

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ
У ТВАРИННИЦТВІ

*Кафедра гігієни тварин та ветеринарного
забезпечення кінологічної служби НПУ*

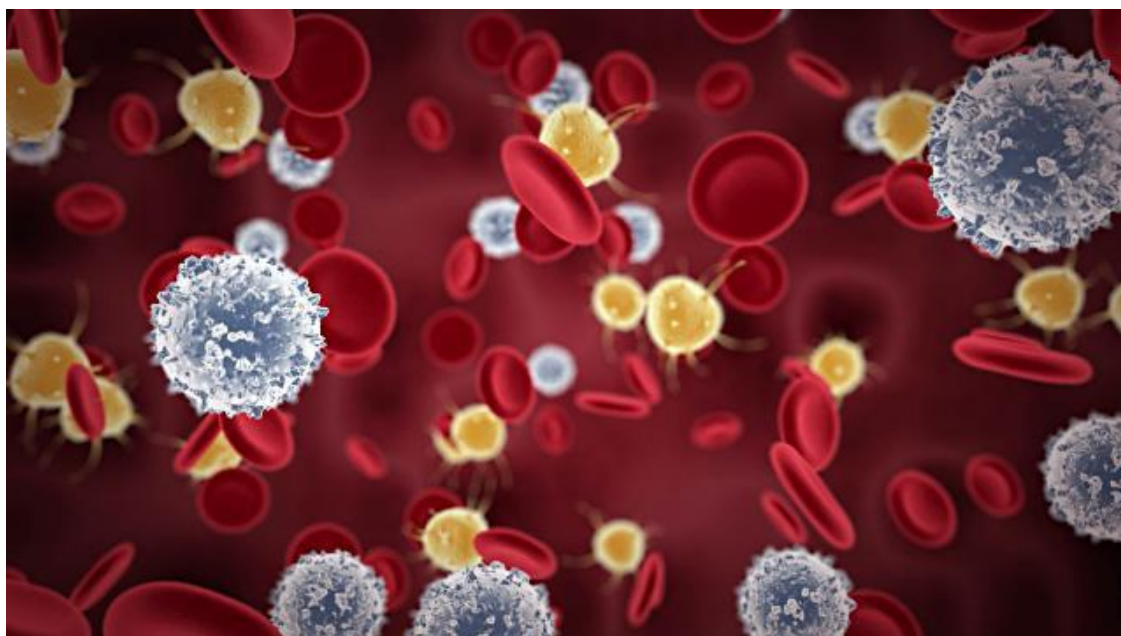
МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для самостійної роботи з дисципліни

«СУЧАСНІ ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ»

для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за
спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»

освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини



м. Кам'янець-Подільський

2023

УДК 619:616.9

Укладач:

Тетяна СУПРОВИЧ,

доктор сільськогосподарських наук, професор; завідувачка кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби НПУ

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»
(Протокол № 10 від 19. 12. 2023 р.)*

Рецензенти:

Олег ВІЩУР,

доктор ветеринарних наук, професор, завідувач лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН, м. Львів.

Юлія ГОРЮК,

доктор ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Методичні рекомендації до практичних занять з дисципліни «Сучасні імунологічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини / Т.М. Супрович. Кам'янець-Подільський, ЗВО ПДУ. 2023. 46 с.

Методичні рекомендації розроблено з метою закріплення теоретичних знань і набуття практичних навичок при визначенні імунного статусу тварин.

© ЗВО ПДУ, 2023

ЗМІСТ

Вступ	4
ТЕМА1. Становлення імунології як науки. Найважливіші досягнення сучасної імунології.....	5
ТЕМА2. Імунно-біологічний статус організму тварин. Фактори природнього і адаптивного імунітету	11
ТЕМА3. Антигени, їх властивості. Ефекторні функції, опосередковані антитілами.....	17
ТЕМА 4. Біологічна роль системи гістосумісності. Процесинг і презентація антигенів	25
ТЕМА 5. Імунна відповідь та механізм кооперації імунокомпетентних клітин.....	32
ТЕМА 6. Основні форми порушення імунологічної реактивності. Імунодефіцити.....	36
ТЕМА 7. Імунопатологія. Імунологічні методи досліджень.....	40
Список використаних джерел.....	46

ВСТУП

Імунна система – це комплекс біологічних механізмів організму, який спрямований на збереження структурної і функціональної генетичної рівноваги. Імунна система – це сукупність органів, тканин і клітин, що забезпечують генетичну постійність організму. Вона утворює другу лінію захисту від усього чужорідного після факторів неспецифічного захисту. Імунна система є своєрідним «відділом технічного контролю», який слідкує за тим, щоб в організмі зберігалися тільки макромолекули і клітини, які відповідають заданій генетичній програмі.

Біологічна мета імунних реакцій – підтримання індивідуальності конкретного організму на рівні макромолекул, захист його від різних чужорідних агентів.

Розглянуті у методичній розробці теми допоможуть здобувачам розкрити принципи та особливості гуморальних і клітинних факторів імунітету – основного механізму забезпечення захисту організму від інфекційних агентів, аутоантигенів, власних клітин із зміненою генетичною інформацією та провести інтерпретацію імунного статусу організму тварин.

Методичні рекомендації розроблено згідно робочої програми з дисципліни «Сучасні імунологічні методи досліджень у ветеринарній медицині» для здобувачів вищої освіти III (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина», освітня кваліфікація: Доктор філософії з ветеринарної медицини

ТЕМА1. СТАНОВЛЕННЯ ІМУНОЛОГІЇ ЯК НАУКИ. НАЙВАЖЛИВІШІ ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ ІМУНОЛОГІЇ

Анотація. В представленому розділі розглянуті питання: ранні теорії набутого імунітету, основні досягнення імунології в історичному аспекті, сучасні напрямки наукової та практичної діяльності у галузі імунології в Україні. Подано інформацію про пріони та пріонні інфекції.

Імунітет (від лат. *immunitas* - «позбавлення», «звільнення від чогонебудь») - це несприйнятливість організму до різних інфекційних агентів, а також продуктів їх життєдіяльності, речовин і тканин, які володіють чужорідними антигенними властивостями (наприклад, до отрут тваринного та рослинного походження).

Одного разу перехворівши, наш організм запам'ятовує збудника хвороби, тому наступного разу захворювання протікає швидше і без ускладнень. Але часто після тривалих захворювань, оперативних втручань, при несприятливій екологічній обстановці і в стані стресу імунна система може давати збої. Традиційно під поняттям імунітету розуміли несприйнятливість багатоклітинного організму до інфекційних захворювань. Це властивість забезпечується багатьма системами живого організму. Наприклад, шкіра, епітелій дихальних шляхів, слизова оболонка травного каналу завдяки їх механічній цілісності є непроникними для мікроорганізмів. Захисну функцію виконують також хімічно активні середовища - соляна кислота шлункового соку, нормальна мікрофлора кишок. Однак головну роль у захисті макроорганізму від інфекції відіграє система крові. Ще в минулому столітті було відкрито явище фагоцитозу і створена клітинна теорія імунітету (І. Мечников). Тоді ж були виявлені протимікробні властивості плазми крові, що дало початок гуморальній теорії імунітету (П. Ерліх). Сучасна імунологія визнає рівноправне існування обох механізмів імунітету. Кожен з них може бути як специфічним, так і неспецифічним.

Все сказане вище про імунітет і його механізми призвело до перегляду питання про роль імунітету в організмі. Захисна роль імунітету по відношенню до патогенних мікроорганізмів і їх токсинів є безсумнівною. Однак як пояснити відторгнення пересаджених гомологічних органів або еритроцитів несумісної групи крові того ж виду? Адже ці органи і клітини не містять токсинів, не несуть загрози макроорганізму, навпаки, вони рятують цей організм від загибелі. Відповідь на ці питання дає сучасна імунологія, яка за останні десятиліття радикально змінила свій зміст і розширила сферу інтересів. *В даний час поняття імунітету означає здатність організму розпізнавати і знищувати чуже.* При цьому під чужим розуміють не тільки патогенні мікроорганізми, токсини, перелиту кров або трансплантат, а й мутантні клітини свого ж організму. Як би рідко не траплялися спонтанні мутації, макроорганізм, який складається з 10^{13}

клітин, значна частина яких постійно ділиться, може мати близько 10 млн мутантних клітин зі зміненим геномом. Деякі з них виявляються життєздатними і в процесі подальшого поділу утворюють тканину зі зміненою, невластивою організму функцією, що може привести до загибелі макроорганізму.

Таким чином, **імунітет - це система захисних реакцій організму, спрямованих на підтримку генетичної сталості індивідуума**. Що стосується трансплантаційного імунітету, то він є зворотним і вкрай небажаним аспектом цього процесу, з яким доводиться боротися заради порятунку життя людини.

Імунологія – порівняно молода наука, їй всього близько 100 років. У той же час захист від інфекції за допомогою імунізації відомий уже багато сотень років; йдеться перш за все про емпіричні спроби за допомогою штучно викликаного легкого захворювання запобігти небезпечній хворобі у випадку епідемії. Так, із давніх часів китайці з цією метою втягували у ніс (подібно до нюхання тютюну) висушені та подрібнені шкірочки струпів хворих віспою. Такий метод, названий варіоляцією, довгий час був невідомий у Європі, але отримав популярність в Англії, після того як леді Мері Уортлі Монтегю, дружина британського посла у Константинополі, заразила віспою дитину, яка народилась у неї в Туреччині. За твердженням Вольтера, турки перейняли цей звичай (прищеплювати від віспи) у черкесів; ті вводили дітям вміст віспенних пустул спеціально для того, щоб зберегти здоров'я і красу дівчат, котрих вони дорого продавали у Персію і Туреччину.

Однак потім виявилось, що метод варіоляції не такий безпечний, оскільки іноді призводить до захворювання віспою у важкій формі та смерті, а прищеплені самі стають джерелом інфекції. Тому в першій половині XIX століття варіоляція у ряді країн була заборонена. У XVIII столітті в Англії було відомо, що люди, яким доводилося зустрічатися з коров'ячою віспою, рідко хворіли натуральною. У 1774 році англійський селянин Бенджамин Джесті, щоб захистити свою дружину від віспи, наніс їй на шкіру передпліччя вміст пустул хворих віспою корів. Едвард Дженнер був першим лікарем, який проводив цілеспрямовані експерименти із зараження коров'ячою віспою для захисту від натуральної. У 1779 році він заснував у Лондоні перший у світі пункт прищеплення від віспи. Це було народженням наукового підходу до застосування активної імунізації і початком розвитку імунології.

Пройшло, однак, близько 100 років, перш ніж Луї Пастер провів першу успішну вакцинацію людини проти сказу. 6 червня 1887 року покусаний скаженою собакою Жозеф Мейстер був прищеплений розробленою Пастером вакциною проти сказу; цей чоловік першим отримав 13 ін'єкцій вакцини і вижив. Пастера можна вважати першим імунологом-експериментатором, якому вдалося створити активний імунітет за допомогою ослаблених збудників проти холери у курей, проти сибірської виразки у домашніх тварин і проти сказу у людини.

До 1900 року було зроблено багато вирішальних відкриттів, які створили міцний науковий фундамент імунології. Ілля Мечников відкрив явище фагоцитозу і ввів поняття “клітинний імунітет”; Еміль фон Берінг разом із Шибасабуро Кітазаро застосували пасивну імунізацію проти дифтерії і правцю.

Імунологія як наука сформувалася лише наприкінці XIX ст. Її засновниками вважають І. І. Мечникова, Л. Пастера (клітинний імунітет), П. Ерліха (гуморальний імунітет), Е. Берінга, Е. Рута ін. Власне із зародження науки імунології пов’язаний імунологічний період в мікробіології. У 1900 р. відкрито групи крові, що відрізняються антигенним складом еритроцитів (К. Ландштайнер). Від 1945 р. почала розвиватися трансплантаційна імунологія (П. Б. Медавар), у витоків якої в Україні стояла член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, проф. К. Ф. Чернушенко, яка в 1968 р. в Києві очолила лабораторію трансплантаційної імунології та разом із співробітниками створила першу в Україні панель типуючих сироваток, необхідних для добору донора-реципієнта при трансплантації органів. Панель згодом використовувалась в Інституті урології при проведенні перших операцій з пересадки нирки. В цей же час були проведені експериментальні дослідження щодо вивчення механізмів реакції відторгнення трансплантатів, методів її діагностики та регуляції.

У другій половині 20 століття обґрунтовано клонально-селекційну теорію імунітету (Ф. Бернет, 1964), досліджено функціонально-анатомічну структуру імунної системи; з’ясовано роль різних субпопуляцій лімфоцитів у реалізації імунної відповіді, розроблено методи їх ідентифікації; відкрито закономірності розвитку лімфоцитів та механізми диверсифікації їх антиген-розпізнавальних рецепторів (С. Тонегава, 1987); встановлено роль антигенів гістосумісності не лише у трансплантаційному імунітеті (Б. Бенцецаф, Ж. Доссе і Дж. Снелл, 1980), а й у регуляції імунних реакцій (П. Догерті і Р. Цинкернагель, 1996); започатковано вивчення механізмів природної толерантності.

К. Ф. Чернушенко, заслужений діяч науки і техніки України, лауреат премій НАН і АМН України ім. І. І. Мечникова, була засновником першої в Україні лабораторії імунології (на базі тоді Інституту фтизіатрії) та стала її завідувачкою в Інституті фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України (1968–2010 рр.). К. Ф. Чернушенко була організатором та першим президентом товариства імунологів та алергологів в Україні, створила школу імунологів в Україні.

Також біля витоків зародження імунології як науки в нашій країні стояла д. м. н., проф. Л. С. Когосова, яка працювала в Київському НДІ туберкульозу і грудної хірургії ім. акад. Ф. Г. Яновського з 1953 р. по 2002 р.

В останні десятиріччя в розвинутих країнах спостерігається прогрес імунології, пов’язаний із використанням методів молекулярної і клітинної біології, структурної біології та генної інженерії для дослідження ролі молекул імунної системи.

Засновником молекулярної імунології в Україні став директор Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна академік НАН України, д. б. н., проф. С. В. Комісаренко

Сучасними напрямками наукової та практичної діяльності у галузі імунології в Україні є:

– дослідження механізмів розвитку вікових змін в системі імунітету, зв'язку вікових змін в імунній та нейроендокринній системах з розвитком вікової патології, дослідження механізмів змін циркадних ритмів та функцій імунної системи при старінні і патології (Інститут геронтології ім. академіка Д. Ф. Чеботарьова НАМН України);

– онкоімунологія, імунологія алергічних захворювань, визначення біологічних особливостей пухлин, їх взаємодії з лімфоцитами, розробка протипухлинних вакцин (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, лабораторія імунології й алергології відділу біології пухлинної клітини — завідувачка д. м. н., проф. Н. М. Бережная, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки);

– дослідження в області нейроімунології: нейрогенний імунодефіцит, імунопатологічні механізми прогресування нервових захворювань, нейроімунні механізми розвитку пострадіаційної енцефалопатії при дії малих доз опромінення, впровадження в практику низки імуномодуляторів і специфічних препаратів для імунотерапії злоякісних пухлин головного мозку (ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України);

– дослідження порушень імунітету у хворих з урологічною патологією, пацієнтів з синдромом підвищеної стомлюваності і з ознаками вторинного імунодефіциту, хворих на хронічний урохламідіоз в лабораторії імунології ДУ «Інститут урології» НАМНУ;

– визначення порушень імунітету у пацієнтів з нефрологічною патологією, вивчення патогенетичних механізмів та розробка ефективних методів лікування з використанням імунотропної терапії при імунозапальних та запальних захворюваннях нирок (ДУ «Інститут нефрології Національної академії медичних наук України»);

– вивчення імунологічних регуляторних механізмів розвитку та підходів до імунотерапії первинних та вторинних системних васкулітів; розробка сучасної концепції клітинних та гуморальних імунологічних регуляторних механізмів розвитку системних васкулітів, функціональних взаємозв'язків ендотеліоцитів з нейтрофілами, моноцитами, лімфоцитами в експерименті та клініці системних васкулітів (Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького);

– вивчення нез'ясованих питань діагностики, лікування та профілактики аутоімунних та алергічних захворювань, фармакогенетики («Українська медична стоматологічна академія» (Полтава),

– дослідження імунопатології туберкульозу і неспецифічних захворювань легень, розробка методів лікування, встановлення особливостей дії та показань

для призначення імуноотропних препаратів, діагностика гіперчутливості та визначення імунологічних механізмів токсикоалергічних реакцій при туберкульозі легень (ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського Національної академії медичних наук України»);

– імунологія слизових оболонок і шкіри, імунодерматологія, алергологія, молекулярна генетика (кафедра клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця);

– визначення вікових особливостей імунного статусу дітей, вплив радіації на організм матері та дитини, імунорегуляція при хронічних соматичних захворюваннях у дітей, імунодефіцити у дітей, імунні механізми спонтанних абортів і порушень імплантації, імунні чинники, невдачі екстракорпорального запліднення, імунні фактори пренатальної діагностики (ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О. М.»);

– фундаментальні дослідження з імунології хронічного запалення в лімфоїдній тканині, моделювання патологічних процесів не тільки для теоретичних узагальнень з патогенезу захворювань, але й для апробації нових лікарських засобів і терапевтичних підходів на етапі доклінічних випробувань («Інститут отоларингології»);

– визначення механізмів та ефектів дії іонізуючого випромінювання, вивчення дозової залежності змін поверхневого фенотипу, ядерних структур і функціональної активності клітин крові при гострій променевої хворобі та при опроміненні; генної регуляції адаптивних реакцій у механізмах радіаційного старіння та клітинної загибелі у віддаленому періоді після опромінення («Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН»);

Саме завдяки зусиллям цих інститутів імунологія стала наукою, яка наприкінці ХХ та початку ХХІ сторіччя вийшла на передову боротьби з різними захворюваннями. Завдяки розумінню і розкриттю механізмів імунітету зараз створюються нові високоточні діагностичні засоби. Нові ефективні таргетні препарати, що точково діють на певні механізми імунної системи, можуть переривати патогенез тяжкої хвороби або, як мінімум, значно послаблювати її прояви. На основі розуміння роботи імунної системи створюються вакцини проти багатьох хвороб, засоби для лікування алергічних захворювань і маса інших імунобіологічних препаратів з різними механізмами дії.

Імунологія стала наукою майбутнього, оскільки вивчає імунітет, який є дуже важливою, незамінною системою організму, що визначає існування людини та всього живого на Землі.

Пріони (англ. *prion* від *protein* - «білок» і *infection* - «інфекція»), слово запропоновано в 1982 році Стенлі Прузінером - особливий клас інфекційних агентів, представлених білками з аномальною третинною структурою, які не містять нуклеїнових кислот.

Через деякий час стало зрозуміло, що пріони - це не нова форма життя, а власні білки людини, що стали патогенними через зміну конформації.

Пріонні захворювання можуть бути викликані різними причинами - від зовнішніх впливів до генетичних змін. Десять років по тому Прузінер випустив солідну підсумкову працю - «Молекулярну біологію пріонних хвороб». Ну а ще через шість років прийшла довгоочікувана Нобелівська премія.

Пріони здатні збільшувати свою чисельність, використовуючи функції живих клітин (в цьому відношенні пріони схожі з вірусами).

Пріон - це білок з аномальною тривимірною (третинною) структурою, здатний каталізувати конформаційне перетворення гомологічного йому нормального клітинного білка в собі подібний (пріон). Як правило, при переході білка в пріонний стан його α -спіралі перетворюються в β -шари.

Пріони, які з'являються в результаті такого переходу, можуть в свою чергу перебудовувати нові молекули білка; таким чином, запускається ланцюгова реакція, в ході якої утворюється величезна кількість неправильно згорнутих молекул білка.

Пріони – єдині відомі інфекційні агенти, розмноження яких відбувається без участі нуклеїнових кислот. Питання про те, чи вважати пріони формою життя, зараз є відкритим

Всі відомі пріони викликають формування амілоїдів - білкових агрегатів, що включають щільно упаковані β -шари. Амілоїди представляють собою фібрили, що ростуть на кінцях, а розрив фібрили призводить до появи чотирьох ростучих кінців. Для розмноження пріона необхідна вихідна наявність нормально укладеного клітинного пріонного білка; організми, у яких відсутня нормальна форма пріонного білка, не страждають пріонними захворюваннями.

Пріонна форма білка надзвичайно стабільна і накопичується в ураженій тканині, викликаючи її пошкодження і, в кінцевому рахунку, відмирання. Стабільність пріонної форми означає, що пріони стійкі до денатурації під дією хімічних і фізичних агентів, тому знищити ці частинки або стримати збільшення їх кількості важко. Пріони існують в декількох формах - штамах, кожен зі злегка відмінною структурою.

Збудник пріонних хвороб - це мутантна (інфекційна) форма звичайного, особливо активно синтезованого в нервовій тканині, пріонного білка ссавців. Перехід звичайної форми білка в патологічну форму, яка схильна до β - агрегації, стійку до дії протеаз і фізичних факторів - виникає або спонтанно, або при контакті з пріонними білками. Але контактувати повинні білки з дуже схожою амінокислотною послідовністю, тому випадки міжвидового зараження нечасті. Що служить проваючим фактором перетворення нормальних білків, що виконують якісь базові і важливі функції в патогенні - поки не відомо (крім мають мутацій в їх генах, звичайно). Пріони викликають захворювання – **трансмисивні губчасті енцефалопатії (ТГЕ)** – у різних ссавців, в тому числі губчасту енцефалопатію великої рогатої худоби («коров'ячий сказ»). У людини пріони викликають хворобу *Крейтцфельдта - Якоба*, синдром *Герстмана* -

Штраусслера - Шейнкера. Всі відомі пріонні захворювання вражають головний мозок і інші нервові тканини, в даний час невиліковні і в кінцевому підсумку смертельні.

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Основні етапи історії імунології.
2. Розвиток імунології на сучасному етапі.
3. Лауреати Нобелівської премії з імунології.
4. Сучасні напрямки наукової та практичної діяльності у галузі імунології в Україні.
5. Що таке пріони?

ТЕМА 2. ІМУННО-БІОЛОГІЧНИЙ СТАТУС ОРГАНІЗМУ ТВАРИН. ФАКТОРИ ПРИРОДНОГО І АДАПТИВНОГО ІМУНІТЕТУ

Анотація. В представленому розділі розглянуті питання про види імунітету, клітини імунної системи, загальні закономірності функціонування імунної системи, імунний статус і його основні характеристики, дослідження імунного статусу.

У сучасній медицині імунологія зайняла значне місце як галузь, що розвивається, і на неї покладають надії лікарі різних спеціальностей.

Порушення розвитку, диференціювання імунокомпетентних клітин, їх функціонування, синтезу їх продуктів або регуляції цих процесів ведуть до порушень імунологічних функцій. Ці порушення можуть залишатися безсимптомними або виявляються клінічно, і по тяжкості клінічні прояви коливаються від м'яких до фатальних. Такі порушення можуть стосуватися основних клітин імунної системи: Т- і В-лімфоцитів, фагоцитів, природних кілерів та їх продуктів: білків системи комплементу, імуноглобулінів, цитокінів.

Значна частина порушень пов'язана з природженими або придбаними дефектами продукції імунокомпетентних клітин або їх функцій. Інші випадки імунодефіцитів пов'язані з малігнізацією імунокомпетентних клітин та їх неконтрольованою проліферацією, надмірним накопиченням їх продуктів. Різноманітними можуть бути клінічні прояви порушень регуляції імунологічних функцій: нерегульованої активації системи комплементу, нерегульованої продукції і рецепції цитокінів.

Імунна система складається з таких органів: кістковий мозок, тимус, селезінка, лімфатичні вузли, скупчення лімфоїдної тканини. Розрізняють

первинні - центральні (кістковий мозок і тимус) і вторинні – периферичні (селезінка, лімфатичні вузли, скупчення лімфоїдної тканини) органи імунної системи. Всі вони взаємозв'язані системою кровообігу, лімфотоку і єдиною системою імунорегуляції.

Імунітет - це еволюційно обумовлена сукупність реакцій взаємодії між системою імунітету і біологічно активними агентами (антигенами), що направлені на збереження фенотипічної постійності внутрішнього середовища (гомеостазу) організму.

Основні функції імунної системи: контроль за антигенним станом внутрішнього середовища організму, захист організму від патогенних мікроорганізмів і протипухлинний нагляд. У виконанні цих функцій беруть участь як механізми неспецифічного захисту, так і специфічні.

Види імунітету

Розрізняють видову (спадкову, уроджену) резистентність і набутий імунітет. Останній може бути декількох видів:

- 1) природний активний, який виникає після перенесеного захворювання;
- 2) природний пасивний, зумовлений надходженням в організм плоду специфічних антитіл через плаценту і з молоком матері;
- 3) штучний активний, який виникає після вакцинації;
- 4) штучний пасивний, який виникає після введення готових антитіл з імунною сироваткою.

Активний імунітет зазвичай зберігається протягом кількох років, а пасивний — протягом декількох тижнів, місяців. Природний (спадковий, видовий, уроджений) імунітет – форма імунітету, яка зумовлена бар'єрними та антимікробними властивостями шкіри та слизових оболонок, конкурентною активністю нормальної мікрофлори тіла, ареаактивністю тканин до дії пошкоджуючих факторів, фагоцитарною реакцією макрофагів та нейтрофілів, природними кілерами, комплементом, лізоцимом, інтерфероном та іншими антимікробними білками.

Характеристика клітин імунної системи

Безпосередніми виконавцями імунних реакцій є лейкоцити або імунокомпетентні клітини. Їх призначення - розпізнавати чужорідні речовини і мікроорганізми, здійснювати боротьбу з ними, а також фіксувати інформацію про них.

Зрілі лейкоцити об'єднують п'ять популяцій клітин:

- 1) лімфоцити (Т-кілери, Т-хелпери, Т-супресори, В-лімфоцити);
- 2) нейтрофіли (паличкаядерні і сегментоядерні);
- 3) еозинофіли;
- 4) базофіли;
- 5) моноцити.

Імунокомпетентні клітини можна виявити практично в будь-якій частині організму, проте сконцентровані вони переважно в місцях свого утворення - первинних і вторинних лімфоїдних органах.

Первинним місцем утворення всіх цих клітин є орган кровотворення - червоний кістковий мозок, де утворюються і проходять повний цикл диференціювання моноцити і всі гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли). Тут же починається диференціювання лімфоцитів. Всі імунні клітини організму утворюються в кістковому мозку від кровотворної поліпотентної стовбурної клітини, яка дає початок двом клітинам-попередникам - загальному мієлоїдному і загальному лімфоїдному попередникам. Клітини набутого імунітету походять від спільного лімфоїдного попередника і, відповідно, називаються лімфоцитами, тоді як клітини вродженого імунітету можуть брати початок від обох попередників.

Нейтрофіли - найчисленніші імунні клітини в крові людини – більшу частину свого життя подорожують по організму. При зустрічі з патогеном (антигеном) вони поглинають і перетравлюють його, але після чого зазвичай гинуть. У момент загибелі нейтрофілів вивільняється вміст знаходяться в них гранул - речовини, що володіють антибіотичну дію, а крім того, розкидається мережу з власної ДНК клітини, в яку потрапляють бактерії, завдяки чому вони стають ще більш помітними для макрофагів.

Еозинофіли, базофіли і тучні клітини виділяють в навколишню тканину вміст своїх гранул - хімічний захист проти великих патогенів, наприклад, глистів. Однак, як це часто буває, ці хімічні речовини можуть зашкодити і клітинам власного організму, тому ці клітини широко відомі не стільки своєю прямою фізіологічною роллю, скільки залученістю в розвиток алергічної реакції.

Крім вищезазначених мієлоїдних клітин, у вродженому імунітеті працюють і клітини лімфоїдного ряду, які так і називаються – лімфоїдні клітини вродженого імунітету. Вони продукують цитокіни і, відповідно, регулюють поведінку інших клітин організму.

Один з типів цих клітин - так звані натуральні кілери (NK-клітини). NK-клітини виділяють білки перфорин і гранзім В. Перший, як впливає з назви, перфорує клітинну мембрану мішені, вбудовуючись в неї, а другий, проникає через ці проломи і запускає смерть клітини, розщеплюючи білки, що її утворюють.

Лімфоцити – головні фігури в імунологічному нагляді. В кістковому мозку попередники лімфоцитів поділяються на дві великі гілки. Одна з них (у ссавців) закінчує свій розвиток в кістковому мозку, а у птахів – у спеціалізованому лімфоїдному органі - бурсі (сумці). Це В-лімфоцити. Після того як В-лімфоцити залишають кістковий мозок, вони короткий час циркулюють в кров'яному руслі, а потім відбувається їх міграція в периферичні органи. Вони ніби поспішають

здійснити своє призначення, оскільки термін життя цих лімфоцитів невеликий - всього 7-10 днів. Різноманітність В-лімфоцитів формується вже під час внутрішньоутробного розвитку, причому кожен з них направлений проти певного антигену.

Інша частина лімфоцитів з кісткового мозку переселяється в тимус, центральний орган імунної системи. Ця гілка - Т-лімфоцити. Після завершення розвитку в тимусі частина зрілих Т-лімфоцитів продовжує знаходитися в мозковому шарі, а частина залишає його. Значна частина Т-лімфоцитів стає Т-кілерами, менша частина виконує регуляторну функцію: Т-хелпери підсилюють імунологічну реактивність, а Т-супресори, навпаки, послаблюють її. Хелпери здатні розпізнавати антиген і активізувати відповідний В-лімфоцит (безпосередньо при контакті або на відстані за допомогою спеціальних речовин - лімфокінів).

Найбільш відомим лімфокіном є інтерферон, який застосовується в медицині при лікуванні вірусних хвороб (наприклад, грипу), але він ефективний лише на початковому етапі виникнення захворювання.

Супресори мають здатність вимикати імунну відповідь, що дуже важливо: якщо імунна система не буде подавлена після знешкодження антигену, складові частини імунітету будуть знищувати власні здорові клітини організму, що призведе до розвитку аутоімунних захворювань. Кілери є головною ланкою клітинного імунітету, так як вони розпізнають антигени і ефективно їх вражають. Вони спроможні знищувати клітин, які вражені вірусними інфекціями, а також пухлинні, старіючі клітин організму, та клітини, які піддалися мутаціям.

Механізми природного імунітету формуються під контролем геному в процесі розвитку організму незалежно від контакту з антигеном. Фактори природного імунітету присутні у всіх особин даного виду з моменту народження протягом всього життя та наділені активністю, але слабкою специфічністю дії. У зв'язку зі вказаними ознаками природний імунітет ще називають спадковим, видовим, неспецифічним. У процесі реалізації природного імунітету численні фактори з неактивних перетворюються в активні або активність їх істотно зростає. Стан природного імунітету вимірюють концентрацією (кількістю) та активністю факторів, що його зумовлюють, наприклад комплементу, лізоциму, фагоцитарної реакції тощо, а також зміною співвідношень між ними.

Видова резистентність до інфекційних захворювань – це генетично зумовлена несприйнятливості одного виду тварин до інфекційних захворювань інших видів. Людина несприйнятлива до чуми свиней і холери курей, до інфекційної анемії коней. Усі тварини, за винятком людини і мавп, не хворіють на сифіліс. В основі видової несприйнятливості лежить біологічна особливість даного виду тварин: температура тіла, відсутність специфічних рецепторів

метаболітів та ін. Резистентність курей до сибірської виразки пояснюється вищою, а жаб – нижчою температурою тіла, ніж оптимум розвитку мікроба. Пацюки не сприйнятливі до дифтерії, а риби і ящірки — до правцевого токсину в зв'язку з відсутністю в клітинах специфічних рецепторів до дифтерійного і правцевого екзотоксину. У плаценті людини, пацюків і кроликів, на відміну від рогатої худоби, відсутній необхідний для розмноження бруцел метаболіт еритритол. Тому в плаценті людини, пацюків і кроликів бруцели у великій кількості не розмножуються.

Набутий імунітет – форма імунітету, яка набувається в процесі індивідуального розвитку організму внаслідок контакту з паразитами та речовинами антигенної природи. Такий імунітет формується на основі закодованої в геномі здатності до імунної відповіді та функціонує в кооперації з природним імунітетом. Фактори набутого імунітету наділені високою активністю та специфічністю дії.

Виділяють такі групи та форми набутого імунітету:

за походженням – природний (виникає внаслідок перенесення природної інфекції (активний) або передачі від матері до плоду готових антитіл (материнський, пасивний) та штучний, що розвивається після введення вакцин (активний), імунних сироваток (пасивний);

за спрямуванням – антитоксичний, антибактеріальний, антивірусний, антигрибковий, антипаразитарний, трансплантаційний;

за механізмом – клітинний та гуморальний,

за охопленням організму – загальний та місцевий;

за зв'язком з індукуючим антигеном – постінфекційний та інфекційний. Антивірусний імунітет – сукупність захисних адаптаційних реакцій та пристосувань, спрямованих на захист організму від пошкоджуючої дії вірусів. Внутріклітинні форми вірусу викликають цитотоксичний варіант клітинної імунної відповіді, який спрямований проти інфікованих вірусом клітин. Позаклітинна форма вірусу індукує гуморальну імунну відповідь. Антитіла, що утворюються внаслідок цього, блокують прикріплення віріонів до мембран сприйнятливих клітин та знижують їх токсичну дію.

Трансплантаційний імунітет – форма імунітету, що індукується антигенами гістосумісності трансплантата і спрямована на видалення або розсмоктування трансплантатів, які містять інший, порівняно з реципієнтом, набір трансплантаційних антигенів. Протікає за типом клітинного імунітету з утворенням Т-лімфоцитівкілерів, що виконують елімінуючу функцію.

Клітинний імунітет – імунітет, основним ефектором якого є сенсibilізовані лімфоцити та лімфокіни, що ними продукуються. У розвитку клітинного імунітету основна роль належить Т-системі лімфоцитів, контролюючим органом є тимус. Оцінку клітинного імунітету проводять постановкою пробіркових і на

живому організмі імунологічних клітинних реакцій, а також визначенням кількості Тлімфоцитів та їх субпопуляцій.

Гуморальний імунітет – імунітет, основним ефектором якого є антитіла. У розвитку гуморального імунітету головна роль належить В-системі лімфоцитів, у контролі за ним – Фабрицієвій сумці у птахів та її аналогу у ссавців. Напруженість вимірюють титром та авідністю антитіл, а також кількістю В-лімфоцитів та їх субпопуляцій.

Загальні закономірності функціонування імунної системи

Порушення механізмів реалізації імунної відповіді призводить до різних патологій імунітету, небезпечних для здоров'я і життя. Найбільш часто зустрічається така форма патології як імунологічна недостатність, або відповідно до загальноприйнятої міжнародної термінології імунодефіцитний стан.

Коротко розглянемо загальні закономірності функціонування імунної системи.

По-перше, ефективність роботи імунної системи заснована на балансі її компонентів. Кожен компонент імунної системи в значній мірі повторює функції інших компонентів. Таким чином, дефект частини компонентів імунної системи часто може бути компенсованим іншими її компонентами.

Тому, якщо у людини є дефект будь-якого імунного компонента, як допоміжний засіб необхідно використовувати препарати, що покращують метаболізм клітин.

По-друге, клітини імунної системи здійснюють свої основні функції в активному стані. Головним стимулом для активізації всіх клітин імунної системи є антиген. Але існують ситуації, коли антиген виступає в ролі переважного фактора. Наприклад, відомий феномен так званих ледачих лейкоцитів, які недостатньо активно реагують на чужорідний субстрат.

По-третє, ступінь активізації імунної системи пов'язаний з рівнем сукупності її компонентів. У здорових людей кількість і інтенсивність взаємозв'язків між компонентами імунної системи зазвичай мінімальні. При виникненні запального процесу під час активної роботи імунної системи їх кількість різко зростає. В разі позитивного результату (після одужання) взаємозв'язок компонентів знову знижується. Хронічний же процес характеризується підтримкою високого рівня сукупності імунних компонентів (в основному в кілька разів більше, ніж у здорових людей), що розцінюється як синдром напруженості імунної системи. Це пояснюється тим, що за даних обставин імунна система продовжує активно боротися з чужорідним агентом, підтримуючи його на певному компенсованому рівні, але не здатна повністю його ліквідувати. Загострення хронічного процесу можна пояснити зривом ефективної роботи імунної системи після тривалого напруження.

Дослідження імунного статусу включає в себе:

- 1) визначення групи крові і резус-фактору;
- 2) загальний аналіз крові з розгорнутою лейкограмою або лейкоцитарною формулою;
- 3) визначення кількості імуноглобулінів;
- 4) дослідження лімфоцитів;
- 5) дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів.

Крім цього, існують два етапи імунологічної діагностики. Перший етап виявляє «грубі» дефекти в імунній системі. Дослідження проводять за допомогою простих, так званих орієнтовних методів. Це тести першого рівня.

Цим методом визначають двадцять показників: кількість лейкоцитів, лімфоцитів, різноманітних підгруп Т-лімфоцитів, рівні імуноглобулінів (Jg) А, М, J, Е, концентрацію циркулюючих імунних комплексів та ін. На цьому етапі враховується кількість клітин, їх відсоткове співвідношення і функціональна активність.

На другому етапі, якщо були виявлені відхилення в орієнтовних тестах проводиться більш ретельний аналіз стану імунітету. Тести другого рівня дозволяють простежити зміни у складі складних речовин, що беруть участь в регуляції імунної відповіді (наприклад, інтерлейкіну), а також кількість клітин, які несуть певний вид імуноглобулінів.

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Клітини імунної системи.
2. Механізми природного імунітету формуються
3. Групи та форми набутого імунітету.
4. Які загальні закономірності функціонування імунної системи?
5. Що включає в себе дослідження імунного статусу?

ТЕМА 3. АНТИГЕНИ, ЇХ ВЛАСТИВОСТІ. ЕФЕКТОРНІ ФУНКЦІЇ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ АНТИТІЛАМИ

Анотація. В представленому розділі розглянуті питання впливу фізичних і хімічних факторів на антигенність, специфічність антигенів; Подано інформацію про пріони та пріонні інфекції.

Вплив фізичних і хімічних факторів на антигенність.

Під дією різних фізичних і хімічних факторів змінюються властивості антигенів. Розщеплення білкових молекул протеазами чи денатурація знижують

або повністю змінюють антигенні властивості білків. Білки повністю втрачають антигенність після тривалої обробки сильним лугом, а рибонуклеаза, пепсин і папаїн – після денатурації сечовиною.

Втрачаючи нативну конформацію, вони не реагують з імунними сироватками, специфічними до відповідних природних молекул. Антигенність білків змінюється під дією високої температури, хімічних реагентів: спиртів, ацетону, ефірів, солей важких металів, лугів і кислот, унаслідок зміни нативної конформаційної структури їх молекули. Так луги, кислоти, спирти, ацетон зумовлюють денатурацію білка, при якій у молекулі зберігаються лише пептидні зв'язки, а інші втрачаються. При цьому порушується природна конформація білкової молекули, що сформувалася завдяки вторинній та третинній структурі. Такі зміни призводять до зміни антигенності.

Антигенність денатурованих білків відрізняються від антигенності нативних. Антитіла до одного денатурованого білка часто взаємодіють з іншим денатурованим білком, навіть тоді, коли ці білки в нативному стані не мають антигенної спорідненості. При денатурації нагріванням білків тварин різних видів спостерігаються перехресні реакції. Це пояснюється тим, що під час денатурації молекули білків набувають конформаційної подібності (конформація типу хаотичного клубка), яка не залежить від їх первинної структури.

Антисироватки до нативних білків можуть не реагувати з денатурованими білками, тоді як антисироватки, одержані до денатурованих білків, реагують, хоч і слабо, з нативними білками у зв'язку зі збереженням у денатурованому препараті частини детермінант у незміненому стані.

У практиці широко використовують здатність фізичних і хімічних факторів знижувати токсичні властивості розчинних мікробних антигенів і токсинів із збереженням їх імуногенної активності.

Специфічність антигенів

Специфічність антигенів визначається структурними особливостями їхніх молекул. Під специфічністю антигенів розуміють здатність їх індукувати синтез антитіл і виникнення сенсibiliзованих лімфоцитів, комплементарних до цього антигену, які активніше взаємодіють із цим антигеном порівняно зі спорідненим. У біополімерів, що мають подібний хімічний склад, спостерігаються перехресні серологічні реакції, тоді як у білків і полісахаридів, які відрізняються за хімічним складом, спостерігаються серологічні відмінності. Прикладом може бути серологічна різноманітність капсульних полісахаридів окремих типів стрептокока, збудника пневмонії, яка визначається хімічними відмінностями між ними: полісахаридний антиген стрептокока першого типу містить галактуронову кислоту, фруктозу і глюкозу, другого типу – глюкуронову кислоту, рамнозу і глюкозу.

Специфічність антитіл спрямована проти невеликих хімічних угруповань молекули антигену – детермінантних груп. Ще у дослідах Ф. Обермейєра та Е.

Піка у 1905 р. було показано, що антитіла, одержані до білка, до молекули якого кон'юговано нітрогрупу, реагують із цим білком, але не реагують із нативним. Цими ж авторами було встановлено, що йодування білкових антигенів викликає зміну видової специфічності. Йодовані білки набувають здатності індукувати синтез антитіл, які взаємодіють із йодованими і навіть бромованими білками інших видів тварин. У таких білків антигенними детермінантами є йодовані залишки амінокислот (насамперед, тирозину та гістидину), що є спільними для білків різних видів тварин.

Специфічність антитіл було чітко продемонстровано на прикладі кон'югованих антигенів. Антитіла, одержані до азопротеїну, у складі якого є азобензоларсонат, реагують із цим білком та іншими білками, кон'югованими з азобензоларсонатом. Однак сам азобензоларсонат синтезу антитіл не індукує, він є гаптенем. К. Ландштейнер у 1949 р. показав, що азобензоларсонат може гальмувати реакції з антитілами проти азобензоларсонату, тоді як інші ароматичні аміни цієї реакції не пригнічують.

Навіть невеликі зміни поверхневих груп, такі як введення в молекулу білка деяких радикалів (хімічна модифікація молекул), наприклад нітрирування, галогенізація, етерифікація, метилювання, ацетилювання, що викликає блокування поверхневих карбоксильних та інших груп на поверхні білка, призводить до зміни антигенної специфічності. Хімічна модифікація бокових амінокислотних залишків у молекулі білка призводить, як правило, до зміни конформації молекули, а отже, до зміни деякої частини антигенних детермінант, так званих, конформаційних.

Наявність внутрішньовидових і міжвидових відмінностей у хімічному складі окремих речовин, тканин і органів зумовлюють існування видових, тканинних та органних антигенів.

Видова специфічність. Антигени, які виявляються лише у тварин одного виду, називаються видовими. Вони містяться в усіх тканинах і органах. Антигени з різко вираженою видовою специфічністю містяться в сироватці крові, печінці, селезінці. Гемоглобіни, протеолітичні ферменти пепсин і трипсин, білки яєць і молока та деякі інші характеризуються видовою специфічністю. М'язи, шкіра та головний мозок різних видів тварин містять антигени із відносно низькою антигенністю. Видова специфічність проявляється в антигенних відмінностях білків, навіть тих, що виконують ту саму функцію в різних видів. Ця специфічність зумовлюється особливостями структури білків, що виникли у процесі еволюції. Видова специфічність менше виражена серед білків організмів таксономічно близьких видів. З'ясовано, що функціонально однотипні біополімери різних видів мають антигенну подібність і що різні білки однієї особини відрізняються за антигенністю. Однотипні білки різних особин одного й того самого виду вищих тварин відрізняються за антигенністю. Ці відмінності називаються алотиповими. Вони є генетично детермінованими і свідчать про популяційний поліморфізм.

Більшість білків мають видові ознаки, але хімічний склад деяких із них у процесі еволюції змінився мало (гемоглобін) або ж практично не змінився (кристалин кришталика).

Гетероспецифічність. Хімічна подібність структур і їх антигенних властивостей виявляється іноді у віддалених видів, а отже, є випадковою. Так, паличка Фрідлендера типу В і пневмокок другого типу, які не мають близької філогенетичної спорідненості, дають перехресні серологічні реакції. Антигени, що мають однозначну антигенну специфічність і виявляються у представників філогенетично віддалених видів, називаються гетерофільними. Спільні антигени часто містять тканини тварин і мікробні клітини. Антиген Форсмана, наприклад, виявляється в еритроцитах барана, у нирці гвінейської свинки, у деяких сальмонел.

Органна специфічність. Органоспецифічні антигени виявлені в легенях, печінці, нирках, у щитоподібній і підшлунковій залозах, нервовій тканині і кришталику ока. Одночасно ті самі органи різних видів тварин мають антигени однакової специфічності. Тому імунні сироватки до тканин одного виду тварин реагують із тканинами того самого органа інших видів.

Антисироватки до спиртових екстрактів мозку перехресно реагують з екстрактами мозку навіть у філогенетично віддалених тварин та з екстрактами сім'яників, що, очевидно, зумовлюється наявністю в мозку і сім'яниках спільних ліпідних субстанцій. Однак екстракти з органів містять переважно видоспецифічні, а не реагуючі перехресно органоспецифічні антигени.

Тканинна специфічність. Антигени, які виявляються лише в одному виді тканини, називаються тканинспецифічними. Наприклад, гамаглобулін – специфічний антиген сироватки крові, а альбумін – специфічний антиген печінки. Однак обидва ці сильні антигени надходять у кров, і тому їх можна виявити в клітинах різних тканин. Це утруднює ідентифікацію специфічних антигенів конкретної тканини, у зв'язку з чим перший тканинспецифічний антиген було виявлено лише на початку ХХ ст. у кришталику ока бика, в якому немає сироваткових антигенів. Антисироватка кролів до кришталика реагує не лише з гомологічним антигеном кришталика ока бика, а й з антигенами кришталика всіх хребетних. Це дало змогу визнати цей антиген тканинспецифічним. У подальшому в кришталику було виявлено антигени двох видів: філогенетично старі, спільні для всіх видів, та сформовані на різних етапах еволюції, внаслідок чого вони набули видоспецифічних ознак. У 1920 р. Є. Вітебський виявив у мозку ліпідний тканинспецифічний антиген галактоцереброзид, характерний для тварин усіх видів. Також доведено, що білок щитоподібної залози тиреоглобулін є як видоспецифічним, так і тканинспецифічним антигеном.

Диференціювальні антигени. У процесі диференціювання на цитоплазматичній мембрані клітин з'являються нові антигени. За допомогою цих антигенів визначають напрям розвитку, функціональну специфіку або ступінь зрілості клітин. Отже, диференціювальні антигени є специфічними

маркерами. За такими антигенами диференціюють зокрема субпопуляції лімфоцитів (CD-маркери). Існують стадіоспецифічні антигени – антигени, які з'являються на певній стадії ембріонального розвитку. Так, у людини альфа-фетопротеїн синтезується в ембріональному періоді, а у зрілому віці в нормі його немає або виявляється в незначній кількості. Його наявність у крові свідчить про розвиток певних видів пухлин в організмі.

Хімічна будова молекул імуноглобулінів

Функціональна молекула імуноглобуліну являє собою білок в четвертинній структурі, утворений 4 поліпептидними ланцюгами. Два з них прийнято називати легкими і позначати буквою L (від англ. light - легкий), два інші - важкими або H-ланцюгами (від англ. heavy - важкий). Легкі ланцюги мають невелику масу (близько 25 kD), і кількість амінокислотних залишків в них коливається в межах від 210 до 220. Важкі ланцюги як мінімум в два рази важче легких, і довжина їх (залежно від класу) складає від 440 до 550 амінокислотних залишків.

Всі ланцюги мають доменну структуру. Протяжність одного домену в середньому близько 110 амінокислотних залишків, приблизно 60 з них утворюють скріплену ковалентними S-S-зв'язками глобулярну частину домену. У легких ланцюгах таких доменів завжди два, у важких - 4 або 5.

Домен прийнято нумерувати починаючи від NH₂-кінців поліпептидного ланцюга. Як в легких, так і в важких ланцюгах перший домен позначається латинською буквою V (від англ. variable - варіабельний), наступні - латинською літерою C (від англ. constant - константний, постійний). Для позначення приналежності домену до певного ланцюга і положення домену в ній використовується правий нижній підрядковий індекс. Наприклад, варіабельний домен легкого ланцюга позначається як VL, а другий константний домен важкого ланцюга - як CH₂.

На константних доменах як легких, так і важких ланцюгів можуть бути присутніми вуглеводні компоненти. Кількість, хімічний склад і локалізація цих олігосахаридів варіює залежно від класу або підкласу імуноглобулінів.

Порядок розташування субодиниць в четвертичній структурі наступний.

Дві однакові H-ланцюги орієнтовані в молекулі так, що їх COOH кінці ближні, і ланцюги закручені один відносно одного ділянками, що включають домен CH₂, CH₃ і, якщо такий є, CH₄. Між доменами двох ланцюгів утворюється не тільки безліч характерних для четвертичної структури слабких хімічних зв'язків, а й кілька ковалентних S-S-зв'язків, що і забезпечує жорстку фіксацію цих ділянок субодиниць одна відносно одної.

Кількість S-S-зв'язків і їх положення варіює залежно від класу і підкласу імуноглобулінів, але більшість з них розташовується в районі других константних доменів.

У кожному з Н-ланцюгів між доменами СН1 і СН2 є багата залишками проліну так звана шарнірна ділянка, яка забезпечує рухливість частин субодиноць, що складаються з доменів V і СН1, відносно решти молекули.

Саме до цих рухомих частин приєднані ідентичні один одному легкі ланцюги, NH₂-кінці яких тісно зближені з NH₂-кінцями важких ланцюгів. Легкий ланцюг жорстко фіксований відносно важкого безліччю слабких хімічних взаємодій між варіабельними і константними доменами і, як правило, одним ковалентним зв'язком між доменами СН1 і СL. Таким чином рухливими щодо одна відносно одної і відносно іншої частини імуноглобуліну виявляються дві ділянки четвертичної структури, що включають легкі субодиноці і домени V і СН1 важких субодиноць.

Така будова молекули забезпечує найкращі умови для виконання антитілами їх головної функції - зв'язування з антигеном. Вирішальний внесок у розуміння того, як структура імуноглобуліну відповідає його функціям, внесли роботи співробітників лабораторій Р. Портера і Д. Едельмана. Проведені в 50-60 роках ХХ століття дослідження по фрагментації молекул імуноглобулінів показали, що під впливом ферменту папаїну утворюються три фрагмента. Два з них виявилися ідентичними між собою і були здатними зв'язувати антиген, третій відрізнявся від двох перших і з антигеном не взаємодівав.

Виходячи з цього, перша подвоєна ділянка молекули отримала позначення Fab (від англ. Antigen binding - зв'язує антиген), а другий - Fc (від англ. crystallisable - здатний до кристалізації, тому що він першим випадав в осад при осадженні продуктів протеолізу з розчину). Обробка імуноглобулінів пепсином приводила до формування одного великого фрагмента і безлічі мілких. У цьому випадку тільки великий фрагмент зв'язував антиген, причому в два рази більшої кількості, ніж отримані при дії папаїну антигензв'язуючих фрагменти.

Крім того, при обробці цілих молекул і фрагментів меркаптоетанолом і іншими агентами, які розривають S-S-зв'язки, з'ясувалося, що антигензв'язуючі фрагменти завжди містять легкі ланцюги і частину важких, а інша частина молекули сформована лише ділянками важких ланцюгів.

Було також встановлено, що ні легкі, ні важкі ланцюги окремо антиген зв'язувати не могли. З цього випливало, що антигензв'язуюча ділянка в частині Fab формується з обов'язковою участю двох ланцюгів. З'ясуванню того, які саме ділянки ланцюгів важливі для взаємодії з антигеном, допомогло порівняння амінокислотного складу імуноглобулінів, що розрізняються по специфічності зв'язування з антигеном.

Виявилось, що відмінності мають місце в перших від NH₂-кінця доменах як легких, так і важких ланцюгів, внаслідок чого вони і отримали (як уже зазначалося вище) назву варіабельних. Це і дозволило сформулювати уявлення про паратоп - ділянку молекули імуноглобуліну, який вступає в безпосередню хімічну взаємодію з поверхнею антигенної детермінанти - епітопу.

Паратоп виникає в результаті зближення варіабельних доменів легкого та важкого ланцюгів при формуванні четвертинної структури імуноглобуліну.

Фактично між щільно з'єднаними субодинамиціями залишається невелика за розмірами ніша, форма якої дзеркально відповідає тій чи іншій антигенній детермінанті. У створенні внутрішньої поверхні цієї ніші беруть участь по три ділянки варіабельних доменів легкого і важкого ланцюгів. Саме в цих ділянках і спостерігається найбільше відмінностей в амінокислотному складі антитіл, вироблених у відповідь на дію різних антигенів, внаслідок чого вони і отримали назву гіперваріабельних. У кожному з ланцюгів ці ділянки роз'єднані, між ними знаходяться фрагменти ланцюгів з постійним амінокислотним складом, які називаються каркасними ділянками. Однак при формуванні третинної структури кожної субодинамиці і потім при об'єднанні їх в четвертинну структуру всі шість гіперваріабельних ділянок зближуються і стають стінками заглиблення між субодинамиціями.

Експериментально показано, що достатньо однієї амінокислотної заміни в межах будь-якої з гіперваріабельних областей, щоб змінити специфічність зв'язування антитіла з антигеном. З цього і робиться висновок, що фактично взаємодія антиген-антитіло зводиться до просторового поєднання виступу на молекулі антигену (антигенної детермінанти) та заглиблення на молекулі антитіла (антигензв'язуючої ділянки). Тільки при збігу просторових конфігурацій ніші і заглиблень можливе утворення слабких хімічних зв'язків між паратопом і епітопом, що забезпечує оборотне зв'язування антигену з імуноглобуліном.

Таким чином, з'ясувалося, що для взаємодії антитіла з антигеном потрібні лише дві невеликі ділянки імуноглобуліну. Природно, виникали питання про роль інших частин цієї складної молекули. Поступово і ці питання були вирішені.

Функції окремих ділянок (доменів) молекули імуноглобулінів.

Так, відомо, що специфічність вже сформованого антитіла до антигену не змінюється навіть після осадження антитіл з розчину іонами солей або органічними розчинниками. Виходячи з цього, можна вважати, що взаєморозташування легких і важких субодинамиць імуноглобуліну є максимально стабільним, ймовірно, внаслідок структури не тільки варіабельних, але й константних доменів. Фактично роль доменів CH1 і CL і полягає в підтримці антигензв'язуючих ділянок і його паратопа в незмінному стані.

Крім того, для домену CH1 імуноглобулінів показана здатність зв'язуватися з білком C4b з системи комплементу.

Істотно, що два несучих паратопа фрагмента молекули можуть займати в просторі практично будь-яке положення щодо її Fc-частини. Це забезпечується шарнірними ділянками важких ланцюгів. Вважається, що рухливість Fab є однією з умов, важливих для просторового поєднання антигенних детермінант і антигензв'язуючих ділянок антитіл.

Наступною за шарнірною ділянкою другий константний домен у імуноглобулінів всіх класів грає роль у визначенні часу існування антитіл в

плазмі крові і тканинній рідині. Показано, що катаболізм антитіл пов'язаний розщепленням цих молекул протеазами саме в районі домену СН2 і що на швидкість катаболізму впливає стан розташованих тут вуглеводних компонентів. Передбачається, що і розташовані в інших доменах бічні олігосахаридні ланцюги можуть мати відношення до катаболізму, хоча функція вуглеводів в молекулах імуноглобулінів ще не з'ясована повністю.

Найважливішою функцією СН2-домену є його здатність зв'язувати білок з системи комплементу і тим самим запускати класичний шлях її активації. Встановлено, що ділянка зв'язування утворена бічними ланцюгами залишку глутаміну в положенні 318 і двох залишків лізіну в положеннях 320 і 322. Розташування цієї ділянки в даній частині молекули, як думають, не є випадковим. Передбачається, що молекула імуноглобуліну, яка вільно рухається в плазмі крові або тканинної рідини, внаслідок постійного переміщення в просторі її Fab-частини сайт зв'язування стає недоступним для взаємодій. Коли ж імуноглобулін зв'язується з антигенами на поверхні чужорідної клітини, рух Fab обмежується і має можливість розпочати активацію. Тим самим комплемент не може запускатися вільними, не зв'язаними з антигенами антитілами, постійно присутніми в значній кількості в крові.

Подібний механізм, ймовірно, реалізується і при запуску активації системи комплементу імуноглобулінами класу М. Домени СН2 і СН3 антитіл визначають і ще одну найважливішу функцію - взаємодію з рецепторами на поверхні лейкоцитів і клітин стінок кровоносних судин плаценти. Саме завдяки цьому здійснюється найбільш ефективний імунний фагоцитоз і формується пасивна форма природного набутого імунітету у новонароджених. У імуноглобулінів класу Е за зв'язування з рецепторами тучних клітин і базофілів також відповідають ділянки важких ланцюгів, локалізовані в третьому і другому константних доменах.

Вивчення хімічної структури молекул антитіл дозволило встановити не тільки викладені вище загальні принципи їх будови, але і їх різноманітність.

У ссавців виявлено 5 класів імуноглобулінів, частина з яких ще поділяється на підкласи. Приналежність до класу або підкласу визначається структурою важких ланцюгів, які прийнято позначати літерами грецького алфавіту, які відповідають латинським літерам в найменуванні класу. У разі ділення класу на підкласи літерам, які позначають підтип важкого ланцюга, додають відповідну підкласу цифру. Наприклад, до складу імуноглобуліна підкласу IgG3 входять важкі ланцюги $\gamma 3$.

Різні типи і підтипи важких ланцюгів відрізняються один від одного:

– за первинною структурою (кількістю і розташуванням амінокислотних залишків і відповідно за молекулярною масою;

– за третинною структурою (кількістю і просторовою конфігурацією доменів, кількістю внутрішньо доменних S-S-зв'язків, кількістю і складом вуглеводних компонентів, протяжністю шарнірної ділянки);

– і по їх участю в утворенні четвертинної структури (кількості міжланцюгових S-S-зв'язків).

На відміну від важких, легкі ланцюги не настільки різноманітні, їх існує всього два типи, які прийнято позначати κ (каппа) і λ (лямбда). Вони входять до складу імуноглобуліну незалежно від класу, але ніколи в одній молекулі імуноглобуліну не можуть бути присутніми легкі ланцюга обох типів.

Ланцюги типу κ в цілому переважають кількісно. Наприклад, у людини це переважання виражається співвідношенням 3:2, однак у інших видів ссавців ці співвідношення можуть бути іншими. Незважаючи на відмінності в амінокислотних послідовностях ланцюгів κ і λ , будь-яких функціональних відмінностей між ними не виявлено. У той же час тип важкого ланцюга фактично визначає біологічні особливості антитіл різних класів і підкласів).

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Вплив фізичних і хімічних факторів на антигенність.
2. Чим визначається специфічність антигенів?
3. Чим визначається видова специфічність антигенів?
4. Гетероспецифічність антигенів.
5. В чому особливість диференціальних антигенів?
6. Хімічна будова молекул імуноглобулінів.
7. Функції окремих ділянок (доменів) молекули імуноглобулінів.

ТЕМА 4. БІОЛОГІЧНА РОЛЬ СИСТЕМИ ГІСТОСУМІСНОСТІ. ПРОЦЕСИНГ І ПРЕЗЕНТАЦІЯ АНТИГЕНІВ

***Анотація.** В представленому розділі розглянуті питання структури та функції головного комплексу гістосумісності ссавців і великої рогатої худоби, будови і функції молекул класу I і II ГКГ, структура, функції, поліморфізм в популяціях гена *BoLA-DRB3*:*

На поверхні майже всіх клітин організму представлені молекули (білки), які мають назву антигенів головного комплексу гістосумісності або МНС (Major histocompatibility complex). Молекули ГКГ виконують роль своєрідних "антен", що дозволяють організму, розпізнавати власні та чужорідні клітини (бактерії, віруси, ракові клітини) і, при необхідності, запустити імунну відповідь, забезпечуючи утворення специфічних антитіл і видалення чужорідного агента з організму. головний комплекс гістосумісності – це група генів і кодованих ними антигенів клітинної поверхні, які відіграють найважливішу роль у розпізнаванні чужорідних антигенів і розвитку імунної відповіді. Молекули ГКГ є на поверхні

клітин усіх вищих хребетних.

Будова ГКГ досить консервативна. Для отримання уявлення про його склад достатньо розглянути його структуру на прикладі будь-якого виду ссавців (рис.1.1).

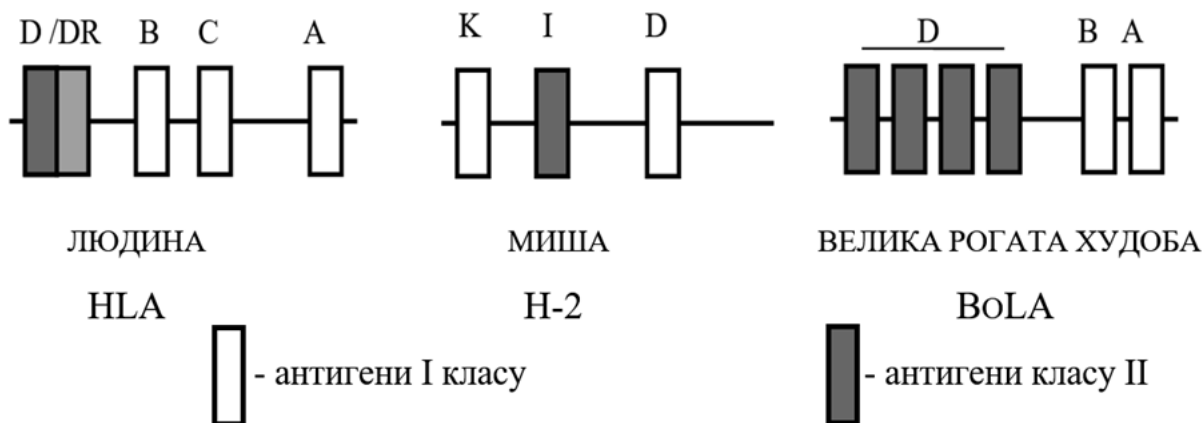


Рис. 1.1. Схема організації локусів, що кодують антигени класу I і антигени класу II, у деяких тварин і людини

Отже, хребетні мають здатність розпізнавати, руйнувати та розвивати імунологічну пам'ять на мікроорганізми, які потрапили в організм шляхом активації клітин і молекул системи імунітету. Для досягнення цих цілей є дві гілки імунної системи (природний і набутий імунітет), які повинні взаємодіяти один з одним. Вроджена імунна система містить в основному клітини мієлоїдного походження, які розпізнають загальні структури широкого спектру мікроорганізмів. Деякі з цих клітин (макрофаги і дендритні клітини) також беруть участь в активації адаптивного імунітету шляхом захоплення та обробки антигенів і діючі як клітини, що представляють антиген для Т-лімфоцитів. Ефекторні клітини адаптивної імунної системи, що складаються з В- та Т-лімфоцитів здатні визначати дуже велику різноманітність антигенних пептидів. Вони мають бути пов'язані в межах ендоплазматичного ретикулюму з молекулами кодованими ГКГ. На сьогодні добре відома будова і функції молекул класу I та класу II головного комплексу гістосумісності людини, будова яких практично універсальна для усіх ссавців і висвітлена у ряді робіт, які стали класичними. Полігенні та поліморфні особливості ГКГ надають цим молекулам величезні можливості щодо презентації антигену.

Молекула МНС I класу являє собою гетеродимер, що включає важкий α -ланцюг і однодоменний $\beta 2$ -мікроглобулін, нековалентно зв'язаний з основним поліпептидом. Важкий ланцюг має 3 α -домени. Конформація α -3 домену і $\beta 2$ -мікроглобуліну нагадує складчасту структуру Ig. Основні властивості антигенів I класу – зв'язування пептидів і презентація їх в імуногенній формі для Т-клітин

залежить від α -1 і α -2 доменів. Ці домени мають α -спіральні ділянки, які при взаємодії між собою утворюють щілину – місце зв'язування пептиду. Саме цей комплекс визначає імуногенність екзогенного пептиду, його можливість взаємодіяти з антигенрозпізнаючим центром Т-клітинного рецептора CD8-лімфоцитів.

Молекули МНС I класу:

- можуть входити до складу рецепторів гормонів (наприклад, зв'язування інсуліну після видалення з поверхні клітини МНС I класу);
- класичні трансплантаційні антигени;
- маркери диференціювання Т-лімфоцитів;
- є структурами розпізнавання при взаємодії між цитотоксичними Т-лімфоцитами та інфікованими вірусами клітинами-мішенями.

Молекули ГКГ II класу присутні на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, антигенпрезентуючих клітин (моноцитів, макрофагів, дендритних клітин, клітин Купфера, альвеолярних та перитонеальних макрофагів тощо). За будовою це теж гетеродимери, побудовані з нековалентно зчеплених α - і β -ланцюгів, кожен з яких включає по 2 домени.

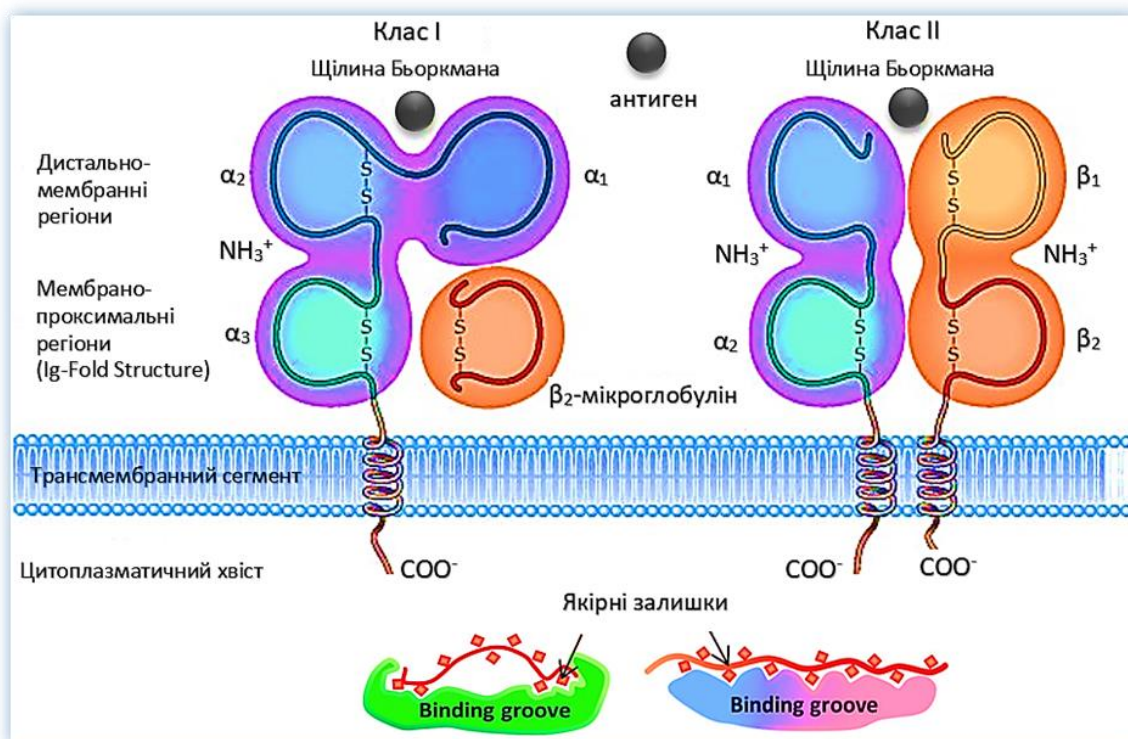


Рис. 1.2. Структура молекул МНС і сайтів зв'язування (власна реконструкція). Схематичне зображення класу I і класу II. Знизу: МНС-пептид, сайти зв'язування. Квадрати представляють собою окремі амінокислоти антигенних пептидів, які зв'язуються в щілині Бьоркмана (*binding groove*)

Антигензв'язуюча ділянка, як і в молекулі I класу, формується α -спіральними ділянками доменів α - і β -1. Між класами антигенів I і II є очевидною загальною структурною подібністю (рис.1.2).

Взаємне розташування α 1 і α 2-доменів в молекулі створюють «жолоб» («кишеню»), у формуванні якого беруть участь дві α -спіралі – умовні «стіни» і антипаралельні β -складки – умовне «дно». Ця структура отримала назву «пептидзв'язуюча борозна» або щілина Бьоркмана на честь вченого, який вперше її виявив. Певна амінокислотна послідовність цієї борозни служить своєрідним «якорем» утримання в ньому пептиду. Саме таким чином молекула класу I презентує (представляє) специфічний пептид для його подальшого розпізнавання - α - і β -ланцюгами T-клітинного рецептора, який розпізнає антиген.

З поліморфізмом ГКГ пов'язаний генетичний контроль імунної відповіді. Якщо амінокислотні залишки, що формують щілину Бьоркмана у антигенів II класу не можуть зв'язати екзогенний пептид, T-хелпери залишаються ареакивними і їх допомога в синтезі антитіл В-лімфоцитами не реалізується. Саме ця обставина є причиною генетично детермінованого дефекту в імунному реагуванні.

Антигени МНС II класу можуть з'являтися на ендотелії капілярів та багатьох епітеліальних клітинах при активації γ -інтерфероном. Гени класу II ГКГ орієнтовані на антигени позаклітинних сторонніх агентів (віруси, бактерії, гельмінти тощо) і активні тільки в професійних антигенпрезентуючих клітинах, а відповідні їм білки активують не тільки CD8+, але і CD4+ лімфоцити (T-хелпери і наївні T-кілери).

Професійні антигенпрезентуючі клітини захоплюють антиген шляхом фагоцитозу або ендоцитозу, а потім представляють його фрагмент на своїй мембрані в комплексі з молекулами білків класу II ГКГ. Після контакту CD4+ лімфоцити з антигеном клітини продукують додаткові ко-стимулюючі молекули, що призводить до активації T-клітини. Їх експресія характерна для професійних антигенпрезентуючих клітин. Гени класу II займають менше місця на хромосомі, ніж класу I. До складу цього класу входять:

- класичні гени (HLA-DP, HLA-DQ і HLA-DR);
- некласичні гени (HLA-DM і HLA-DO: DOA і DOB);
- псевдогени (вісім псевдогенів асоційовані з перерахованими вище локусами).

Оскільки білок, що представляє антиген, складається з двох субодиниць, то ген що, кодує α -ланцюг, прийнято позначати буквою A (наприклад, HLA-DPA або HLA-DQA), а який кодує β -ланцюг - буквою B (наприклад, HLA-DRB або HLA-DPB). За назвою гена може йти цифра, що позначає локус даного гена, якщо він є має декілька копій (наприклад HLADPA1 або HLA-DRB4).

Між генами класів I і II на хромосомі людини розташовані гени класу III, що включають 62 гена з більш ніж 500-ми екзонами. Клас III практично не має псевдогенів, за винятком однієї дубльованої ділянки гена *c4*. Гени цього класу кодують продукти, які виконують ряд важливих біологічних функцій. Ген *CYP21* здійснює контроль активності *P450*, порушення діяльності якого у людини веде до розвитку синдрому адреналової гіперплазії. Продукти генів комплексу крові *c4a* і *c4b* беруть участь в автоімунних процесах, а при визначених алелях забезпечують у людини схильність до системного червоного вовчаку. Гени теплового шоку *hsp70* відповідають за вироблення білкових продуктів, що володіють захисною функцією при розвитку клітинного стресу (при підвищенні температури тіла, зміні рН і осмотичного тиску). Гени локусу фактору некрозу пухлин (*tnf*) в нормальному стані відповідають за розвиток септичного шоку та індукцію клітинного апоптозу.

До складу МНС крім генів і їх залишків входять повторювані ділянки, що містять довгі та короткі дисперговані повтори (*LINE*, *SINE*), довгі і короткі тандемні повтори (*LTR*, *STR*), а також ретроелементи. Варіабельність інтронних ділянок ДНК всередині комплексу гістосумісності вище, ніж поза ним, що, швидше всього, пов'язано з явищем їх зчеплення з окремими генами ГКГ і участю в мутаційних та рекомбінаційних процесах.

Необхідно відмітити високу варіативність організації ГКГ. Послідовність генів і їх число сильно варіюють навіть в межах одного сімейства ссавців. так, наприклад, серед хижих (*Carnivora*) представники сімейства котячих (*Felidae*) в ході своєї еволюційної історії втратили повністю гени *DQ*, а ділянку *DR* зберегли в формі реліктового псевдогена (рис.1.1). Ця втрата була компенсована появою нових семи генів *DR*. С іншого боку, псові (*Canidae*) зберегли в своєму комплексі гістосумісності ген *DQ*, але сам комплекс виявився рознесений на різні хромосоми. У ГКГ різних видів відзначені значні відмінності в співвідношенні G-C нуклеотидних пар, кількість і розташування диспергованих і тандемних повторів та ретроелементів.

В даний час відомо, що система МНС, забезпечуючи регуляцію імунної відповіді, здійснює такі найважливіші фізіологічні функції як взаємодію всіх імунокомпетентних клітин організму, розпізнавання своїх і чужорідних, у тому числі, змінених власних клітин, запуск і реалізацію імунної відповіді та, в цілому, забезпечує виживання людини і тварин в умовах екзогенної і ендогенної агресії. МНС-системі належить істотна роль у визначенні схильності до різних захворювань, також вона пов'язана з репродукцією і тривалістю життя.

Генетична різноманітність на амінокислотному і нуклеотидному рівнях, виявлена у ВРХ в локусі гістосумісності схожа з даними, отриманими для локусу *HLA* (ген *HLA-DRB1*). Для цього регіону, як у людини, так і у великої рогатої худоби, характерне переважання значущих замінів над мовчазними, що

передбачає дію відбору, який сприяє підтримці генетичної різноманітності. Порівняння DRB локусів людини і ВРХ показує значну схожість в розташуванні поліморфних ділянок і ступеня їх поліморфності. Велика частина поліморфних ділянок відповідає сайту впізнавання молекули класу II. Подібна подібність ймовірно обумовлена конвергентною еволюцією генів, продукти яких повинні забезпечувати розпізнавання однотипного спектру чужорідних антигенів.

Про існування головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби (BoLA) вперше було проголошено в 1978 році в Единбурзі на першій Міжнародній Робочій нараді. Цій події передувало незалежне дослідження дев'яти лабораторій, які виявили одну і ту ж лейкоцитарну систему антигенів великої рогатої худоби. Комплекс BoLA локалізований на 23-й хромосомі. Як і в людини, локус BoLA є досить складним і містить близько 154 функціональних генів, які охоплюють близько 4 сМ. На молекулярно-біологічному рівні трансляція BoLA-DRB3 забезпечує синтез білкового антигену, розташованого на зовнішній стороні мембрани В-лімфоцитів.

Ген BoLA-DRB3: структура та функції

Ген BoLA-DRB3 кодує антигени класу II головного комплексу гістосумісності ВРХ. Він розташований на зовнішній стороні мембрани В-лімфоцитів в області ІІа сублокусу DR системи BoLA і складається з шести екзонів. З шести екзонів DRB3, екзон 2, який кодує пептидзв'язуючу щілину Бьоркмана, є найбільш поліморфним.

Хоча всі АПК відіграють подібну роль у адаптаційному імунітеті, слід враховувати деякі важливі відмінності. Макрофаги та дендритні клітини – фагоцити, які поглинають і вбивають патогени, які проникають через бар'єри першого ряду (тобто шкіру та слизові оболонки). В-клітини, з іншого боку, не функціонують як фагоцити, але відіграють основну роль у виробленні та секреції антитіл. Макрофаги та дендритні клітини розпізнають патогени за допомогою неспецифічних взаємодій з рецепторами PAMP, TLRs та рецепторів опсонізації комплементу чи антитіл. В-клітини взаємодіють із сторонніми патогенами або їх вільними антигенами, використовуючи антиген-специфічний імуноглобулін як рецептор (мономерні IgD та IgM). Коли рецептори імуноглобуліну зв'язуються з антигеном, В-клітина засвоює його шляхом ендоцитозу, обробляє і представляє Т-клітинам (рис.1.3). Механізм, за допомогою якого епітопи відбираються для обробки та подання АПК, є складним і недостатньо зрозумілим. Однак, одразу після обробки найбільш імунодомінантний епітоп зв'язується в межах щілини Бьоркмана молекули МНС II і переноситься на поверхню дендритної клітини для представлення Т-клітинам.

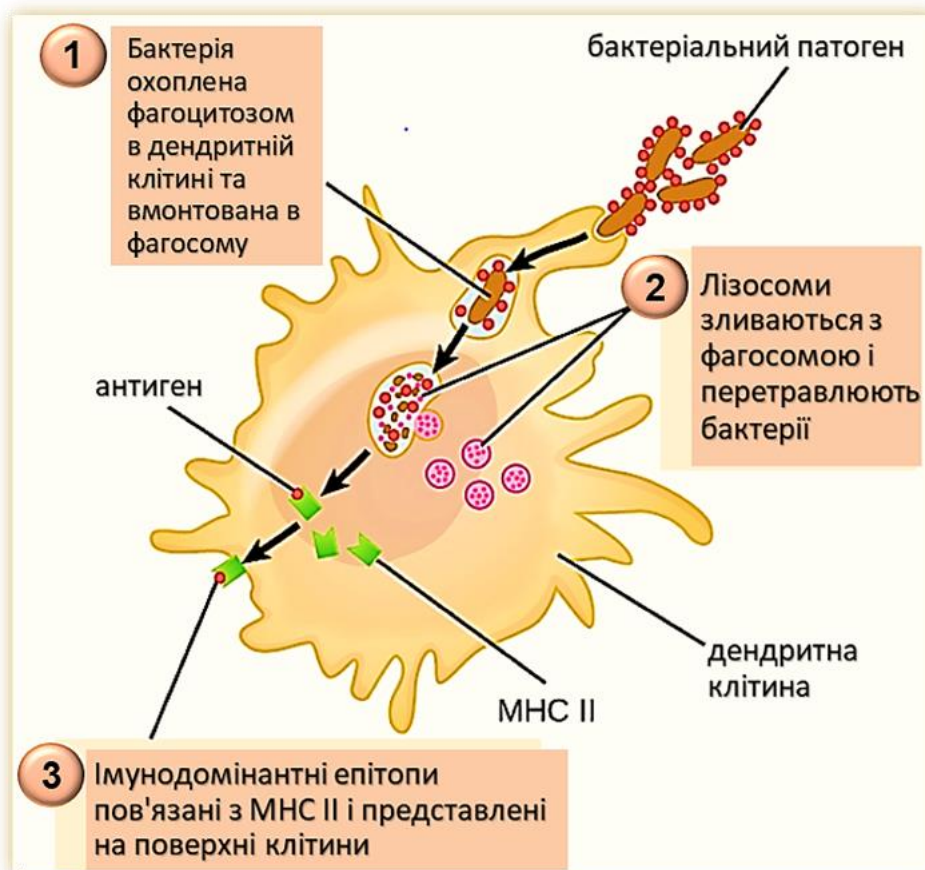


Рис. 1.3. Процес фагоцитозу, лізису та представлення епітопу в дендритній клітині

Перш ніж розпочати елімінацію заражених клітин, АПК повинні спочатку активувати Т-клітини, які беруть участь у клітинному імунітеті. Якщо внутрішньоклітинний збудник безпосередньо інфікує цитоплазму АПК, то обробка та представлення антигенів може відбуватися у протеасомах та на клітинній поверхні з МНС I. Однак, якщо внутрішньоклітинний патоген безпосередньо не заражає АПК, то застосовується альтернативна стратегія, яка називається крос-презентацією. При цьому антигени вводяться в антигенпрезентуючі клітини механізмами, які зазвичай призводять до презентації з допомогою МНС II (тобто через фагоцитоз), але антиген презентується молекулою МНС I для CD8 Т-клітин.

Точні механізми, за допомогою яких відбувається перехресне представлення, ще недостатньо вивчені, але, схоже, перехресна презентація – це функція дендритних клітин, а не макрофагів або В-клітин].

На сьогодні структура і функції гена *VoLA-DRB3* вивчена досить детально. Основні зусилля дослідників зосереджені на виявленні особливостей амінокислотних послідовностей екзона 2 у різних популяцій ВРХ. Сучасні методики секвенування різних ділянок генома ВРХ дають можливість отримати

точні послідовності та розширювати алельну базу для вивчення питань пов'язаних з поліморфізмом МНС.

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Будова ГКГ людини.
2. Будова ВоLA – системи.
3. Будова молекул класу I і II ГКГ.
4. Функції ГКГ.
5. Функції гена ВоLA-DRB3.

ТЕМА 5. ІМУННА ВІДПОВІДЬ ТА МЕХАНІЗМ КООПЕРАЦІЇ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН

***Анотація.** В представленому розділі розглянуті етапи формування імунної відповіді, поняття про специфічний імунітет, функції антигенпрезентуючих клітин.*

Етапи формування імунної відповіді

Імунна відповідь починається з розпізнавання чужорідного антигену, тобто його зв'язування із специфічним рецептором на мембрані зрілого лімфоциту. Такі специфічні рецептори існують на мембранах лімфоцитів до зустрічі з антигеном.

До антигенів слід віднести речовини, що мають дві властивості:

- 1) імуногенність – здатність індукувати специфічну імунну відповідь внаслідок чого продукуються антитіла або імунні лімфоцити;
- 2) антигенність – здатність специфічно реагувати з антитілами або клітинами, які продукувалися на введення даного антигену.

Імуногенні речовини завжди є антигенами, тоді як антигени не завжди здатні бути імуногенами.

Антигени, що не мають імуногенності, носять назву гаптену. Гаптен сам по собі не здатний індукувати розвиток імунної відповіді, продукцію імунних лімфоцитів або антитіл, але вони здатні з ними реагувати. Крім того, гаптен, що є молекулою з малою молекулярною масою, за рахунок невеликих розмірів не здатний викликати імунну відповідь, проте, при з'єднанні з великою білковою молекулою (яка в даному випадку називається носієм) вони набувають імуногенних властивостей. Носіями таких молекул можуть бути альбумін, глобуліни або синтетичні пептиди.

Епітоп, або антигенна детермінанта – це місце на антигені або усередині нього, яке специфічно реагує з антитілом. Таким чином, епітоп визначає

специфічність молекули та індукує антитільну відповідь. Зазвичай епітопи надзвичайно малі по розмірах і складають 4–5 амінокислотних або моносахаридних залишків.

Антигени мультивалентні, тобто мають, як правило, велику кількість епітопів, до кожного з яких в організмі продукуються свої специфічні антитіла.

Величезну їх різноманітність забезпечує широкий спектр клонів лімфоцитів і можливість розпізнати будь-який чужорідний антиген.

Специфічне розпізнавання і скріплення антигену з антиген-розпізнаючим рецептором спричиняє активацію лімфоциту, яка проявляється його посиленою проліферацією (клональною експансією), тобто накопиченням клону антигенспецифічних лімфоцитів, і подальшим диференціюванням лімфоцитів з придбанням ними ефекторних функцій. Результатом ефекторної фази імунної відповіді є елімінація антигену за участю активованих лімфоцитів, їх продуктів, а також інших клітин і механізмів неспецифічного захисту, що залучаються лімфоцитами в специфічну імунну відповідь: клітин, що фагоцитують, НК-клітин, системи комплементу.

Лімфоїдна система здійснює два види специфічної імунної відповіді:

гуморальна - синтез антитіл і клітинна - реакції гіперчутливості сповільненого типу, трансплантаційний імунітет і автоімунні реакції, що здійснюються механізмами як гуморального, так і клітинного імунітету.

Вважають, що призначення гуморального імунітету - звільняти організм переважно від чужорідних в антигенному відношенні екзогенних речовин, а клітинного - елімінація аутоантигенів, якими можуть з'явитися власні клітини, що мутують, і денатуровані.

Для здійснення реакцій гуморального імунітету необхідна кооперація декількох паралельно і послідовно проліферуючих видів лімфоїдних клітин, що диференціюються та розпізнають і реагують на антиген клітиннефекторів і допоміжних клітин, сприяючих розпізнаванню і обробці антигену, проліферації і диференціюванню клонів - макрофагів, дендритних клітин, клітин-хелперів.

Реалізація імунної відповіді здійснюється в різних морфологічних мікроструктурах лімфоїдних органів, де є умови для певних просторових взаємин тимусзалежних і тимуснезалежних лімфоцитів, для фагоцитозу антигенів, їх концентрації, контакту антигену з клітинними елементами, для розмноження, диференціювання і кооперації клітин, що беруть участь в імунній відповіді. Цими структурними одиницями в лімфовузлах і селезінці є краєві синуси, синуси і тяжи мозкової речовини, паракортикальна зона, лімфоїдні фолікули, зародкові центри, артеріолярні гільзи центральних артерій білої пульпи селезінки, плазмоклітинні острівці. При антигенному стимулі в цих структурах відбуваються характерні морфологічні зміни.

Етапи імунної відповіді:

1. *Представлення антигену* (антиген-презентація). До клітин, що представляють антиген відносяться:

1) макрофаги, як правило, представляють антигени бактерійного походження - продукти захоплення і внутрішньоклітинної переробки ними бактерій,

2) В-лімфоцити – мікробні антигени, антигени токсинів, пов'язані їх поверхневими імуноглобуліновими рецепторами, 3) найбільш універсальними антиген-представленими клітинами є дендритні клітини, які потрібні для запуску первинної імунної відповіді, у тому числі, пухлинні антигени.

Якщо антиген корпускулярний (мікроб або інша частинка), то він захоплюється макрофагами і перетравлюється у фагосомі. Невеликі пептиди знову експресуються на мембрані в комплексі з МНС II класу і представляються Т-хелперам (I сигнал). Одночасно макрофаг активується і виділяє ІЛ-1 та інші цитокіни, що активують Т-хелпери (II сигнал).

Макрофаги, що стимулюються бактеріями, виділяють ІЛ-12, що підсилює диференціювання Т-хелперів в Т-хелпери 1 типу. Якщо антиген представляють В-лімфоцити, то виникають Т-хелпери 2 типу.

2. *Індуктивна фаза.* Т-хелпери 1 і/або 2 типу, отримавши 2 сигнали від макрофагів, виділяють відповідний набір цитокінів, які стимулюють проліферацію Т-лімфоцитів, а також В-лімфоцитів. Причому активуються В-лімфоцити, що мають мономірний ІgM як рецептор, який відповідає цьому антигену, тобто настає селекція і виборча стимуляція В-лімфоцитів.

3. *Ефекторна стадія.* В-лімфоцити перетворюються на плазматичні клітини, що синтезують антитіла, специфічність яких збільшується у нащадків клітин, що діляться (феномен наростання афінитету В-лімфоцитів). Паралельно виникають антигенспецифічні Т-ефектори, що несуть на своїй поверхні антигенспецифічні Т-клітинні рецептори (ТКР). У результаті під впливом антигенів в організмі утворюються антитіла та імунні Т-клітини (Т-кілери).

Одночасно з розвитком імунної відповіді стимулюються механізми і клітини-супресори, що її гальмують. Тому через певний час в нормі імунна реакція затихає. У організмі залишається імунологічна пам'ять: Т-і В-клітини пам'яті.

У разі первинного контакту імунокомпетентних клітин з антигеном розвивається первинна імунна відповідь. У часовому вираженні первинна імунна відповідь має стадійність свого розвитку:

I стадія займає 3 - 4 доби, антитіла до відповідного антигену в сироватці ще відсутні.

II стадія - через 10-14 доби після контакту з антигеном в сироватці крові з'являються ІgM і ІgG.

III стадія - рівень антитіл залишається постійним.

IV стадія займає місяці і характеризується поступовим зниженням рівня антитіл.

Вторинна імунна відповідь розвивається при повторному контакті з антигеном, при цьому утворюються імуноглобуліни класу G. Антитіла, головним чином IgG, з'являються швидше і у вищому титрі, ніж при первинній імунній відповіді.

Специфічний імунітет

Набутий специфічний(адаптивний) імунітет реалізується лімфоцитами. Єдина загальноприйнята класифікація клітин, що забезпечують реакції специфічного імунітету, відсутня. На підставі функціональних особливостей виділяють декілька типів клітин:

- антиген представлені клітини (АПК), що захоплюють антигени, переробляють їх і представляють відповідні антигенні детермінанти іншим імунокомпетентним клітинам (до АПК відносяться дендритні клітини, моноцити і макрофаги, а також В-лімфоцити);

- ефекторні клітини, що безпосередньо здійснюють реакції специфічного імунітету (до ефекторних імунокомпетентних клітин відносяться цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ) і плазматичні клітини);

- регуляторні клітини, що забезпечують активацію або пригнічення окремих ланок імунних реакцій (активатори - індуктори Т-хелперів, індуктори Т-супресорів, Т-хелпери 1 типу, Т-хелпери 2 типу, макрофаги; інгібітори

- Т-супресори; Т-контрсупресори роблять Т-хелпери нечутливими до Т-супресорів);

- клітини пам'яті, що зберігають інформацію про взаємодію з конкретним антигеном і тим самим сприяють активнішому розвитку імунної відповіді при повторній його дії.

Функції АПК включають:

- 1) захоплення нативного (незміненого) антигенного матеріалу шляхом фагоцитозу, піноцитозу або рецепторно-опосередкованого ендоцитозу;

- 2) частковий протеоліз (процесінг) ендогенного матеріалу в ендосомах впродовж 30 - 60 хв. при низьких рН з вивільненням епітопів антигенів (епітоп-частина антигену, що взаємодіє з паратопом, тобто гіперваріабельною частиною антитіла);

- 3) синтез глікопротеїнових молекул або МНС (англ. Major Histocompatibility Complex), званого у людини також головним комплексом гістосумісності HLA (англ. Human Leukocyte Antigens - антигени лейкоцитів людини), а також зв'язування синтезованих молекул МНС з епітопами антигенів;

4) транспорт комплексів молекули МНС/епітоп антигену на поверхню АПК, де вони представляються лімфоцитам, що розпізнають їх;

5) експресію на поверхні клітини разом з комплексом МНС/антиген додаткових (костимулюючих) молекул, що посилюють процес взаємодії з лімфоцитами;

6) секрецію розчинних медіаторів (переважно ІL1), які викликають активацію лімфоцитів.

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Які речовини належать до антигенів?
2. Які два види специфічної імунної відповіді здійснює лімфоїдна система?
3. Назвіть етапи імунної відповіді.
4. Які функції виконує адаптивний імунітет?

ТЕМА 6. ОСНОВНІ ФОРМИ ПОРУШЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ. ІМУНОДЕФІЦИТИ

***Анотація.** В представленому розділі розглянуті поняття про імунодефіцит, питання про вроджені і набуті імунодефіцити, про вторинні імунодефіцити при вірусних інфекціях.*

Імунодефіцити

Імунна система, як і будь-яка інша система організму, може мати розлади в будь-яких ланках, що може призвести до виникнення так званого імунодефіциту. Основою імунодефіцитних станів є порушення генетичного коду, що не дозволяє імунній системі включати ту чи іншу ланку імунної відповіді. Імунодефіцитні стани можуть бути первинними (вродженими) і вторинними (набутими). У свою чергу первинні є вродженими, а вторинні – набутими.

Вроджені імунодефіцити.

Ця патологія є генетично обумовленою. Найчастіше вроджені імунодефіцити проявляються в перші місяці життя. Діти дуже часто хворіють на інфекційні захворювання, які нерідко протікають з ускладненнями. Існує робоча класифікація вроджених станів імунної недостатності, запропонована експертами ВООЗ в 1971 р. Відповідно до цієї класифікації первинні імунодефіцити розподіляються на п'ять великих груп.

1. До першої групи належать захворювання, які пов'язані тільки з дефектом В-клітин, наприклад імунна недостатність, пов'язана з Х хромосомою.

2. До другої групи належать захворювання імунної недостатності з дефектом тільки Т-клітин, наприклад, гіпоплазія зобної залози (синдром Ді Джорджі).

3. Третя група – це захворювання з одночасним ураженням В- і Т-клітин: тімома (пухлина тимуса) та ін.

4. У четверту групу входять такі стани імунодефіциту, при яких одночасно вражені В- і Т-стовбурові клітини, наприклад, комбінована імунна недостатність, яка пов'язана з Х-хромосою, та ін.

5. У заключну п'яту групу включені некваліфіковані вище стани імунної недостатності.

На практиці вроджені стани імунної недостатності обмежуються трьома основними групами:

- 1) дефектами фагоцитозу;
- 2) недостатністю клітинного і гуморального імунітету (Т-, В- і стовбурових клітин);
- 3) порушенням функцій комплементарної системи.

Клінічні прояви вроджених імунодефіцитних станів дуже різноманітні. Вони варіюють від важких симптомів, викликаних перенесеними інфекціями або вакцинацією, до середніх і легких і хворобливих станів, що важко діагностуються. Вроджені або первинні імунодефіцити є одними з найчастіших причин ранньої дитячої смертності.

Набуті імунодефіцити. Їх ще називають вторинними імунодефіцитами, так як вони з'являються в процесі життя людини з найрізноманітніших причин. Іншими словами, вони виникають як результати впливу безлічі факторів на організм, який при народженні мав здорову імунну систему. Цими уражаючими факторами можуть бути:

- 1) несприятлива екологія (забруднення води, повітря і т.п.);
- 2) порушення харчування (нераціональні дієти, що викликають порушення обміну речовин, голодування);
- 3) хронічні захворювання;
- 4) тривалий стрес;
- 5) не повністю вилікувані гострі бактеріальні та вірусні інфекції;
- 6) захворювання печінки і нирок (органів, що забезпечують детоксикацію організму);
- 7) радіація;
- 8) невірно підібрані лікарські засоби.

Науково-технічний прогрес привів нашу цивілізацію до використання величезної кількості штучних (синтетичних) харчових добавок, ліків, засобів гігієни, тощо. Якщо ці фактори довгостроково впливають на організм, то в крові і лімфі накопичуються отруйні сполуки і продукти обміну речовин в такій

концентрації, що можуть розвинутися хронічні захворювання. В результаті цього деякі види бактерій, які були поглинені макрофагами (фагоцитами), не гинуть, а починають активно розмножуватися, це призводить до загибелі фагоцитів. У нормальних умовах повинні гинути мікроорганізми. Проблема вторинних імунодефіцитів є дуже актуальною для сучасності. Вони можуть серйозно змінювати і обтяжувати хвороби, впливати на їх перебіг і ефективність лікування.

Існують тимчасові порушення імунітету, так звані функціональні порушення. Вони добре піддаються корекції (найчастіше у дітей). Тимчасове зниження активності імунних показників може бути і у здорових людей.

Зазвичай це пов'язано з сезонними явищами (зниженням сонячної активності, вологою погодою), що призводить до епідемічних спалахів простудних захворювань, грипу. При своєчасному втручанні функціональні зміни імунітету легко відновлюються до норми. Якщо вторинні імунодефіцити порушують процеси самоочищення організму, то з часом цей дисбаланс може призвести до аутоімунних захворювань та онкології.

Вторинні імунодефіцити при вірусних інфекціях

Віруси здатні індукувати вторинні імунодефіцити двома шляхами - безпосередньо руйнуючи імунокомпетентні клітини (ВІЛ) і змінюючи їх рецептори, активність взаємодії, модифікуючи імунореактивність (CMV, HSV, EBV).

Віруси можуть служити індукторами вторинних імунодефіцитів і провокувати ускладнення будь-якого запального процесу. Так, вірус EBV може вражати В-лімфоцити і викликати гіпо- і агамаглобулінемію. Віруси кору, грипу, паротиту, краснухи, CMV змінюють співвідношення між популяціями клітин, порушують кооперацію цих клітин, пригнічують імунні реакції і підвищують чутливість до бактерійних агентів. Хронічна персистенція вірусу герпесу в лейкоцитах і нервових гангліях, вірусу гепатитів В і С у гепатоцитах створює всі умови для розвитку вторинних імунодефіцитів. Вірус імунодефіциту сам руйнує Т-хелпери, викликаючи дисбаланс в імунній системі.

Як приклад імунодефіциту по Т-лімфоцитопенічному типу при хронічному вірусному захворюванні приводимо історію хвороби хворої Ж., 37 років, що знаходився на лікуванні у терапевтичному відділенні з діагнозом: діагноз: хронічний бронхіт, загострення.

Хвора Ж., 37 років, скаржиться на висип на слизовій оболонці верхньої губи та на шкірі носо-губного трикутника, що свербить. Указані прояви спостерігаються на протязі останніх 2 років, носять рецидивуючий характер. Загострення відбуваються після переохолодження та ОРЗ. При огляді на верхній

губі та на шкірі носо-губного трикутника виявляється локальний висип везикулопапульозного характеру, в порожнині рота - виявлені ерозійні зміни на язичку, кваліфіковані як кандидоз.

Імунограма хворої Ж, 37 років. Дані імунологічного дослідження дозволили встановити, що перебіг вірусної інфекції (герпес) у даної хворої характеризується лімфопенією, з відносним Т-цитозом (CD-8), зниженням муно-регуляторного індексу (PI=0,59), незначним підвищенням ШОЕ, активацією гуморальної ланки імунітету за рахунок підвищення продукції IgM, активацією фагоцитозу (поглинальної активності нейтрофілів, спонтанної бактерицидності), зниження функціонального резерву окислювально-відновного потенціалу фагоцитів (НСТ-тест рез. < 16). Підвищення вмісту комплементу (СН-50).

Діагноз: хронічна рецидивуюча герпес-вірусна інфекція у ділянці обличчя і губ. Орофарингеальний кандидоз. Імунодефіцит по Т-лімфоцитопенічному типу (D 84.9).

Висновок: лімфопенія у поєднанні з підвищенням рівня цитотоксичних лімфоцитів і зниженням PI, а також зниження функціонального резерву окислювально-відновного потенціалу фагоцитів (НСТ-тест рез.) свідчать на користь наявності у хворого хронічної вірусної інфекції (супресований варіант імунної відповіді).

У хворої є імунодефіцитний стан за Т-лімфоцитопенічним типом (D 84.9). Заключний діагноз: хронічна рецидивуюча герпес-вірусна інфекція у ділянці обличчя і губ. Орофарингеальний кандидоз. Імунодефіцит по Т-лімфоцитопенічному типу (D 84.9).

Етіотропна та імунотропна терапія:

1) етіотропна протівірусна терапія включає зовіракс (ацикловір) 400 мг всередину 4 рази на день, протягом 1 місяця; герпесвіром (мазь) змащувати уражені ділянки шкіри і слизової оболонки губ 4 рази на день 7 діб;

3) неспецифічна протівірусна терапія:

- віферон по 500 тис. МО 1 раз на день у свічках протягом 1 місяця; вірогель - змащувати уражені ділянки шкіри і слизової оболонки губ 2 рази на добу, 5 - 7 діб;

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Назвіть різні види імунодефіцитів.
2. Назвіть імунодефіцити, що асоціюються з дефектом В-клітин.
3. Назвіть імунодефіцити, що асоціюються з дефектом Т-клітин.
4. Назвіть імунодефіцити, що асоціюються одночасно з дефектом В- і Т-клітин.

ТЕМА 7. ІМУНОПАТОЛОГІЯ. ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Анотація. В представленому розділі розглянуті поняття про імунопатологію, аутоімунізацію, методи, основані на вивченні поверхневих маркерів лімфоцитів, лазерна проточна цитофлюориметрія, метод розеткоутворення, визначення ЕАС лімфоцитів, реакція бласттрансформації лімфоцитів, НСТ-тест - тест відновлення нітросинього тетразолія.

Імунопатологія (від імуно і патологія) – розділ імунології, який вивчає патологічні процеси в організмі людини, що виникають унаслідок неадекватної імунної відповіді організму при порушенні функціонування імунної системи та викликають імунні захворювання. Розрізняють вроджені та набуті порушення. Перші зумовлені недостатнім розвитком тимуса, що призводить до розладу клітинних захисних реакцій, відсутністю або зниженням продукування антитіл, порушенням систем фагоцитозу або комплементу, вони спричиняють первинні імунодефіцити та ін. вроджені імунні захворювання.

Набуті порушення виникають внаслідок впливу хімічних (токсичні речовини, кортикостероїди, цитостатична терапія), фізичних (рентгенів., радіоактивне, електромагнітне випромінювання, травми, опіки), інфекційних (ВІЛ-інфекція) та інших (захворювання печінки, нирок, злоякісні новоутворення, діабет) чинників на імунну систему. За цих умов спостерігають недостатнє формування імунної відповіді організму (вторинні імунодефіцити) або порушення імунної толерантності до власних тканин (аутоімунізація).

Аутоімунізація зумовлена появою антитіл і сенсibiliзованих лімфоцитів, що взаємодіють з антигенами власного організму. Вона може ускладнювати перебіг інших захворювань і бути головною причиною аутоімунних захворювань.

У медицині для корекції імунопатологічних станів використовують імуномодулятори – лікарські препарати, здатні підсилювати чи послаблювати певну ланку імунної відповіді, їх використання вимагає детального обстеження пацієнта та аналізу причин виникнення імунопатологічного процесу.

Методи, основані на вивченні поверхневих маркерів лімфоцитів. Виділення лімфоцитів з периферичної крові методом градієнтного центрифугування.

Як правило, дослідження лімфоцитів в лабораторії включає етап виділення фракції мононуклеарних лейкоцитів (лімфоцитів) з периферичної крові. З цією метою використовують метод виділення клітин на градієнті щільності фікол-пак.

Змішуючи фікол і пак в певній пропорції, отримують розчин, що має щільність 1.077 г/див. Кров нашаровують на розчин фіколу (градієнт). В результаті між плазмою і розчином фіколу утворюється ступінчастий градієнт щільності. Після центрифугування еритроцити і гранулоцити проходять крізь фікол і осідають на дно, а мононуклеари (лімфоцити і моноцити) залишаються у вигляді кільця в інтерфазі, т.ч. вдається розділити клітини, що мають щільність нижче (лімфоцити, моноцити) і вище (ерритроцити, гранулоцити) ніж 1.077 г/см.

Метод визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів з використанням еритроцитарних діагностиків "Анти-CD3", "Анти-CD4", "Анти-CD8", "Анти-CD22", "Анти-CD16".

Принцип методу оснований на визначенні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD3 (Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори), CD19 або CD22 (В-лімфоцити), CD16 (натуральні кілери). Облік результатів дослідження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Імуно-регуляторний індекс (показник CD4/CD8).

Окрім визначення чисельності популяцій і субпопуляцій, важливе значення надається обчисленню показника CD4/CD8 - імуно-регуляторного індексу або хелперно-супресорного відношення (норма $1,8 \pm 0,4$). Зменшення імуно-регуляторного індексу спостерігається при вірусних інфекціях, у новонароджених і при пересадці кісткового мозку, а збільшення – при аутоімунних захворюваннях, алергії.

Лазерна проточна цитофлюориметрія.

Принцип методу проточної цитометрії заснований на реєстрації світлорозсіювання і флюоресценції від кожної окремо взятої клітини в клітинній суспензії. На основі аналізу світлорозсіювання (без застосування антитіл) в досліджуваному зразку можна визначити вміст лімфоцитів, моноцитів і гранулоцитів. Проточна цитометрія проводиться з використанням моноклональних антитіл, пов'язаних з флюоресцентними фарбниками, якими зафарбовують клітини крові. Моноклональні антитіла мають ідентичну специфічність до мембранних антигенів, тому вони згруповані і позначені відповідним номером кластера диференціювання (CD). Таким чином, використовуючи метод імунофлюоресценції (прямої або непрямой), можна визначити чисельність різних субпопуляцій лімфоцитів.

Серед найчастіше вживаних флуорохромів знаходяться наступні: флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), фікоеритрин (PE, RD1), перидінінх лорофіл протеїн (Per - CP), алофікоціанін (APC), а також тандемні барвники (фікоеритрини Cy5 і Cy7).

Суспензія клітин під тиском подається в проточний осередок, де за рахунок різниці тисків між зразком і оточуючою рідиною клітини, знаходячись в ламінарному потоці рідини, вишиковуються в ланцюжок один за одним (гідродинамічне фокусування струменя в струмені). Клітини крові поодиноці перетинають сфокусований лазерний світловий промінь. Світло певної довжини порушує молекули флуоресціюючих фарбників, пов'язаних з різними клітинними компонентами, при цьому може відбуватися одночасне збудження декількох різних фарбників, що дозволяє оцінити відразу декілька клітинних параметрів.

У момент перетину клітиною лазерного променя детектори фіксують:

- пряме (малокутове) світлорозсіювання (forward scatter). Детектор прямого світлорозсіювання розташовується по ходу лазерного променя за проточним осередком і реєструє випромінювання лазера, яке розсіюється під кутами 2-19°. Інтенсивність розсіяного під малим кутом світла пропорційна розміру клітини. Більші клітини розсіюють світло сильніше за дрібних;

- бічне світлорозсіювання (side scatter). Промінь лазера, проходячи крізь клітину, багаторазово заломлюється і розсіюється на всі боки під кутом 10° і більше. Реєстрація цього випромінювання дозволяє оцінити внутрішню будову клітини (співвідношення ядро/цитоплазма, наявність гранул, інших внутрішньоклітинних включень). Комбінація бічного і прямого світлорозсіювання дозволяє судити про морфологію клітини в цілому, виділяти різні популяції клітин (лімфоцити, моноцити, гранулоцити) для подальшого аналізу;

- інтенсивність флуоресценції, яка дозволяє визначати субпопуляційний склад клітинної суспензії та ін.

Система для реєстрації світіння флуоресцентних міток складається з комплексу світлофільтрів і фотопомножувачів, кожен з яких реєструє випромінювання в діапазоні довжин хвиль, що відповідають флуорохрому. Вибір типу і кількості флуоресцентних барвників визначається поставленою задачею для цього дослідження. Основними типами таких барвників є моноклональні антитіла, кон'юговані з флуоресцентною міткою (FITC, PE, APC, PerCP та ін.) для визначення мембранних і цитоплазматичних антигенів клітини, барвники, що дозволяють оцінити життєздатність клітин (7AAD, PI) флуорофори, що зв'язуються з нуклеїновими кислотами (DAPI, Hoechst), pH - чутливі флуорофори (Fluo - 3), іон-залежні флуорофори (Indo-1). Наприклад, антигени CD 3 виявляються за допомогою моноклональних антитіл ОКТ 3, ОКТ 1, Leu 4, де ОК – Onto Klon); антигени CD 4 - ОКТ 4 та Leu 2a; антигени CD 8 - ОКТ 8 та Leu 3a; антигени CD 2 - ОКТ 11. Моноклональні антитіла ОКТ 6 виявляють антигени CD 1, ОКТ 9 та ОКТ 10 - на претимічних клітинах, на незрілих та активованих Т-лімфоцитах, моноклональні антитіла ОКВ 1 та Leu 12

– на зрілих В-лімфоцитах, ОКВ 2 – на молодих формах В-лімфоцитів, ОКМ 1 та Leu 7 – на моноцитах, гранулоцитах, натуральних кілерах.

Отриманий сигнал передається в комп'ютер, обробляється, і отримані дані відображаються у вигляді різних графіків і гістограм.

У проточному цитометрі, обладнаному системою для сортування клітин, проточний осередок закріплений на п'єзокристалі. При подачі на нього напруги кристал разом з осередком здійснює коливання із заданою частотою, внаслідок чого струмінь рідини з клітинами розбивається на окремі краплі. Проходячи крізь заряджаюче кільце, крапля може придбавати позитивний або негативний заряд залежно від того, яка клітина міститься усередині краплі. Пролітаючи повз пластини, що відхиляють, крапля з клітиною притягується до них, виходить з основного потоку і потрапляє в пробірку. Метод сортування клітин на проточному цитометрі дозволяє отримати популяції клітин з високою чистотою (до 99.9% позитивних клітин) у відсортованій фракції.

Метод розеткоутворення.

Визначення Т-лімфоцитів методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (Е-РУК). Тимусзалежні Т-лімфоцити мають рецептори для еритроцитів барана (Е-рецептори ідентичні CD2, що виявляється моноклональними антитілами), які виступають специфічним маркером для їх розпізнавання (Е-РУК: Erythrocyte - розеткоутворюючі клітини).

Виявлення Т-лімфоцитів, що утворюють розетки з алогенними і аутологічними еритроцитами.

Т-клітини, що утворюють розетки з аутоеритроцитами, як вважають, несуть кілерну функцію і грають основну роль в механізмах аутоагресії.

Визначення В-клітин методом розеткоутворення з еритроцитами барана в системі ЕАС.

Тимуснезалежні В-лімфоцити мають на своїй мембрані специфічні детермінанти, що дозволяють диференціювати їх від тимус-залежних, тобто Т-лімфоцитів. Такими детермінантами є поверхневий (мембранний) IgM, рецептори для Fc -фрагмента Ig G, третього компонента комплексу (C3) і вірусу Епштейна-Бара. Число лімфоцитів, що несуть IgA, G, E або D, незначне (IgA - 1-5 %, IgD і IgE - 2-4 %).

Застосовується метод виявлення В-клітин по їх здатності утворювати розетки з баранячими еритроцитами, навантаженими антитілами в середовищі комплексу. Такі еритроцити маркують рецептори для Fc і C3 В-лімфоцитів.

Визначення ЕАС лімфоцитів.

До 0,1 мл суспензії лімфоцитів додають 0,1 мл сенсibiliзованих еритроцитів. Оптимальне співвідношення еритроцитів до лімфоцитів рівне 20:1. Суміш інкубують 45 хв. При 37 °С, після чого пробірки поміщають в лід.

Підрахунок В-клітин проводять описаним вище способом. Абсолютна кількість В-лімфоцитів в нормі складає $0,28 - 0,31 \times 10^6$ /л).

Підвищення абсолютної кількості В-лімфоцитів спостерігається при: гострих бактеріальних, грибкових, паразитарних захворюваннях, СНІД (початковий період), хронічних захворювання печінки (цироз, вірусний гепатит), автоімунних захворюваннях (ревматоїдний артрит, СЧВ, ревматизм, колагенози), саркоїдозі, муковісцидозі, хворобі Крона, хворобі Вальденстрема, моноклональній гамопатії, інфекційному мононуклеозі, хронічному лімфолейкозі, в гострому періоді повторної інфекції.

Зниження абсолютної кількості В-лімфоцитів спостерігається при: фізіологічній гіпогамаглобулінемії у дітей (у віці 3 – 5 міс), вродженій гіпогамаглобулінемії або агамаглобулінемії, новоутвореннях імунної системи, лікуванні цитостатиками і імунодепресантами, станах після видалення селезінки, недостатності гуморальної ланки імунітету.

Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ).

Принцип методу. Під впливом неспецифічних і специфічних стимулів лімфоцити перетворюються на бласти - великі піронінофільні клітини, здатні до проліферації і подальшого диференціювання, що приводить до збільшення в лімфоїдній тканині кількості реагуючих клітин. Це явище називають бласттрансформацією, яка постійно спостерігається в лімфоїдних тканинах в результаті антигенної стимуляції.

Спонтанна проліферація лімфоцитів (бласттрансформація) буває підвищена у хворих, що перенесли багатократні переливання крові, хворих алергічними і автоімунними захворюваннями, при бактерійних і вірусних інфекціях, а також у новонароджених.

Зниження проліферативної відповіді на ФГА свідчить про наявність імунодефіциту. Низька відповідь в РБТЛ може корелювати з дефіцитом Т-клітин в периферичній крові або із зміною показника CD4/CD8 на користь клітин-супресорів. В деяких випадках (наприклад, в період відновлення після опромінення або інтенсивної хіміотерапії) низька відповідь на Т-клітинні мітогени може бути пов'язана з викидом в периферичну кров великої кількості незрілих Т-клітин. Низька відповідь в РБТЛ може бути також обумовлена порушенням продукції таких лімфокінів як ІЛ-1 і ІЛ-2.

НСТ-тест - тест відновлення нітросинього тетразолія.

Спонтанний тест з НСТ (нітросинім тетразолієм) дозволяє оцінити стан кисневозалежного механізму бактерицидності фагоцитів (гранулоцитів) крові *in vitro*. Він характеризує стан і ступінь активації внутрішньоклітинної НАДФ-Н-оксидазної антибактеріальної системи.

Принцип методу ґрунтується на відновленні поглинутого фагоцитом розчинного барвника нітросинього тетразолію (НСТ) в нерозчинний діформазан

під впливом супероксиданіону, що утворюється в НАДФ–Н–оксидазній реакції, яка ініціює процес стимуляції фагоциту.

До фагоцитів додають жовтий фарбник нітросиній тетразолій, в нормі при його поглинанні метаболічна активність фагоцитів зростає, нітросиній тетразолій відновлюється, диформазан у вигляді грубодисперсних темно-синіх гранул відкладається усередині або на поверхні клітин і продукти цієї реакції забарвлюють фагоцит у синій колір.

Питання, що виносяться на самостійне опрацювання:

1. Дайте визначення поняття імунопатологія.
2. Що таке аутоімунізація?
3. Які є методи, основані на вивченні поверхневих маркерів лімфоцитів?
4. Опишіть лазерну проточну цитофлюориметрію.
4. Опишіть метод розеткоутворення.
5. Охарактеризуйте реакцію бласттрансформації лімфоцитів.
6. Опишіть НСТ-тест.

Список використаних джерел

1. Ветеринарна імунологія [Навчальний підручник] / А.Й. Мазуркевич, Ю.О. Харкевич, В.Б. Данілов, М.О. Малюк, В.В. Ковпак. К.: "НУБіП України". 2018. 334 с.
2. Імунологія: Підручник / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В.Колибо та ін.; за заг. ред. Є.У. Пастер. - К.: Вища шк. 2005. 599 с.
3. Вершигора А.Ю., Пастер Э.У., Колибо Д.В., Віхоть М.Є., Моложава О.С., Михальський Л.О., Позур В.К., Сківка Л.М., Холодна Л.С., Швець Ю.В. Імунологія. ВПЦ «Київський університет», 2011.
4. Іонов І.А. Сучасна імунологія (курс лекцій) / І.А. Іонов, Т.Є. Комісова, О.М. Сукач, О.О. Катеринич О Х.: ЧП Петров В.В., 2017. О 107 с.
5. Імунологія: підручник / Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко та ін.; за ред. Л.В.Кузнецова, В.Д.Бабаджан, Н.В.Харченко. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля». 2013. 565 с.
6. Влізло В. В. Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізло, І. А. Максимович, В. Л. Галяс, М. І. Леньо. Львів, 2008. 242 с.
7. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині/ В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін. ; За ред. В. В. Влізла. Львів: 2012. 759 с.