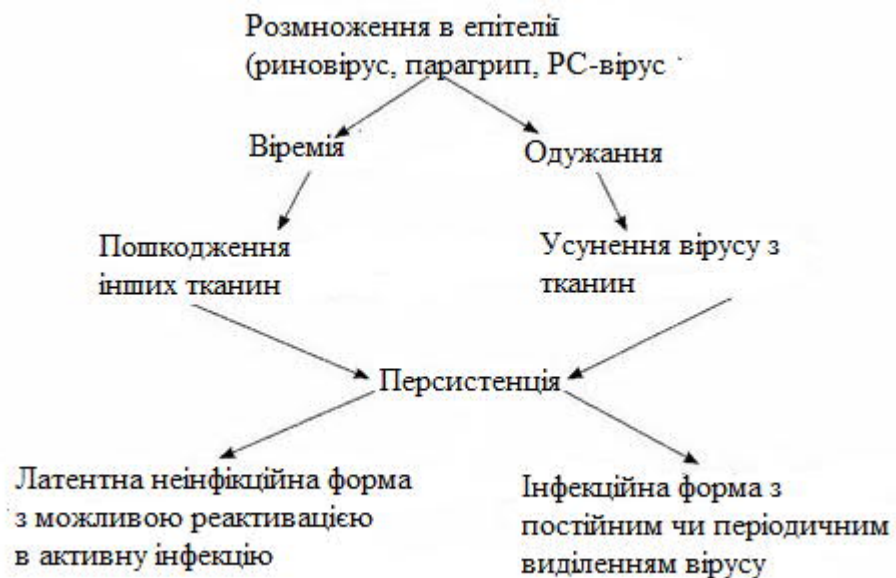


Рис.4. Варіанти наслідків вірусних інфекцій після реплікативної стадії

Вроджений противірусний захист (рис. 5) реалізується за посередництвом двох компонент: гуморального (інтерферони (ІФН), комплементи) і клітинного (природні кілери, макрофаги та ін.).

Гуморальні фактори:

1. α -ІФН і β -ІФН синтезуються в інфікованій клітині і здійснюють противірусний захист сусідніх клітин шляхом активації генів з антивірусною активністю і подальшим руйнуванням вірусної РНК. γ -ІФН виконує роль імунного цитокіна, активуючи макрофаги і власні кіллери для здійснення противірусного захисту.

2. Комплемент:

- вірус активує комплемент класичним і альтернативним шляхами;
- комплемент здійснює віроліз (лізис вірусу) за умови високої щільності експресії поверхневих антигенів вірусу;

- компоненти комплементу опсонізують вірус перед фагоцитозом;
- бере участь в реакціях антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності.

Клітинні чинники: 1. Природні (натуральні) кілери (ПК) належать до фракції великих гранулярних лімфоцитів, що складають 5% всіх лімфоцитів периферичної крові. ПК властива спонтанна клітинно опосередкована цитотоксичність щодо вірус-інфікованих клітин. Природні кілери при розпізнаванні мішеней не обмежені молекулами головного комплексу гістосумісності, тому можуть руйнувати вірус-інфіковані клітини, що блокують експресію цих молекул. Так, при цитомегаловірусної (ЦМВ) інфекції ПК є головним ефекторним механізмом захисту.

2. Макрофаги. Роль макрофагів в противірусному захисті:

- надають прямий цитотоксичний ефект по відношенню до клітин, заражених РНК-вірусом (краснуха, кліщовий енцефаліт, грип, паротит) і ДНК-вірусами (віруси натуральної віспи і контагіозного моллюска);
- є місцем латентної персистенції для збудників; в наступному може розвиватися повторна вирусемія і зараження інших клітин;
- є місцем продукції дочірніх вірусів при ВІЛ-інфекції.

Зв'язок вродженого і набутого противірусного імунітету

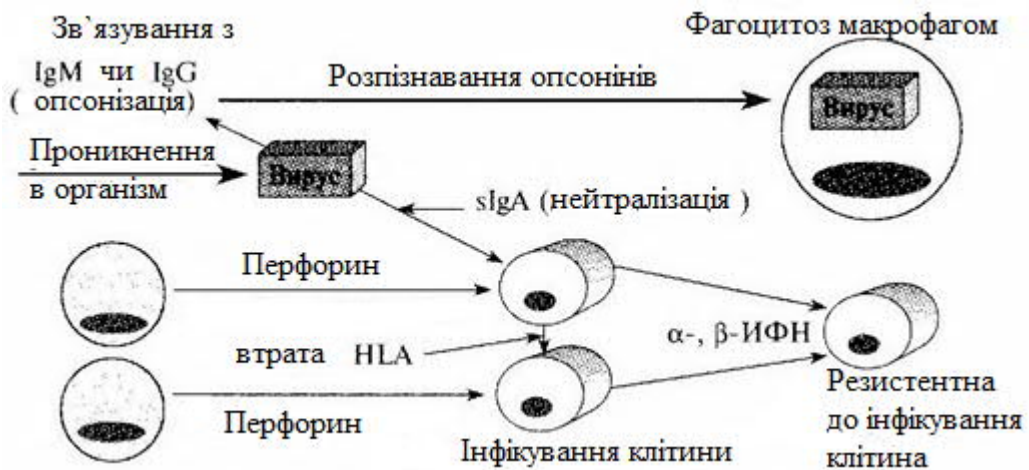


Рис. 5. Принципова схема противірусного імунітету

На малюнку показано, що в разі проникнення вірусу через слизові оболонки відбувається зв'язування його віріонів з sIgA, що призводить до нейтралізації патогена. Якщо ж вірус подолав бар'єр, утворений sIgA, і проник в клітину, останні піддаються атаці з боку специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів. Деякі інфіковані клітини припиняють експресію молекул HLA I, що являється захисним механізмом Т-кілерів. Однак в цьому випадку вони стають зручною мішенню для природніх кілерів. При парентеральному проникненні вірусу останній зв'язується специфічними IgM і IgG, які виступають в ролі опсонінов.

Фактори набутого противірусного імунітету

1. Гуморальні імунні реакції.
Типи противірусних антитіл:

- **нейтралізуючі** антитіла надають протективний ефект, пов'язуючи вірус і пригнічуючи його активність;
- **блокуючі** антитіла попереджають взаємодію збудника з рецепторами клітин;
- комплемент зв'язуючі антитіла приймають участь в комплемент-залежному цитолізі заражених клітин і в руйнуванні вірусних оболонок;
- **антитіла**, які беруть участь в реакціях **антитілозалежної клітинно-опосередованої** цитотоксичності, обумовленої взаємодією антитіл з експресувати на мембрані клітини вірусними антигенами з участю комплементу і макрофагів.

Несприйняття до вірусних інфекцій обумовлено саме наявністю антитіл. Вакцинопрофілактика найбільш ефективна при збудниках зі стабільним антигенним складом і обмеженим числом серотипів (віруси корі, краснухи, вітряної віспи, епідпаротиту, гепатиту В)

.2. Клітинні імунні реакції - найважливіший механізм елімінації збудника вірусної інфекції.

- **цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ)** з фенотипом CD8 + розпізнають і знищують клітини-мішені, що містять комплекси антигенів першого класу гістосумісності з вірусними пептидами;
- **Т-хелпери першого типу** індукують диференціювання і проліферацію ЦТЛ, а також активують ці клітини. Завдяки частковому поєднанню функцій Т-клітин 2-го типу, Т-хелпери 1-го також сприяють розмноженню антитілосинтезуючих клітин.

Зараження імунокомпетентних клітин вірусами

Зараження вірусами імунокомпетентних клітин і порушення їх функціональних властивостей - основний механізм розвитку імунодефіциту при вірусних інфекціях. Вірусні агенти здатні вражати самі різноманітні клітини імунної системи:

- віруси гриппа, простого герпесу, поліомієліту, кору - порушують функціональну активність Т-клітин (їх відповідь на мітогени);
- вірус імунодефіциту людини інфікує Т-хелпери (CD4 + Т-лімфоцити);
- вірус Епштейна-Барр(ЕБ) вражає В-лімфоцити;
- герпесвірус людини 6-го типу заражає Т-лімфоцити;
- ВІЛ і ЦМВ перситує в макрофагах.

Імунопатологія при вірусних інфекціях

Серед імунопатологічних порушень, що мають місце при вірусних інфекціях, слід виділити імунокомплексні і аутоімунні реакції, а також хронізацію інфекції внаслідок передчасної дисоціації імунних комплексів.

1. Хвороби імунних комплексів.

При вірусемії формуються імунні комплекси, які циркулюють по всьому організму, можуть депонуватися в тканинах і викликати запальний процес (ЦМВ, гепатит В):

а) вроджена ЦМВ-інфекція супроводжується депонуванням імунних комплексів в нирках і розвитком нефропатії;

б) при гепатиті В формуються імунні комплекси, провокуючі розвиток артритів, васкулітів, гломерулонефриту, паротита.

Антигіла можуть вироблятися на змінені під дією вірусу клітинні структури. Оскільки у таких клітин зберігається морфологічна схожість з нормальними клітинами, можливе виникнення та подальший розвиток аутоімунних реакцій, а при втраті контролю над ними - аутоімунної хвороби. Зміна просторової структури противірусних антитіл може викликати продукцію аутоантитіл до власних імуноглобулінів - так званих **антиідіотипових** антитіл, які в нормі утворюються в невеликих кількостях.

2. Пошкодження тканин внаслідок активації противірусного імунітету.

При інфікуванні вірусом гепатиту В сам збудник безпосередньо не викликає загибелі клітин печінки. Гепатоцити руйнуються внаслідок активації цитотоксичних реакцій, обумовлених CD8+ Т-клітинами. Експериментальне зараження дорослих мишей вірусом лімфоцитарного хориоменінгіту призводить до їх загибелі, а у тварин з імуносупресією розвивається толерантність до цього вірусу або ж хронізація процесу.

3. Самозараження організму після дисоціації комплексу «вірус + антитіло» і формування хронічної інфекції.

Надлишок антитіл не завжди посилює вірусінактивуючий ефект. Тривало циркулюючі імунні комплекси можуть призводити до зараження нових клітин внаслідок вивільнення пов'язаних вірусів. Комплекси IgG-вірус можуть обумовлювати зараження фагоцитів, які їх захоплюють

Механізми, за допомогою яких віруси уникають специфічної дії імунної системи

1. **Інтеграція вірусу** в геном забезпечує його тривалу прсистенцію та можливість інфікування сусідніх клітин і їх дочірніх популяцій.

2. **Міжклітинна передача** вірусу від клітини до клітини без вірусемії (герпес-вірус).

3. Зараження клітин, які не **підлягають імунному нагляду** (нейронів, клітин кришталика). При цьому на мембранах інфікованих клітин відсутній комплекс «HLA - вірусний пептид».

4. **Пригнічення експресії** комплексу HLA - вірусний пептид (аденовірус) .

5. **Антигенні мутації** в структурі білка gp-120 призводять до втрати здатності раніше синтезованих антитіл зв'язувати мутантні віруси імунодефіціта людини.

Питання для самоконтролю:

1. Які існують етапи фагоцитозу?
2. Який механізм протибактеріального імунітету?
3. На чому базується противірусний імунітет?
4. Який зв'язок між вродженим і набутим противірусним імунітетом?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

Тема: Основи протигрибкового імунітету

Гриби є порівняно рідкісною причиною інфекційних захворювань людини. По-перше, даний факт пов'язаний з необхідністю значного імунного дефекту для розвитку клінічно маніфестних форм грибкових ушкоджень. Але це не єдина причина зазначеної особливості. Справа в тому, що через особливості метаболізму клітини грибів часто не здатні витримувати конкуренцію з боку бактеріальної мікрофлори, що заселяє бар'єрні органи макроорганізму. Тому грибкові інфекції частіше розвиваються після потужної антибіотикотерапії, спрямованої на знищення антагоністичної бактеріальної флори.

Макрофаги і нейтрофіли грають основну роль в позбавленні макроорганізму від грибкових патогенів. Розпізнавання клітин грибів макрофагами може здійснюватися безпосередньо, завдяки наявності на їх поверхні рецепторів шаблонного розпізнавання. У той же час нейтрофіли розпізнають патогени при участі опсонинів - антитіл і компонентів системи комплементу.

Безпосереднє захоплення клітин грибів часто пов'язане зі значними труднощами, зумовленими великими розмірами псевдогіфу або істинного гіфу. Один фагоцит часто нездатний захопити довгий ланцюг, утворений грибовими клітинами. У таких випадках фагосома не формується, а псевдоподії різних фагоцитів перехрещуються один з одним і здійснюють поступове поглинання елементів гіфи. При цьому занурення патогена відбувається за рахунок компонентів цитоскелета (тубулінових мікротрубочок мікрофіламентів з G-актина).

Засоби знищення захоплених грибових клітин представлені активними метаболітами кисню, галогенів, азоту, багато з яких являються вільними радикалами. Подібні молекули містять неспарований електрон на зовнішньому енергетичному рівні, тому є потужними окисниками. Паралельно з **окисними** в фагоцитах реалізуються **неокисні** механізми пошкодження патогена.

Діяльність ферментів, що забезпечують синтез активних похідних кисню, стимулюється ГМ-КСФ, ІЛ-15 та γ -ІФН.

Система оксиду азоту фагоцитів в даний час розглядається як один з основних фунгіцидних механізмів. Індукція ензиму **синтази NO** проходить під впливом ФНП-а і γ -ІФН. Перший цитокін продукується активованими фагоцитами і забезпечує ранню активацію ферменту (до залучення імунних механізмів). Другий, будучи продуктом Т-хелперів 1-го типу, багаторазово підвищує літичний потенціал армованих макрофагів. Пригнічення системи оксиду азоту відбувається під впливом ІЛ-4, ІЛ-10, ТФР- β (трансформуючий фактор росту), Перші два цитокіни є продуктами Т-хелперів 2-го типу, тому активація цих клітин сприяє зниженню протигрибкового потенціалу імунної системи.

Галогенпохідні метаболіти фагоцитів утворюються за рахунок діяльності ферменту **мієлопероксидази**. Дефіцит цього ензиму є однією з причин незавершеності фагоцитозу при грибкових інфекціях.

Ферментні системи синтезу вільних радикалів вимагають наявності іонів заліза. У той же час залізо є суттєвим мікроелементом для грибкових паразитів. Тому крім прямої фунгіцидної дії окисні системи надають і фунгістатичний ефект, опосередований дефіцитом Fe^{2+} в осередку інфекції. Крім цього, фагоцити секретують лактоферин, що зв'язує вільне залізо, а γ ІФН зменшує доступ цього іона в клітини за рахунок зниження експресії рецептора до трансферину.

До неокислювальних фунгіцидних механізмів відносяться **протеолітичні ферменти** лізосомального апарату фагоцитів, а також дефензини, лізоцим, лактоферин і низький рН в фаголізосомах.

Система комплементу на ранніх етапах грибкових інфекцій може активуватися як по **альтернативному** (наприклад, за рахунок зимозана дріжджових грибів), так і по **лектинового** шляху (за рахунок синтезу манозозв'язуючого протеїна гепатоцитами), оскільки поверхня грибкових клітин містить більшу кількість залишків манози. Пізніше (на 3 -й-4-ту добу) проходить реалізація **класичного шляху** активації комплементу. Підставою для цього служить синтез специфічних антитіл.

Роль **природних кілерів** в механізмах протигрибкового захисту поки недостатньо вивчена. Вважають, що ці клітини можуть як безпосередньо взаємодіяти з грибковими агентами, оскільки містять лектинові кілінг-активуючі рецептори, так і забезпечувати ініціацію клітинної протигрибкової відповіді - за рахунок секреції γ -ІФН, ФНП-а та ІЛ-2 вони здатні активувати розвиток $Th\ 1$ реакцій, які підсилюють фагоцитоз. Навряд чи ПК забезпечують постійну регуляцію імунної відповіді, але вони цілком здатні направляти його в $Th\ 1$ русло на ранніх стадіях інфекції.

Багаточисленні дослідження показали, що переважна активація **Т-хелперів 1-го типу** асоціюється з лікуванням від більшості грибкових інфекцій. У той же час підвищена активність **Т-хелперів 2-го типу** погіршує прогноз захворювання. Справа в тому, що діяльність $Th\ 2$ призводить до пригнічення активності $Th\ 1$ лімфоцитів, а значить, викликає ослаблення фагоцитозу - не відбувається належного армування імунною системою макрофагів і нейтрофілів. Слід зазначити, що роль Т-хелперів 2-го типу при грибковій інфекції не є однозначною, так як синтез специфічних антитіл забезпечує більш ефективне розпізнавання антигенів грибів клітинами вродженої резистентності. Тим більше що γ -ІФН Т-хелперів 1-го типу істотно підвищує експресію Fc-рецепторів на мембрані фагоцитів. Тому при грибкових ураженнях утворюються обидва типи хелперів, але для найбільш ефективного фунгіцидного ефекту необхідно переважна активність $Th\ 1$. Проте при реалізації протигрибкових імунних реакцій іноді виникають періоди значного переваги $Th2$. Це пояснюється необхідністю контролю за

надлишковою деструктивною діяльністю фагоцитів, в ході якої, як відомо, вражаються і власні тканини .

Основна функція CD8+ Т-лімфоцитів, активованих цитокінами Th 1, полягає у знищенні макрофагів з незавершеним фагоцитозом і з розміщеними в цитоплазмі клітинами гриба. Як відомо, Т-кілери рестриковані по HLA I, тому не в змозі розпізнавати вільні грибкові клітини. Для того щоб активувалися високоспецифічні, а значить, найбільш прицільно діючі цитотоксичні лімфоцити, необхідно, щоб патоген потрапив всередину власної клітини макроорганізму. В будь-якій людській клітині працює спеціальна ферментативно-транспортна система, що забезпечує експресію всіх антигенів («своїх» і надійшли ззовні) на цитолемі в складі молекул HLA I. Таким чином, клітина «звітує» перед імунною системою про антигенний склад її внутрішнього середовища. Гриби в більшості випадків не є внутрішньоклітинними паразитами, тому їх самостійна діяльність не призводить до включення в захист Т-кілерів. Але в організмі є клітини, які самі активно захоплюють різноманітні об'єкти. Йдеться про фагоцити і дендритні клітини. За рахунок діяльності подібних клітин стає можливою повноцінна реалізація клітинних механізмів імунної відповіді. Якщо фагоцитоз носить завершений характер, то залучення Т-кілерів є недоцільним, оскільки як цитотоксична клітина макрофаг має набагато більш потужний потенціал, ніж CD8+Т-лімфоцити. В той же час багато видів грибів пристосувались до фагоцитозу і володіють ефективними механізмами протидії його заключних фаз, що завдає безпосереднє пошкодження. В такому випадку активовані цитотоксичні Т-лімфоцити розпізнають специфічні грибкові пептиди, що містяться на поверхні макрофагів в комплексі з HLA I, і знищують клітини з незавершеним фагоцитозом. Так, ціною загибелі власного фагоцита відбувається знищення інфекційних агентів.

Окрім цитотоксичного ефекту, CD8+ Т-клітини шляхом синтезу ІФН- γ і ІЛ-2 стимулюють Т-хелпери 1-го типу і природні кілери, тим самим підвищуючи ефективність фагоцитозу і пригнічуючи Th 2 відповідь.

γ Т-лімфоцити також здатні до продукції ІФН- γ і ІЛ-2 стимулюючи фагоцитоз. Особливість цих клітин полягає в тому, що вони самостійно розпізнають білки теплового шоку (наприклад, кандідного) та інші антигени, не потребуючи посередництва антигенпредставляючих клітин.

Принципова схема імунної відповіді при грибкових інфекціях представлена на рис.6. Макрофаги, здійснюючи фагоцитоз грибкових патогенів, продукують ІЛ-12, що при наступній антигенній презентації обумовлює переважне формування Т-хелперів 1 типу. У свою чергу, утворені Th 1 повторно активують (армують) макрофаги, природні кіллери і нейтрофіли, суттєво підвищуючи їх протимікробний потенціал під посередництвом цитокинової стимуляції (ІЛ-2 і γ -ІФН). Важливо відмітити, що повторне залучення клітин вродженої резистентності проходить в умовах досить високої концентрації специфічних протигрибкових антитіл

(паралельно розгортаються Th 2 реакції), тобто ці клітини забезпечуються механізмом специфічного розпізнавання, якого вони були позбавлені в період первинної взаємодії з патогеном.

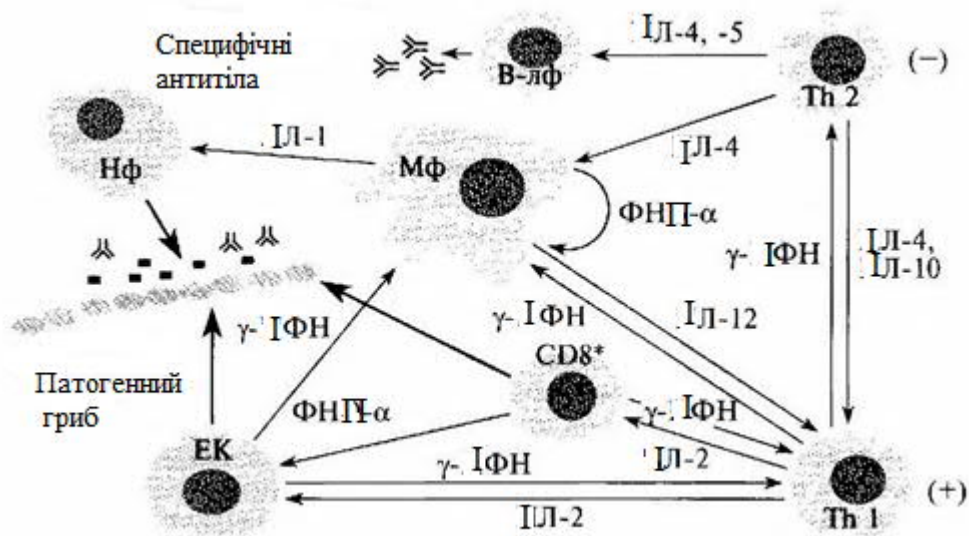


Рис. 6. Принципова схема імунної відповіді при грибковій інфекції

Безпосереднім фунгіцидним ефектом володіють макрофаги, нейтрофіли, цитотоксичні Т-лімфоцити і природні кілери. Також продемонстровано, яким чином під впливом цитокінів забезпечується переважною активацією Т-хелперів 1-го типу і в результаті яких впливів ці клітини забезпечують активацію макрофагів, природних кілерів і цитотоксичних Т-лімфоцитів. Трудності реалізації протигрибкового імунітету пов'язані принаймні з двома проблемами:

- а) проблема фагоцитозу патогенних грибків, міцелій яких представлений довгими нитками;
- б) проблема протидії грибкових клітин, які реалізують більшість механізмів, що дозволяють знизити ефективність імунної відповіді.

Динамічна структура клітинної стінки, здатність до зміни фенотипів і секреції протеїназ дозволяють грибам уникати дії більшості протимікробних речовин і до певної міри протидіють конкуренції з боку бактеріальної мікрофлори. Так, грибкові протеїнази здатні розщеплювати імуноглобуліни і компоненти комплексу. Власні рецептори іС3β і С3d при відсутності рецептора до С3β дозволяють деяким грибковим патогенам порушувати реалізацію каскаду комплексу, знецінюючи його протимікробний ефект. Встановлено, що *S. albicans* здатна продукувати каталазу, яка запобігає дії перекису водню. Крім цього, гриби конкурують з клітинами макроорганізму за залізо, необхідне для реалізації окислювальних мікробіцидних механізмів макрофагів. Захисні механізми грибкових мікроорганізмів в даний час всебічно вивчаються у багатьох дослідницьких центрах світу.

Питання для самоконтролю:

1. На чому базуються основи протівірусного імунітету?
2. Яка роль природних кілерів у механізмах протигрибкового захисту?
3. Які труднощі виникають при реалізації протигрибкового імунітету?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

Тема: Лабораторні методи оцінки імунного статусу

Відповідно до сучасних уявлень імунна система виконує не тільки унікальну функцію імунітету, але і виступає в ролі однієї з найбільш інтеграційних систем в організмі, забезпечуючи через цитокіни зв'язок між нервовою та ендокринною системами.

Імунодіагностика є найважливішою методологічною основою клінічної імунології, за допомогою якої дається характеристика окремих ланцюгів імунної системи і їх функціонального стану. Індивідуальна оцінка імунного статусу дитини - одна з найважливіших і складних проблем дитячої клінічної імунології, яка до теперішнього часу ще в більшості не оптимізована.

Одною з найважливіших завдань, що безпосередньо зачіпають інтереси лікарів різних спеціальностей, є оцінка стану імунної системи дитини. Для об'єктивної оцінки стану імунної системи людини введено поняття про імунний статус. **Імунний статус** - це сукупність кількісних і функціональних показників, що відображають стан імунної системи людини в даний момент часу. **Оцінку імунного статусу проводять з метою:**

1. Повної оцінки стану здоров'я.
2. Виявлення дисфункцій імунної системи.
3. Виявлення різних захворювань, в патогенезі яких можливі імунні порушення.
4. Виявлення генетично опосередкованих дефектів імунної системи.
5. Контроль дії «чинників шкідливості!».
6. Вивчення стану до і після вакцинації в групах ризику.
7. Контролю імуномодельючої, імуносупресивної і цитостатичної терапії.
8. Вивчення гострих і хронічних інфекцій різної етіології, в цьому числі СНІДу.
9. Виявлення аутоімунних, імунокомплексних, алергічних захворювань.
10. Виявлення лімфопроліферативних і інших злоякісних новоутворень.
11. Обстеження реципієнтів до та після трансплантації. На сьогоднішній день відомо велика кількість методів оцінки окремих ланок імунної системи. Це дозволяє практикуючому лікарю-імунологу вибрати найбільш адекватні з наявних методів для конкретних діагностичних і прогностичних цілей, для проведення імунологічного моніторингу і т.д. В цьому відношенні дуже корисною була і залишається до сих пір двоетапна система оцінки імунного статусу людини. Всі існуючі в даний час імунологічні тести поділяють на тести I і II рівня.

З допомогою тестів першого рівня можна виявити грубі дефекти в клітинних і гуморальних ланках імунітету, а також в системі фагоцитів.

Тести I рівня - це орієнтовні тести, до них відносяться:

1.Визначення відносного і абсолютного числа лімфоцитів в периферичній крові (лейкограма) .

2. Визначення відносної і абсолютної кількості Т і В-лімфоцитів.

3.Визначення концентрації основних класів сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG) .

4. Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів.5. Визначення титру комплемента.

Дані методи здебільшого доступні звичайним лабораторіям клінічної імунології. Використання цих тестів в повсякденній практиці клінічного імунолога дає можливість підтвердити або спростувати припущення про порушення функціонування імунної системи.

Тести II рівня - аналітичні. Слід зазначити, що в багатьох лабораторіях методи розеткоутворення фактично втратили актуальність і були замінені більш сучасними і об'єктивними методами визначення фенотипу Т- і В-клітин.

Аналітичні тести рекомендується застосовувати для поглибленого аналізу стану імунної системи, визначення рівня і виваженості порушень в імунній системі. Ці тести доступні лише добре оснащеним, спеціалізованим імунологічним лабораторіям.

До них відносяться:

1. Визначення основних популяцій лімфоцитів і субпопуляцій регуляторних Т-лімфоцитів за допомогою моноклональних антітіл.

2. Тест гальмування міграції лейкоцитів.

3. Оцінка проліферативної активності Т- і В-лімфоцитів на мітогени, антигени, алогенні клітини .

4. Оцінка активності кіллерних лімфоцитів.

5. Виявлення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) .

6. Визначити різні компоненти комплемента.

7. Оцінка різних етапів фагоцитозу і рецепторного апарату фагоцитів.

8. Тести за визначенням медіаторів імунної системи, в тому числі продукції і рецепції інтерлейкінів.

9. Аналіз генів, відповідальних за експресію імунологічно важливих молекул.

10. Визначення специфічних IgE.

11. НСТ-тест.

12. Інші дослідження стану імунної системи.

Лабораторні методи дослідження лімфоцитів

Всі методи дослідження лімфоцитів можна розділити на вивчення поверхневих маркерів і функціональні тести. У 1983р Перша міжнародна робоча нарада по антигенам диференціювання лейкоцитів ввело в практику клінічної імунології термін «clusters of differentiation» (кластери диференціювання , скорочено CD).

Кількісні методи, засновані на виявленні поверхневих маркерів. В даний час для ідентифікації поверхневих структур лімфоцитів ряду інших клітин в основному використовують 3 групи методів:

- розеткоутворення;
- методи імунофлюоресценції;
- імуноферментні методи.

Дослідження функціональної активності лімфоцитів.

Існує велика кількість методів, що дозволяють досліджувати *in vitro* різні функції лімфоїдних клітин, зокрема, в клінічних імунологічних лабораторіях досліджують інтенсивність проліферативної відповіді лімфоцитів на Т- і В-клітинні мітогени, продукцію антитіл, а також синтез мононуклеарами периферичної крові ряду цитокінів .

Оцінка інтенсивності продукції цитокінів.

За допомогою тестів цієї групи можна отримати уявлення про продукцію цитокінів мононуклеарними лейкоцитами периферичної крові. Слід мати на увазі, що одні цитокіни продукуються переважно лімфоцитами (ІЛ-2, ІЛ-6), а інші - моноцитами (ІЛ-1, TNF); продукцію перших стимулюють Т-клітинні мітогени, продукцію других - мікробні ліпополісахариди.

Дослідження проводять за наступною схемою. Мононуклеари периферичної крові, виділені методом градієнтного центрифугування, культивують в 24-ямкових культуральних планшетах (обсяг лунки близько 2 мл) протягом 16-18 год у присутності конканаваліну А, фітогемоаглютиніну або ліпосахаридів. Надосадову рідину збирають і визначають в ній вміст цитокіну, використовуючи або ІФА, або цитокінозалежні клітинні лінії.

Оцінка функціонального стану фагоцитів.

Найбільш доступним об'єктом для оцінки функціонального стану фагоцитів є нейтрофіли крові. Одні тести припускають вивчення цих клітин в цільній крові, тоді як інші вимагають отримання збааченої суспензії нейтрофілів. Саму фагоцитарну активність оцінюють за допомогою методів, що дозволяють визначити частку клітин, здатних формувати фагосому. Відомий прийом постановки *in vitro* фагоцитарної реакції з нейтрофілами хворого і виділеними у нього ж штамами мікроорганізмів. Цей прийом найбільш адекватний для реальної оцінки антимікробної активності нейтрофілів даного хворого.

«Перетравлюючи» здатність нейтрофілів і їх антибактеріальну активність можна визначити безпосередньо методом фагоцитоза з «переварюванням» досліджуваного мікроорганізму.

Основні методи визначення антитіл і антигенів.

Методи визначення антитіл і антигенів засновані на різних способах реєстрацій їх взаємодії. З деякою часткою умовності їх можна розділити на 3 групи:

- методи, засновані на реакції преципітації;
- методи, засновані на реакції аглютинації;

- методи, засновані на використанні мічених антитіл чи антигенів.

Радіальна імунодифузія по Манчіні. Цей метод відрізняється більш високою чутливістю, так як антисироватка входить до складу агару, в котрий з лунки дифундує антиген. У міру віддалення від лунки концентрація антигену поступово падає, поки не стає еквівалентною концентрації антитіл в агарі. При цьому утворюються добре помітні кільця преципітації. Чим вище концентрація внесеного антигену, тим більший діаметр кільця. Якщо в реакції використовується кілька стандартів з відомою концентрацією антигену, то шляхом порівняння ці спорудження калібрувальної кривої можна проводити кількісне визначення антитіл в зразках.

Метод широко використовується для визначення концентрації імуноглобулінів, СЗ-компонента комплементу, С-реактивного білка, α -фетопротеїну, трансферину.

Імуноелектрофорез.

Імуноелектрофорез є поєднанням електрофорезу з імунопреципітацією. Існують різні варіанти імуноелектрофореза. Якщо електрофоретичній розгонці піддають антиген, то після зняття напруги вздовж напрямку руху антигену в електричному полі в гелі вирізають канавку, в яку заливають антисироватки. За допомогою даного методу шляхом аналізу утворилася дуги преципітації напівкількісно визначають концентрацію імуноглобулінів різних класів і ідентифікують мієломні білки.

Для визначення антигенів, мігруючих в сторону позитивно зарядженого електрода, може застосовуватися зустрічний імуноелектрофорез. Цей метод високочутливий і займає відносно мало часу. Його використовують для ідентифікації антигенів вірусного гепатиту В, антитіл до *Aspergillus* при бронхолегеновому аспергиліозі, антитіл до *N. Meningitidis*.

Для кількісного визначення концентрації деяких білків (альбуміна, трансферину, церулоплазміну) застосовують ракетний імуноелектрофорез. При цьому препарат, що містить антиген, вносять в різних розведеннях в серію послідовних лунок в гелі, що містить антисироватки. Після електрофоретичного розгону утворюються дуги преципітації, що нагадують за своєю формою ракету. Зі зменшенням концентрації антигена буде відповідно зменшуватися і довжина дуг.

Для поділу складної суміші антигенів використовують двомірний електрофорез. Метод включає два етапи. На першому етапі білки дифундують під впливом електричного поля в агарозному гелі, що містить антитіла. На другому етапі пластину повертають на 90° і піддають повторній розгонці в напрямку, перпендикулярному першому. Таким чином, вдається кількісно охарактеризувати кожен з антигенів суміші.

Методи, засновані на реакції аглютинації. Взаємодія антитіл з клітинами або іншими великими частками призводить до склеювання в добре помітні конгломерати. Пряма аглютинація частіше використовується для визначення серотипів бактерій для визначення груп крові. Використовується

також метод непрямой (пасивної) аглютинації, коли на основі еритроцитів готують діагностику. З цією метою, як правило, використовують еритроцити, навантажені антигеном після модифікації їх поверхні таніном чи хлорним хромом. Існують і інші методи зв'язування поверхні еритроцитів з антигеном.

Методи, засновані на використанні мічених реагентів. В даний час розроблено багато методів, які передбачають застосування мічених антитіл і антигенів. Найчастіше з цією метою використовують радіоактивну або ферментну мітку.

Радіоімунологічні методи. В якості мітки частіше застосовують радіонукліди йоду. Для визначення антигенів зазвичай використовують класичний радіоімунологічний аналіз (РІА). Метод заснований на зменшенні зв'язування антитілами радіоактивно міченого антигену за рахунок додавання неміченого антигену. Зміст останнього визначають за ступенем зменшення такого зв'язування. Метод дозволяє виявляти дуже низькі концентрації антигену (до 10^{-12} г / мл). Метод часто використовують для визначення антигенів вірусу гепатиту, а також низькомолекулярних білків, як, наприклад, гормони.

Імуноферментні методи. Імуноферментні методи в силу своєї безпечності і високої чутливості поступово витісняють РІА методи. Крім того, реагенти, до яких приєднаний фермент, зазвичай досить стабільні і допускають більш тривале зберігання. Частіше використовують пероксидазу і фосфатазу, які при додаванні до реагуючих компонентів відповідного субстрату утворюють забарвлені продукти. У разі виявлення антитіл антигени іммобілізують на поверхні лунок пластикових панелей. До них додають досліджувану сироватку. Зв'язування антитіл з антигеном визначають на другому етапі, інкубуючи утворений комплекс з міченими ферментом анти-Ig-антитілами (так звані другі антитіла). Далі після промивання додають розчин субстрату, який, вступаючи в реакцію з ферментом, дає фарбування. Інтенсивність фарбування буде залежати від кількості ферментної мітки (чим більше зв'яжеться мічених антитіл, тим яскравіше забарвлення). Результати визначають фотометрично.

В даний час випускається велика кількість різноманітних імуноферментних діагностичних наборів як для визначення антитіл в сироватці або інших біологічних рідинах, так і для визначення антигенів. В якості останніх можуть виступати збудники різних захворювань (мікроби, віруси), а також білки, визначення змісту яких в крові або секреті представляє діагностичний інтерес (аутоантитіла, фактори неспецифічного захисту, гормони, цитокіни, білки гострої фази і інші.)

Питання для самоконтролю:

1. Що таке «іmunний статус» і навіщо проводять його оцінку?
2. Які проводять лабораторні методи оцінки лімфоцитів?
3. Які основні методи оцінювання антитіл і антигенів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

Тема: Визначення, класифікація і клінічні прояви дисфункції імунної системи

Імунний статус - це стан імунної системи у данної людини у певний момент часу, виражене в клінічних симптомах і спеціальних лабораторних показниках, що характеризують функцію різноманітних ланок імунної системи.

Дисфункція імунної системи - клінічно імунне порушення, що верифіковане за результатами імунологічних лабораторних досліджень в динаміці, а також по анамнестичним критеріям і даним генеалогічного дерева. Дисфункції імунної системи лежать в основі автоімунної, алергічної, лімфопроліферативної, неопластичної патології. Але частіше всього вони проявляються у вигляді інфекційного синдрому. З іншого боку, дисфункції імунної системи самі можуть бути наслідком інфекцій органів і клітин імунної системи (наприклад, при СНІДі) .

Всі дисфункції можна розділити на дві великі групи: **імунодефіцитні захворювання (ІДЗ) і імунна недостатність (ІН)**.

Імунодефіцитними називаються захворювання, які розвиваються внаслідок дефектів або дефіцитів тих чи інших факторів імунітету.

Спадковими вважаються ІДЗ при наявності в родоводі імунодефіцитних захворювань в двох-трьох поколіннях, а також декількох клінічних критеріїв ІДЗ у пацієнта і відповідних лабораторних даних.

Вродженими вважаються ІДЗ при наявності в антинатальному анамнезі факторів, що порушують внутрішньоутробний розвиток, а також кількох клінічних критеріїв ІДЗ і відповідних лабораторних даних.

Набутими вважаються ІДЗ при наявності в постнатальному періоді факторів, які порушують становлення імунної системи, що призводять до утворення клінічних симптомів ІДЗ і порушення лабораторних показників, які стійко зберігаються і після усунення провокуючих факторів.

Імунною недостатністю вважаються клінічні порушення імунної системи, зумовлені віковими особливостями(фізіологічна) або основним захворюванням (вторинна), які зникають на протязі періоду до 6 міс. після усунення причинних захворювань або факторів. У зв'язку з цим хворі з ІН не вимагають призначення специфічних імунотропних препаратів.

Частіше доводиться проводити диференційну діагностику між набутими імунодефіцитними захворюваннями і вторинною імунною недостатністю. Слід розуміти, що набуте ІДЗ є окремою одиницею (хворобою), що має самостійну течію. Це означає, що набуте ІДЗ клінічно маніфестує навіть при умовах усунення причинного захворювання або фактора, оскільки в основі такої дисфункції лежить стабільний імунний дефект. Хворі з набутих ІДЗ вимагають обов'язкового призначення імунотропної терапії.

Вторинна імунна недостатність (ВІН) розвивається при багатьох бактеріальних і вірусних інфекціях, захворюваннях печінки і нирок, лікарської і променевої терапії, більшості хронічних захворювань, в результаті стресових ситуацій, порушень харчування, при паразитарних і гельмінтозних захворюваннях. ВІН - супутник будь-якого хронічного процесу, найчастіше результат тривалого застосування імунодепресантів, кортикостероїдів, цитоста-тиків, антибіотиків, сульфаніламідних препаратів, голодування, втрати білку, розлади харчування, порушення всмоктування в кишечнику, діяльності білкової або вітамінної недостатності. Діагноз вторинної імунної недостатності може трансформуватися в діагноз набутого ІДЗ в разі стабільного збереження клінічно маніфестних імунних розладів на протязі більше 6 міс. від моменту усунення основного захворювання.

Діагноз імунодефіцитного захворювання повинен ґрунтуватися на клініко-анамнестичних даних (основний критерій), підкріплених даними генеалогічного дерева і імунограми. Сьогодні добре вивчені основні клінічні, анамнестичні та генеалогічні критерії дисфункцій імунної системи.

Скринінгові клініко-анамнестичні критерії для виявлення дисфункцій імунної системи

1. Клінічні симптоми.

1. Виражена стигматизація (більше 5 стигм дізембріогенеза) .
2. Відставання дитини у зростанні і вазі.
3. Симптоми хронічного або рецидивуючого отиту (не менше 4 разів на рік) і синуситу (не менше 4 разів на рік), менінгіту, пародонтиту, паротиту з рецидивуючим перебігом; рецидивні бронхіти і пневмонії (не менше 2 разів на рік) .
4. Хронічний або рецидивний ентерит, тривалий час виразки слизових оболонок що не загоюються, стійкий синдром мальабсорбції, а також лямбліоз та гельмінтози з рецидивуючим плином.
5. Рецидивуючі гнійні ураження: фурункули, карбункули, парапроктити, абсцеси, стафіло і стрептодермії, остеомієліт, сепсис.
6. Рецидивуючі герпесвірусні інфекції та інфекції, викликанні умовно-патогенною мікрофлорою.
7. Хронічна або рецидивуюча гарячка неясного генезису.

2. Сімейний анамнез (генеалогічне дерево) .

Нез`ясовані випадки смерті немовлят і дітей першого року життя, а також летальні випадки, пов'язані з інфекційними захворюваннями, муковісцидоз; хронічні та рецидивуючі інфекційні захворювання у родичів (три і більше по вертикалі або горизонталі); гемопатії у родичів;

3. Антенатальний анамнез.

Вірусні і бактеріальні захворювання матері протягом I триместра вагітності; застосування медикаментів, зокрема гормонів, антибіотиків, сульфаніламідів, протизапальних засобів; вплив екологічних чинників; шкідливі фактори виробництва і побуту; ранні егестози; загроза переривання вагітності в ранні терміни; порушення харчування вагітної;

4. Анамнез життя і хвороби.

Виникнення захворювань в ранньому віці;рання поява: бронхолегеневих захворювань (бронхіти, пневмонії), гнійних отитів, синуситів, діареї, екземи, фурункульозу, абсцесів, тривалий субфебрилітет; розвиток аутоімунних і неопластических захворювань; реакції на вакцинацію, алергічні реакції на медикаменти; алергічні захворювання;

Пояснення до клініко-анамнестичних критеріїв

I. При наявності 3 клінічних синдромів 1 групи, одного або більше критеріїв 2 групи (сімейний анамнез) і одного або більше критеріїв із 4 групи (анамнез хвороби) діагностують спадкові ІДЗ.

II. При наявності 3 клінічних синдромів 1 групи і відсутності критеріїв 2 групи (сімейний анамнез), але наявності одного або більше критеріїв 3 (антенатальний анамнез), 4 (анамнез хвороби) діагностують вроджене ІДЗ.

III. При наявності 3 синдромів 1 групи і відсутності даних 2 і 3 груп, але наявності одного або більше критеріїв 4 діагностують набуте ІДЗ.

Скрінінгові лабораторні імунологічні тести

- зміст імуноглобулінів основних класів G, A, M в сироватці крові;
- зміст Т-лімфоцитів в крові;
- зміст В-лімфоцитів в крові;
- оцінка фагоцитоза.

Існує класифікація первинних ІДЗ, запропонована експертами ВОЗ в 1997р. Вона ґрунтується на характері імунного дефекту, виникаючого в процесі диференціювання імунокомпетентних клітин. Однак ІДЗ у вигляді класичних синдромів, зазначених в класифікації, зустрічаються дуже рідко. Часто лікарю доводиться стикатися з фенокопіями спадкових ІДЗ - вродженими чи набутими ІДЗ відповідними за клініко-лабораторними даними тієї чи іншої форми спадкового ІДЗ, але не передаються по наслідству.

Епідеміологія дисфункцій імунної системи.

Частота класичних ІДЗ, на жаль, встановлена тільки в цивілізованих країнах. Вона відрізняється залежно від рівня її виявлення і реєстрації в країні. Розповсюдженість малих аномалій імунітету в світі не встановлена, але ясно, що вона на декілька порядків вище класичних первинних ІДЗ. Останнім часом у зв'язку з виявленням молекулярних дефектів, що лежать в основі багатьох імунодефіцитів, і суттєвої варіабельністю клінічної картини і тяжкості перебігу спадкових імунодефіцитних захворювань, усвідомленням можливості їх пізньої маніфестації, в тому числі дорослих, стає ясно, що спадкові ІДЗ - це не таке вже рідке явище, як вважалося раніше.

Якщо орієнтуватися на дані Європейського реєстра первинних імунодефіцитів (звіт ESID за липень 1997), то відношення числа зареєстрованих хворих до населення в середньому по Європі становить 1: 96000. В окремих західноєвропейських країнах цей коефіцієнт дорівнює 1:38000 (Великобританія), 1: 25000 (Нідерланди), 1: 12500 (Швейцарія) і навіть 1: 10000 (Швеція). Немає підстав вважати етнічні відмінності в Європі

фактором, що істотно впливає на реальну частоту захворювань. Відмінності в частоті на порядок можна пов'язати з якістю виявлення і активністю реєстрації хворих. Таким чином, слід орієнтуватися на найбільш високі з показників (які також можна вважати заниженими). При уточненні характеру і ступеня імунної недостатності використання навіть найсучасніших методів оцінки імунного статусу не дозволяє адекватно інтерпретувати стан імунної реактивності організму без врахування існування її фізіологічних коливань. В літературі довгий час не існувало вказівок на те, що вважається зниженням показників окремих ланок імунітету. Слід зазначити, що різноманітність індивідуальних коливань окремих показників у дітей значно ширше, ніж у дорослих.

Проведені дослідження у здорових дітей раннього віку показали, що фізіологічні коливання рівня Т- і В-клітин в різні сезони року можливі до 40%, що становлять відхилення від середньо статистичних сезонних показників в дві сигми. Кількість імуноглобулінів G, A, M в сироворотці крові, Т- і В-лімфоцитів змінюється протягом року - максимальний зміст відзначається в осінньо-зимовий період, мінімальне - влітку. Очевидно, що для правильної оцінки імунної реактивності необхідно оцінювати показники імунітету з урахуванням сезону року. До нашого часу не запроваджена єдина система оцінки дефектів імунітету.

Для уніфікації оцінки імунної дисфункції слід виділяти ступінь вираженості. Імунною недостатністю першого ступеня слід вважати зниження окремих показників імунної системи до 50% нижньої границі вікової норми, що зазвичай супроводжується декомпенсацією імунних механізмів захисту. Друга ступінь імунної недостатності, як правило, проявляється частими рецидивами захворювань, що створюють замкнуте коло, з якого без відповідної імунокорекції хворим тяжко вийти, і характеризується зниженням окремих показників більш чим на 50% нижньої межі норми.

Клінічні прояви ІДЗ.

Л. Йегер (1990) всі клінічні форми ІДЗ розділив на 3 основні групи:

1. Синдром септицемії, септикопемії з гнійними ураженнями шкіри, менінгітом, артритами і остеомієлітами.
2. Синдром рецидивуючих отитів, синуситів, бронхітів, пневмоній, інфекцій дихальних шляхів; інфекцій сечовивідних шляхів.
3. Шлунково-кишковий синдром з хронічним ентеритом, колітом, проявом порушення всасування з спруподібним синдромом.

На сьогоднішній день стало відомо, що зазначені синдроми – далеко не єдині можливі клінічні прояви ІДЗ. Відомо, що в цілому ІДЗ зустрічаються набагато частіше, ніж добре вивчені первинні (спадкові) синдроми. Виникає питання: чому ж ІДЗ так рідко діагностується? Так як постановка такого діагнозу цілком можлива поклініко-анамнестическим даними, недоступність імунологічних лабораторних досліджень не може служити поясненням низького виявлення імунодефіцитних захворювань. Справа в тому, що для

постановки вірного діагноза у клініциста повинна бути певна імунологічна настороженість, так як ІДЗ не мають специфічних симптомів і проявляються в вигляді масок інших захворювань (хронічного бронхіту, хронічного пієлонефриту, рецидивуючого отиту і ін.).

Питання для самоконтролю:

1. Що означає «дисфункція імунної системи»?
2. Які існують критерії для виявлення дисфункцій імунної системи?
3. Які клінічні прояви імунодефіцитних захворювань?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

Тема: Визначення поняття алергія, класифікація і стадії алергічних реакцій

За останні десятиліття у всіх країнах світу відзначається посилення дії на організм людини несприятливих факторів навколишнього середовища, що призводить до збільшення частоти алергічних реакцій і захворювань. Слід зазначити, що частішають також псевдоалергічні реакції, котрі необхідно диференціювати з алергічними.

Завдяки значним досягненням фундаментальної і прикладної імунології відбулися суттєві зміни в розумінні поняття «алергія», яке було введено австрійським педіатром Пірке ще в 1906 р. На сьогоднішній день алергічними прийнято вважати тільки ті реакції, в яких має місце імунна стадія.

Алергія - імунопатологічна реакція організму на речовини антигенної чи гаптенної природи (алергени), що супроводжується порушенням структури і функцій власних клітин, тканин, органів і систем.

Алергічні захворювання виникають в результаті зриву імунорегуляторних механізмів і можуть розглядатися як імунодефіцитні захворювання, обумовлені перш за все недостатністю клітинної ланки імунітета (переважно регуляторних Т-лімфоцитів, що виконують супресорну функцію).

Найбільше поширення набула класифікація типів алергічних реакцій по Джеллу і Кумбсу (1968), заснована на патогенетичному принципі. Сьогодні багато авторів визнали, що запропонована класифікація описує основні типи нормальних імунних реакцій. Лише їх неповноцінна гіперактивація може призводити до самопошкодження.

Протягом кожного типу реакцій розрізняють три стадії:

1. Імунну (розпізнавання антигену і формування специфічних імунних факторів - антитіл або імуноцитів) .

2. Патохімічну (дія численних медіаторів, що вивільняються внаслідок реалізації імунної стадії) .

3. Патофізіологічну (порушення функцій органів і тканин, які проявляються тими чи іншими клінічними симптомами).

Таким чином, прояви патофізіологічної стадії, з якими працює спеціаліст при огляді хворого, є лише «вершиною айсберга» тих численних складних перетворень, що відбуваються на протязі імунологічної і патохімічної стадій. Слід зазначити, що кожен тип імунних реакцій має специфічний механізм першої стадії, але протікання наступних стадій у них однакове.

Атопічні реакції

Атопія - імунопатологічні реакції, опосередковані специфічними IgE і тучними клітинами. У зв'язку з високою швидкістю розвитку патологічного

процесу atopічні реакції раніше називали гіперчуттєвістю негайного типу (ГНТ).

Для розвитку atopічної реакції необхідно взаємодія антигенів з антитілами (АТ), які відносяться до імуноглобулінів класу Е. На етапі **сенсibilізації** в результаті розпізнавання алергену синтезуються специфічні IgE, які фіксуються на мембрані тучних клітин базофілів крові. При цьому вони зв'язуються своїми Fc-ділянками з **високоафінними рецепторами до Fc-фрагменту IgE (Fcs-R1)**. Відомо, що високоафінні рецептори знаходяться саме на мембранах тучних клітин і базофільних гранулоцитів. Останнім часом вони також виявлені на клітинах Лангерганса і еозинофілах.

Нізкоафінні рецептори до IgE (Fcs-RII) експресуються на мембранах лімфоцитів, тромбоцитів, еозинофілів і дендритних клітин. Завдяки цим рецепторам здійснюється IgE-залежне вивільнення медіаторів запалення зазначеними клітинами. Встановлено, що ІЛ-4 підсилює експресію низькоафінних рецепторів до IgE.

При повторному потрапленні в організм алергену (**іmunна стадія реакції**) відбувається його взаємодія з IgE, фіксованими на базофілах і тучних клітинах. При чому для повноцінної передачі сигналу всередину клітини необхідно перехресне зв'язування Fab-фрагментів двох суміжних молекул IgE одним алергеном. Активація зазначених клітин супроводжується їх **дегрануляцією** – вивільненням вмісту цитоплазматичних гранул в позаклітинне середовище. Важливо відзначити, що процес дегрануляції не супроводжується руйнуванням мембрани, тому клітина-продуцент зберігає свою життєздатність. Після цього починається патохімічна (медіаторная) стадія патологічного процесу.

Розрізняють гостру (ранню) і пізню фази патохімічної стадії алергічної реакції першого типу. У розвитку гострої стадії грають роль біологічно активні речовини (БАР), безпосередньо що вивільняються з базофілів і тучних клітин: **гістамін, гепарин, лейкотрієни** (в тому числі повільно реагуюча субстанція анафілаксії [МС-А]), **фактори хемотаксису еозинофілів, нейтрофілів і ін.** Ці біологічно активні речовини впливають на капілярну стінку, викликаючи розвиток реакції запалення. Як наслідок виникає гіперемія тканини, місцевий набряк, свербіж, спазм бронхів, артеріальна гіпотензія (аж до колапсу і шоку).

Пізня фаза алергічної реакції, що розвивається через 4-12 годин після гострої, характеризується залученням до патологічного процесу еозинофілів, нейтрофілів і макрофагів. Зазначені клітини залучаються в осередок факторами хемотаксису, що вивільняються в ранній фазі. Важливим етапом розвитку пізньої фази є прилипання цих клітин до ендотелію і подальша трансендотеліальна міграція, обумовлені посиленням експресії молекул адгезії на лейкоцитах і ендотелії. Прибувши клітини починають продукувати фактори агресії: **вільні радикали і протеолітичні ферменти (нейтрофіли і макрофаги), тромбоцитарний фактор, головний основний білок, катіонні білки, пероксидазу.** Зазначені фактори агресії призначені для

знищення мікроорганізмів (живих систем). Оскільки алергени в основному є біологічно інертними структурами (частки пилу, пилок рослин, елементи диму та ін.), весь агресивний потенціал активованих клітин падає на власні тканини, тобто відбувається аутопошкодження.

Еозинофіли грають двояку роль в реалізації atopічних реакцій. З одного боку, вони виділяють гістаміназу (розщеплює гістамін), арілсульфатази В (розщеплює лейкотрієни) і фосфоліпазу D (інактивує тромбоцитарноактивуючий фактор), чим перешкоджають подальшому розвитку гострої фази. З іншого боку, чинники агресії, які продукуються еозинофілами, сприяють розвитку симптомів пізньої фази. Слід зазначити також утворення еозинофілами цитокінів (ІЛ-3, ІЛ-4 та ін.), які сприяють синтезу IgE і дозріванню стовбурових клітин. Виходячи з цього, можна вважати, що еозинофіли є своєрідними регуляторними клітинами, які визначають стадійність патологічного процесу при atopії.

Клінічна картина першого типу реакцій може виражатися у вигляді анафілактичного шоку, atopічної бронхіальної астми, кропив'янки, atopічного риніту і кон'юнктивіту, atopічного дерматиту, набряку Квінке та ін.

У спеціалістів склалася помилкова думка про патологічну суть імуноглобулінів класу E. Насправді ж IgE грають найважливішу фізіологічну роль в механізмах імунного захисту і тільки у деяких схильних осіб стають посередниками імунопатологічних реакцій. Механізм синтезу IgE ідентичний таким для імуноглобулінів інших класів. При цьому встановлено, що здатність продукувати подібні антитіла з'явилася лише на самих високих щаблях еволюції. У нормі IgE виявляється в сироватці крові і в різних секретах: слині, мокротинні, шлунковому соку та ін. Концентрація його значно нижче, ніж інших імуноглобулінів, і в сироватці крові зазвичай не перевищує 0,02-0,03 г / л. Період напіврозпаду IgE складає близько 2 дні. Найбільша кількість плазматичних клітин, що продукують IgE, знаходяться в мигдалинах і аденоїдах, тобто в граничних імунних органах.

Основна фізіологічна функція цього імуноглобуліну складається в захисті слизових оболонок від мікробного вторгнення. Якщо інфекційний агент долає бар'єр, утворений секреторними IgA, він зв'язується зі специфічними IgE-антитілами, в результаті чого утворюється імунний комплекс (ефект нейтралізації). Утворенні комплекси можуть бути захоплені дендритними клітинами і макрофагами, де руйнуються. Крім того, IgE при зв'язуванні з відповідними антигенами набувають можливості фіксуватися на мембранах тучних клітин і викликати в подальшому їх дегрануляцію. Гістамін, вивільнений при дегрануляції, викликає локальне розширення судин і збільшення їх проникності, що сприяє швидкому вступу в осередок захисних факторів з плазми крові (комplementу, нейтрофілів, макрофагів, антитіл та ін.). Крім того, IgE є головним імуноглобуліном в захисних реакціях проти гельмінтів.

При атопії рівень IgE, як правило, значно підвищений, що дозволяє використовувати його кількісне визначення в якості інформативного діагностичного тесту. Останнім часом отримані дані, що IgE, синтезований особами з атонічними захворюваннями, може бути функціонально відмінним від IgE, що визначається у практично здорових осіб.

Синтез IgE - це Т-залежний процес. Основним інтерлейкіном, який приймає участь в перемиканні плазматичних клітин з синтезу IgM на IgE, являється ІЛ-4 (продукт Т-хелперів 2-го типу). Крім дії ІЛ-4, необхідний прямий контакт між плазматичною клітиною і Т-хелпером 2-го типу, що заключається у взаємодії молекул CD40 і CD40L. Крім ІЛ-4, Т-хелпери 2-го типу виробляють також ІЛ-3, ІЛ-5 і ІЛ-10. ІЛ-3 і ІЛ-5 необхідні для розвитку і активації тучних клітин і еозинофілів, що забезпечують реалізацію патохімічної і патофізіологічної стадій атопічних реакцій. При цьому γ -інтерферон, що продукується Т-хелперами 1-го типу, пригнічує синтез IgE і сприяє синтезу IgG. Підтримка рівня синтезу IgE залежить також від дії інших інтерлейкінів (зокрема, ІЛ-4, -5, -6).

Таким чином, здійснення атопічних реакцій відбувається в результаті переважної активації Т-хелперів 2-го типу і на тлі високого вмісту ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6. Ці дані можна використовувати для діагностики атопічних реакцій, хоча вони є недостатньо специфічними, так як переважна активація Т-хелперів 2-го типу відбувається і при нормальному протіканні імунної відповіді.

Цитотоксичними реакціями - називаються реакції пошкодження, здійснені за посередництва IgG і / або IgM, а також комплементу. Антигенами в подібних реакціях є компоненти цитолемми клітин чи речовини, фіксовані на її поверхні (бактеріальні токсини, лікарняні препарати та ін.). Такі реакції можуть бути фізіологічно патологічними. У нормі цитотоксичні реакції приймають участь у забезпеченні звичайних імунних реакцій, наприклад проти внутрішньоклітинних мікробів, гельмінтів. Однак при появі в організмі чужорідних (при гемотрансфузії, трансплантації органів і тканин) або генетично змінених власних клітин (приєднання ліків, екологічних забруднювачів) цей захисний механізм стає патологічним і реакція з імунної переходить в розряд імунопатологічних.

Механізм. Ефекторним механізмом цитотоксичних реакцій частіше за все являється система комплементу. Антитіла взаємодіють з специфічними антигенами, що містяться на мембранах клітин. При цьому Fc-фрагменти залишаються вільними і здатні активувати систему комплементу класичним шляхом. В результаті цього утворюються цитотоксичні мембран атакуючі комплекси (C6-C7-C8-C9), що руйнують клітину-мішень за механізмом осмотичного лізису.

Особливістю цього типу реакцій є локалізація патологічного процесу (цитолізу) в певному органі-мішені. При цьому за межі зруйнованих клітин виходять лізосомальні і цитоплазматичні ферменти (протеази, фосфоліпази, гідролази і ін.), А також вивільняються медіатори запалення - фактор

активації тромбоцитів, кініни, ейкозаноїди (лейкотрієни, простагландини). Синтез прозапальних речовин являється своєрідною реакцією клітини на пошкодження. Таким чином, поряд з прямою цитотоксичною дією комплементу і фагоцитів ураження тканин пов'язано з дією агресивних ферментів і медіаторів запалення.

Питання для самоконтролю:

1. Дайте визначення поняттю «алергія»; які її стадії виділяють?
2. Що таке «атопічні реакції» та яка їх суть?
3. Який механізм «цитотоксичних реакцій»?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

Тема: Імунологія пухлин

Одна з найважливіших проблем імунології - **імуноонкологія**. Відомо, що в разі пригнічення імунної системи ймовірність виникнення раку збільшується в сотні і тисячі разів. Підраховано, що при відносному благополуччі щоденно в організмі утворюється близько 10 мільйонів мутантних клітин. Мутагенез значно зростає під впливом багатьох несприятливих факторів. Так, цитостатики пригнічують активність природних кілерів (ПК), а іонізуюче випромінювання та токсичні хімічні речовини збільшують кількість мутантних клітин.

В першу чергу необхідно відзначити, що імунна система тим або іншим чином завжди реагує на появу пухлинної тканини. Доказом цього є наступні факти:

- моноклеарна клітинна інфільтрація пухлин;
- продукція антитіл і поява цитотоксичних Т-лімфоцитів;
- позитивні шкірні тести на введення екстрактів з пухлинних клітин у онкохворих;
- тривалий розвиток пухлин (пухлини-свідки);
- випадки спонтанної регресії пухлин;
- активація ПК і макрофагів

На тлі «позитивної» імунної відповіді, який спрямований проти пухлини, на певному етапі розвитку пухлинними клітинами починають здійснюватися механізми захисту. Малігнізовані клітини виділяють речовини, що індукують розвиток «негативних» імунних реакцій, які порушують роботу імунної системи організму-господаря.

Всі пухлини можна умовно розділити на три групи:

1. Високоімунночутливі пухлини (наприклад, меланома, рак нирки сечового міхура).
2. Середньоімунночутливі пухлини (зокрема, рак товстої кишки лімфоми).
3. Низькоімунночутливі пухлини (наприклад, рак молочної залози, рак легень).

Пухлина формується і росте в умовах одночасного розгортання протилежно спрямованих реакцій. Динаміка пухлинного росту визначається рівновагою між факторами імунного нагляду і пробластонними факторами, які сприяють зростанню пухлин.

Агенти, які викликають утворення будь-яких пухлин, називаються **онкогенами**. Онкогени, що обумовлюють злоякісну трансформацію, отримали назву канцерогенів.

Прийнято виділяти 4 групи онкогенів:

1. Хімічні:

а) **канцерогенні речовини** - сполуки, які достовірно викликають утворення пухлини або принаймні збільшення частоти виникнення раку:

- викликають або зміни в ДНК - пошкодження пуринових і піримідинових основ, розриви полінуклеотидних ланцюгів і утворення перехресних зв'язків між ними, або індукують хромосомні аберації (зокрема, розподілі хромосом);

- діє епігенетично, викликаючи зміни в білках, регулюючих зростання клітини, без порушень в геномі;

- діють синергічно з вірусами (Дерепресія онкогенів) чи служать промоторами для канцерогенних речовин;

б) харчові онкогени;

в) онкогени-гормони: • естрогени; • глюкокортикоїди.

2. Фізичні (різні види випромінювання, що призводять до розвитку пухлин в результаті прямого впливу на ДНК або за допомогою активації клітинних онкогенів): а) ультрафіолетове випромінювання; б) рентгенівське випромінювання; в) випромінювання радіоізотопів; г) радіоактивне забруднення місцевості, що приводить до внутрішнього опромінення .

3. Вірусні: а) онкогенні РНК-віруси: ретровіруси (онкорнавіруси); б) онкогенні ДНК-віруси (віруси папіломи, вірус гепатиту В) .

4. Генетичні: в основному генетична схильність до розвитку новоутворень пов'язана зі спадковою втратою одного або декількох генів супресії пухлини

Теорії розвитку пухлин

Сьогодні існують дві основні теорії, що пояснюють виникнення новоутворень - теорія моноклонального походження та теорія «пухлинного поля».

Теорія моноклонального походження, відповідно до цієї теорії первинний канцерогенний агент викликає мутацію лише однієї клітини. При діленні формується пухлинний клон, який і є новоутворенням. Доведено, що при прогресуванні пухлини з початкового клону можуть розвиватися субклони з певними відмінностями. Це відбувається в результаті додаткових генетичних змін, які виникають на будь-яких етапах розвитку пухлини (так звані багаторазові поштовхи) .

Теорія «пухлинного поля». Канцерогенний агент, впливаючи на більшу кількість подібних клітин, може викликати утворення поля потенційно неопластичних клітин. Надалі новоутворення розвивається в результаті розмноження тієї чи іншої кількості клітин всередині цього поля. В результаті виникає кілька різних новоутворень, кожне з яких виникає з певного клонального попередника. Утворення пухлинного поля може бути розцінено як перший з кількох послідовних етапів, що призводять до розвитку пухлини («багаторазові поштовхи»).

Для пояснення механізмів виникнення як пухлинного моноклона, так і «пухлинного поля» в даний час запропоновано ряд концепцій.

Концепція генетичних мутацій .

Порушення в геномі, обумовленні спадковістю, спонтанним дією зовнішніх агентів або мутаціями, можуть викликати неоплазію, якщо

пошкоджуються гени, що регулюють ріст та розмноження клітини. Пухлинна трансформація відбувається в результаті активації (або дерепресії) специфічних послідовностей ДНК, які відомі як ріст-регулюючі гени, або **протоонкогени**. Ці гени кодують ряд факторів росту і рецепторів до них. Активація цих генів відбувається кількома шляхами: мутацією власне протоонкогена; транслокацією протоонкогена в більш активну частину генома, де регулюючи вплив активує його; вбудовування ДНК онкогенного вірусу в активну частина генома; ампліфікацією (багаторазовим копіюванням прото-онкогена); дерепресія (втратою супресивного контролю над власними протоонкогенами). Постійно функціонально активний протоонкоген, що утворюється в результаті зазначених механізмів, називається клітинним онкогеном. Збільшення продукції стимулюючих факторів росту і їх рецепторів, зменшення секреції пригнічують ріст факторів чи продукція функціонально неповноцінних пригнічують чинників призводить до некерованого поділу клітин. Таким чином, на молекулярному рівні неоплазия є результатом порушень функції регулюючих ріст генів (протоонкогени і супресивні гени, керуючих активністю перших) .

Концепція вірусних онкогенів.

Деякі РНК-віруси (ретровіруси) містять послідовності нуклеотидів, які є комплементарними протоонкогенами людини. При активації зворотної транскриптази на вірусній РНК синтезується ДНК, де містяться ідентичні протоонкогенам послідовності. Ці послідовності названі вірусними онкогенами (v-*onc*). Припускають, що онкогенні РНК-віруси набувають v-*onc* за рахунок вбудовування протоонкогена клітини попереднього господаря в вірусну нуклеїнову кислоту шляхом рекомбінації.

Онкогени і антионкогени

Важно розуміти, що досить активації лише одного протоонкогена, щоб забезпечити можливість автономного зростання, властивого пухлинним клітинам.

Сьогодні виділяють такі основні механізми виникнення онкогенів:

1. Вбудовування вірусного онкогена в геном клітини, наприклад ретровіруси містять онкогени *src*, *myc*, *ras* і *erb*.

2. Активація клітинного онкогена вбудованим вірусом, який сам не містить онкогенів. Пухлинна трансформація пов'язана з виключенням супресивних впливів на протоонкоген в зв'язку зі зміною просторового розміщення генів.

3. Транслокація генетичного матеріалу, що призводить до активації онкогена або утворення нового онкогена з фрагментів різних хромосом. У першому випадку транслокований онкоген виходить з-під контролю супресивного гена і підпадає під вплив постійно працюючого регуляторного гена в новому локусі. У другому випадку в місці розриву виходить новий химерний ген, який призводить до синтезу химерного білка.

4. Ампліфікація - збільшення числа копій протоонкогена. При цьому наявні супресорні гени не в змозі контролювати всі утворені копії (зокрема, збільшення кількості копій гена тус при пухлинах нервової системи) .

5. Мутація протоонкогена, яка веде до синтезу мутантного онкобілка. Утворений внаслідок мутації новий онкоген позбавлений регулюючих впливів, так як нечутливий до них.

6. Інактивація гена-супресора пухлинного росту, що обумовлює постійну активність нормального протоонкогена.

В останні роки відкрито важлива ланка канцерогенезу - порушення в системі генів-супресорів пухлин, які пригнічують активність протоонкогенів. Головний представник генів-супресорів - ген, що контролює синтез белка р53 (буква р в назві походить від англійського protein, а цифра 53 – вказує на молекулярну масу білка, яка становить 53000 дальтон). Синтезований білок р53 контролює активність протоонкогенів, дозволяючи проявлятися тільки в строго певні періоди життя клітини, в основному при необхідності поділу. р53 також контролює апоптоз, направляючи клітину на самогубство в разі пошкодження її генетичного апарату. За рахунок цього р53 стабілізує генетичну структуру клітини, запобігаючи утворення шкідливих мутацій, в тому числі - пухлинонебезпечних. Онкогени деяких вірусів викликають зв'язування р53 і інактивацію його, що призводить до активації протоонкогенів і скасування апоптозу, а значить, до накопичення мутацій в клітині. Це створює субстрат не тільки для виникнення неоплазії, а й для пухлинної прогресії. Типи онкогенів і антионкогенів наведені на рис. 7.

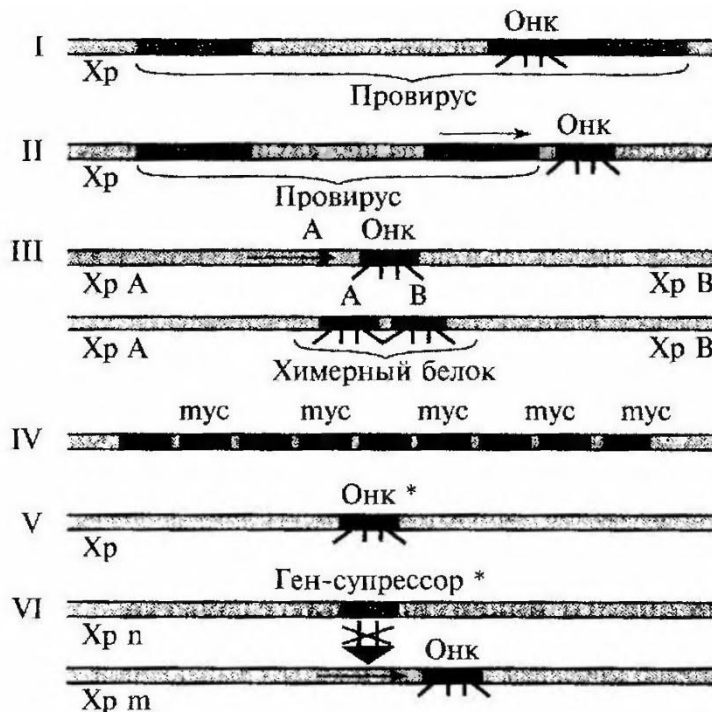


Рис. 7. Основні генетичні механізми злоякісної трансформації клітини

Особливості поверхневих структур пухлинних клітин

Онкофетальні антигени. На поверхні всіх клітин знаходяться антигени, які виконують різноманітні функції, необхідні для забезпечення життєдіяльності. Кілька антигенів, пов'язаних з людськими пухлинами, присутні в фетальних тканинах, але відсутні в відповідних тканинах дорослого. Це онкофетальні антигени. Їм належить дуже важлива роль в пухлинному рості. У фетальних тканинах ці антигени присутні у вигляді поліпептидів, які забезпечують клітинам особливий ефективний метаболізм.

Специфічні пухлинні антигени. Поки що відомо зовсім небагато таких антигенів, які б були присутні на пухлинних клітинах і ніколи не утворювались на нормальних. Такі антигени називаються специфічними. Саме вони забезпечують розвиток ефективної імунної відповіді. Найбільш вивченими є пухлинні антигени генетичних родин MAGE і V AGE.

Розчинні пухлинні антигени. Деякі антигени пухлини здатні залишати цитолему її клітин і циркулювати у внутрішньому середовищі у вигляді розчинних форм. Такі антигени «відволікають» імунну систему, сприяючи невинуватому використанню імунних факторів.

Глікопротеїн що виводить токсини. Глікопротеїн Р (від англ. Permeability - проникність) знаходиться в плазматичній мембрані і служить для видалення з клітин метаболічних токсинів. Завдяки інтенсивному синтезу цього глікопротеїну в пухлинних клітинах розвивається феномен множинної лікарської стійкості. Клітини злоякісних новоутворень швидко і ефективно виводять хіміотерапевтичні кошти, які застосовуються для їх ушкодження.

Вуглеводи, в структурі вуглеводів, як і в структурі нуклеїнових кислоти білків, закладена важлива біологічна інформація. Вуглеводи мають найбільшу інформаційну ємність, оскільки для них характерно найбільша структурна різноманітність. З двох ідентичних моносахаридів можуть утворитися одинадцять різних дисахаридів, тоді як дві амінокислоти дають лише один дипептид. Зчитування вуглеводних «слів» засноване на варіабельності вуглеводних субодиниць, відмінність у зв'язках між ними, наявності точок розходження в молекулі. Так, набір вуглеводів ракових клітин різко відрізняється від такого у нормальних клітин і є маркером пухлини.

Лектини також відіграють певну роль в зростанні пухлини. Вони зв'язуються з поверхневими вуглеводами ракових клітин і маскують пухлину від імунної системи, з іншого боку, блокада поверхневих структур робить неможливим взаємодію з тканинним матриксом, тому погіршуються умови для метастазування.

Питання для самоконтролю:

1. Які існують типи пухлин?
2. На які групи поділяють онкогени?
3. Які існують теорії виникнення новоутворень?
4. Опишіть механізм виникнення онкогенів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №12

Тема: Імунодіагностика пухлин

Суттєвим досягненням сучасної онкології є **впровадження практики методів імунодіагностики пухлин**, до яких належать **серологічне виявлення розчинних пухлиноспецифічних антигенів в сировотці крові і візуалізація пухлин шляхом введення мічених радіоізотопами специфічних моноклональних антитіл**.

Для виявлення розчинних пухлиноспецифічних антигенів використовують діагностичні сироватки зі специфічних антитіл. Перевагою методу є можливість виявлення пухлини ще на доклінічному етапі її розвитку. Однак він має і суттєвий недолік, пов'язаний неможливістю визначення точного розташування пухлини, її розмірів та форми. Наприклад, виявлення раково-ембріонального антигену дозволяє запідозрити наявність раку товстої кишки, однак не дає інформації про те, в якому саме відділі міститься пухлина. Ця проблема вирішується за допомогою методу візуалізації неоплазії за рахунок специфічних моноклональних антитіл, мічених радіоізотопами. Введені антитіла розпізнають антигени пухлини, завдяки чому вибірково накопичуються в вогнищі зростання неоплазії. Власне цей ефект досягається шляхом застосування методів сцинтиграфії або сканування, які реєструють випромінювання радіоізоотопів, фіксованих до антитіл.

Сучасна імунотерапія включає широкий спектр засобів, основні групи яких представлені мікроорганізмами і їх компонентами, препаратами тимуса, препаратами цитокінів, полісахариди і пептидами. Все ширше впроваджуються методи генної інженерії.

Моноклональні антитіла стрімко увійшли в імунологію наприкінці 70-х років минулого століття. Припускали, що розроблена технологія отримання імунотоксинів для прямого і непрямого впливу на пухлину чи для активації Т-кілерів повинна забезпечити специфічну імунотерапію пухлин на основі антитіл. Однак лише деякі антигени клітинної поверхні пухлин можуть служити більш-менш специфічними мішенями для антитіл. До них відносяться, наприклад, **раково-ембріональний антиген** при пухлинах товстої кишки **або ідіотипові антигенні детермінанти** імуноглобулінів при В-клітинних лімфомах. Тому застосування моноклональних антитіл і антитіл-імунотоксинів в імунотерапії рака поки що дуже обмежена.

Імунотерапія пухлин на основі Т-клітинної ланки отримала потужний стимул до розвитку в роботах С. Розенберга, який довів терапевтичний ефект ростового фактора Т-клітин - інтерлейкіну-2 при метастатичних меланомах та інших пухлинах. Він використовував **Т-лімфоцити, інфільтруючі пухлину** активуючи їх ІЛ-2, і разом з цим цитокіном вводив хворим. Підходи, запропоновані Розенбергом, використовують в клінічних цілях, хоча і дуже обмежено, в зв'язку з високою токсичністю ростового фактора і непередбачуваністю ефекту в конкретних

ситуаціях. Однак ці роботи стали початком застосування цитокінів з терапевтичною метою, а також пошуків протиракових вакцин на основі цитокінів.

Цитокіноterapia пухлин. У сучасній онкологічній практиці основним методом імунотерапії є цитокіноterapia із застосуванням препаратів інтерферону (ІФН), інтерлейкіна-2 та ФНП-а. Клінічна ефективність застосування препаратів ІФН пояснюється їх імунокоригуючою дією. Так, всі використовувані для лікування препарати ІФН (нативні і рекомбінантні) підвищують цитотоксичну активність природних кілерів, а також збільшують експресію молекул НLА I класу на поверхні пухлинних клітин. Крім того, є дані, що інтерферони здатні підвищувати готовність клітин новоутворень до апоптозу.

Крім інтерферонів, для імунотерапії пухлин можна використовувати препарати інтерлейкіну-2. Як відомо, цей цитокін активує клітинну ланку імунітету, що підвищує протипухлинний імунний захист. У літературі є повідомлення про успішне застосування ІЛ-2 при лікуванні раку нирки, меланоми і деяких інших пухлин. При цьому препарат застосовується як окремо, так і в комбінації з **лімфокинактивованими кіллерами** і з **лімфоцитами, інфільтруючими пухлини** (ТІ L), активованими in vitro ІЛ-2. Є повідомлення про спільне застосування препаратів ІЛ-2 и а/в-ІФН у хворих з пухлинами. Крім цього відкриття ІЛ-2, здатного в присутності антигену підтримувати зростання і розмноження антигенспецифічних Т-клітинних клонів, дало дослідникам об'єктивний тест для визначення пухлинних антигенів, які здатні викликати специфічний Т-клітинний імунітет. Механізм дії цитокіну пов'язаний з індукцією апоптозу клітин пухлини шляхом впливу на специфічний рецептор.

Генная терапия пухлин. Останнім часом великі успіхи генної інженерії привели до розвитку нового напрямку - **генної терапії пухлин**. В основі її лежить створення **протиракових вакцин**. Вони можуть бути отримані з допомогою введення в геном клітини пухлини нових генів: **генів протипухлинних цитокінів та їх рецепторів, пухлиноасоційованих антигенів, суїцидних генів, чужорідних антигенів, вірусів**.

Одним з основних напрямків генної терапії є **створення вакцин**, в яких пухлинні клітини самі продукують цитокіни, сприяючи пригніченню пухлинного росту. Таким чином, створюється висока концентрація протективного цитокіну в зоні пухлини і значно зменшується токсичність останніх для організму. За останні роки з'явилися десятки робіт, де наводяться експериментальні дані про протипухлинну дію рекомбінантів, які продукують практично всі цитокіни.

Перспективним підходом до створення протиракових вакцин являється отримання **гібридних білків** що складаються з пухлиноасоційованих антигенів і цитокінів. Відомо, що імуногенність пухлиноасоційованих антигенів низька, так як це в основному нормальні білки, продукція яких лише збільшується в пухлинних клітинах. Цитокіни можуть підсилювати

імуногенність останніх і підвищувати чутливість пухлинних клітин цитотоксичної дії Т-кіллерів.

Іншим напрямком є використання так званих **суїцидних генів**, наприклад гена тимідинкінази вірусу простого герпесу. Завдяки ньому пухлинні клітини набувають здатність фосфорилувати ациклічний нуклеозид ганцикловир, який використовується для лікування герпесних інфекцій, внаслідок чого ці клітини гинуть під дією протигерпесного препарату, до якого в звичайних умовах не чутливий в разі коли власні антигени пухлини мають низьку імуногенність.

Є попередні дані про ефективність препарату, що містить імунодомінантний пептид меланомного антигену і цитокіни. На цей антиген може розвиватися досить ефективна імунна відповідь. Таким чином, ця терапія дозволяє посилити розпізнавання тих пухлин, які продукують специфічні антигени в занадто малих кількостях. Так, показано, що застосування імунодомінантного пептиду меланомного антигену при імунізації онкологічних хворих значно збільшує кількість протипухлинних цитотоксичних клітин серед циркулюючих лімфоцитів. Важливою є проблема способу внесення бажаних генів в геном пухлинної клітини. Відомо, що певні віруси здатні ефективно вбудовувати власну ДНК в геном клітини. Якщо до нуклеїнової кислоти такого вірусу приєднати бажану полінуклеотидну послідовність то він внесе її до складу генома ураженої клітини під час інтеграції з ДНК клітини-господаря. Нуклеїнова кислота вірусу, за допомогою якої здійснюється внесення додаткової генетичної інформації у визначену біологічну систему, називається вектором. Застосування вакцини, в складі якої за допомогою векторів аденовірусу або вірусу вітряної оспи в пухлинні клітини вводили ген меланомного антигену разом з геном інтерлейкіна-12, дозволило в 40% випадків отримати позитивний клінічний ефект у хворих з генералізованою меланою. Результат терапії пов'язаний з посиленням експресії специфічного пухлинного антигену, на якому розвивається ефективна імунна відповідь. Цей напрямок вважається найбільш перспективним в імунотерапії пухлин.

На сьогодні одним з найбільш перспективних напрямків імунотерапії пухлин є використання вакцин, що складаються з антигенрепрезентуючих клітин (найчастіше - дендритних), навантажених специфічним антигеном і експресують достатній рівень ко-стимулюючих молекул. Такі дендритні клітини називають АПК із заданими властивостями.

Імунопрофілактика пухлин

Загальний принцип імунопрофілактики пухлин заснований на посиленні імунного нагляду. Відповідно до концепції, запропонованої Ф. Бере, контроль за пухлинами повинні здійснювати фактори імунітету. Однак низька частота виникнення пухлин у безтимусних мишей, що не здатні утворювати імунітет, навпаки, різко посилила увагу до чинників вродженої резистентності. Такий підхід отримав додаткові стимули в експериментах. Вони показали, що спонтанні пухлини, на відміну від вірус-індукованих і

новоутворень, викликаних хімічними канцерогенами, є або низькоімуногенними, або зовсім не індукують розвиток імунних реакцій. У той же час досліди на тваринах з пригніченою природною резистентністю показали значну роль цих факторів в контролі над малими популяціями пухлинних клітин.

Конкретні механізми порушень, що ведуть до виникнення пухлин, пока що вивчені недостатньо. Така ситуація значно ускладнює проведення ціленаправної імунопрофілактики новоутворень. Однак у випадку коли розвиток пухлини включає етап вірусної інфекції, проведення імунопрофілактики цілком реально. Воно полягає в попередженні зараження тим або іншим вірусом або в лікуванні наявної вірусної інфекції. Сьогодні відомо кілька типів пухлин людини, виникнення яких пов'язано з вірусами. Необхідно підкреслити, що мова ідетне про стовідсоткову і однозначну залежність «вірус-рак», а про формування груп високого ризику виникнення певної форми раку серед людей, заражених вірусом.

Противірусна вакцинація в групах ризику вже дає відчутні результати, наприклад в випадку вірусу гепатиту В (HBV). Цей вірус поширений територіях, де проживає величезна група осіб з високим ризиком виникнення раку печінки (Південно-Східна Азія, Африка, Аляска). Відомо, що носії вірусу гепатиту В - це група високого ризику виникнення первинного раку печінки. Крім того, якщо носій вірусу поєднується зі споживанням афлатоксина, котрий є сильним печінковим канцерогеном (міститься в арахісі, зараженому цвілевим грибком *Asperg.Flavus*), то ризик виникнення пухлини зростає в десятки раз. Слід зазначити, що даний вірус передається від матерів грудним дітям при пологах і в перші дні вигодовування. Саме вакцинація проти вірусу гепатита покликана перервати перехід інфекції від матері до потомства. Розроблені ефективні вакцини проти вірусу гепатиту В. Уже більше 10 років ВООЗ проводить широку програму вакцинації немовлят проти HBV в Південно-Східній Азії, Гамбії, серед ескімосів Аляски, так як рак печінки в цих районах займає одне з перших місць в світі по частоті. Можна очікувати, що програма вакцинації проти вірусу гепатиту В допоможе знизити захворюваність раком не менш, ніж програма боротьби з курінням.

В останнє десятиліття отримані докази зв'язку **вірусів папіломи (HP)** 16 і 18 типів з раком шийки матки. У цьому випадку, як і при гепатиті, мова йде про носія HP як про групу високого ризику виникнення раку. Очевидно, що «зупинка» цього вірусу і, можливо, його ерадикація дозволить знизити захворюваність на рак шийки матки. В даний час розроблені і започатковані анти-HP вакцини для профілактики раку шийки матки. Хоча вакцинація проти вірусу Т-клітинної лімфоми людини (HTLV-I) в принципі можлива, через обмежене поширення таких пухлин вона зараз не проводиться. Швидше за все, вакцинацію використовуватимуть тільки в районах, ендемічних по цьому вірусу. В останній час велика увага прикута до вірусів групи герпесу. Добре вивчена і доведена роль **вірусу Епштейна-Барр (EBV)** як ко-фактора в розвитку онкопатології. В етіології африканської лімфоми

Беркітга і карціноми носоглотки, які поширені в Південно-Східній Азії. Також цей вірус пов'язаний з широко відомою лімфою Ходжкіна, або лімфогранулематозом. Очевидно, що вакцинація проти EBV - актуальна проблема, тому зараз ведуться роботи зі створення відповідної вакцини. Нещодавно з групи вірусів герпесу виділено ще один представник, асоційований з саркомою Капоша (KSHV). Його специфіка полягає в тому, що він активується виключно у хворих з імунодефіцитом (зокрема, при СНІДі). Це, звичайно, значно ускладнює вакцинацію проти герпеса KSHV, а в групі хворих на СНІД вона взагалі недоцільна.

Питання для самоконтролю:

1. Яка роль моноклональних антитіл в імунодіагностиці пухлин?
2. Опишіть суть генної терапії пухлин?
3. Які основні принципи імунопрофілактики пухлин?

ЛІТЕРАТУРА

1. Англо-російсько-український біологічний словник в 3-х томах / [Горбатенко І.Ю., Лавриненко Ю.О.]. – Херсон: Айланд, 1998-2001.
2. Апоптоз – запрограмована смерть клітини. *Curriculum vitae* клітини – життєвий шлях клітини / [Горбатенко І.Ю., Гиль М.І., Денисюк Л.І.]. – Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. – 154 с.
3. Біологічна хімія / [Губській Ю.І.]. – Київ-Тернопіль : «Укрмедкнига», 2000. – 508 с.
4. Біотехнологія в тваринництві і генетиці / [Коваленко В.П., Горбатенко І.Ю.]. – К.: Урожай, 1992. – 152 с.
5. Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин / [Горбатенко І.Ю., Гиль М.І., Захаренко М.О., Козир В.С., Галушко І.А., Дехтяр Ю.Ф., Михальська В.М.]. – Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2018. – 600 с.
6. ДНК-аналіз у криміналістиці / [Горбатенко І.Ю.]. – Херсон : Чуєв С.М., 2007. – 124 с.
7. Клиническая иммунология и алергология / [Казмирчук В.Е., Ковальчук Л.В., Мальцев Д.В.]. – К.: Феникс, 2009. – 524 с.

Підписано до друку

Ум.друк.арк.

Тираж пр. Зам. №

Редакційно-видавничий відділ Миколаївського державного аграрного університету

54010 м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Формат

Обл.-вид.арк.

Друк офсетний.