

Зміст

Вступ		3
Розділ I	Формування імуногенетики як науки. Завдання і методи	5
Розділ II	Генетичні системи крові	24
2.1	Загальна характеристика	24
2.2	Ізоантигени, ізоантитіла	26
Розділ III	Імуноглобуліни та гени, які їх кодують	47
Розділ IV	Система еритроцитарних антигенів людини (загальна характеристика)	64
4.1	Система АВО (структура, генетика, фізіологічна роль)	68
4.2	Методи визначення	95
4.3	Система резус(Rh-Hr) (Структура, генетика, фізіологічна роль)	110
4.4	Методи визначення	120
4.5	Інші системи еритроцитарних антигенів людини	127
Розділ V	Антигенний поліморфізм сироваткових систем крові	145
5.1	Поліморфізм сироваткових білків	145
5.2	Поліморфізм групи ізоферментів	155
Розділ VI	Головний комплекс гістосумісності	181
6.1	Загальна характеристика	181
6.2	Молекулярна структура антигенів ГКГС	187
6.3	Структура генів ГКГС	191
6.4	Сучасні методи гістотипування	210
Розділ VII	Генетичний контроль імунної відповіді. Загальна характеристика	223
7.1	Імунокомпетентні клітини і генетична детермінація імунної відповіді	237
7.2	Лімфоцити	239
7.3	Мононуклеарні фагоцити	258
7.4	Вторинні посередники регуляції активності імунної відповіді (цитокіни)	289
7.5	Система комплементу	309
Розділ VIII	Трансплантаційна імуногенетика	339
Розділ IX	Генетичні системи крові людини і можливі імуногенетичні механізми асоціації з захворюваннями	368
Розділ X	Імуногенетичні аспекти радіаційної генетики	387

Розділ XI	Популяційна імуногенетика	408
11.1	Геногеографія і поліморфізм генетичних систем крові	408
11.2	Популяційна генетика антигенів генетичних систем крові людини	419
Розділ XII	Математичні основи імуногенетичного аналізу	433
Словник		442

ВСТУП

Імуногенетика відноситься до швидко прогресуючої біологічної науки, фундаментальні і прикладні напрямки якої, пронизують як практичну так і теоретичну медицину. Як фундаментальна наука вона розкриває механізми розвитку багатьох захворювань, а також таких загально патологічних процесів, як запалення, регенерація, проліферація, метаплазія і склероз (склерогенез). Прикладна імуногенетика присвячена вирішенню питань практичної медицині, які пов'язані з проблемами трансплантації органів і тканин, онкології і гематології, первинної і вторинної імунної недостатності, патологія вагітних і новонароджених та ряду інших задач. Роботи, які розпочалися як імунологічні не тільки за методами, але й за цілями забезпечили неоціненну практичну віддачу і зараз є також дуже перспективними напрямками сучасної фундаментальної генетики. Їх результати показали, зокрема, існування у вищих тварин дуже складних, виключно поліморфних імуногенетичних систем, які контролюють синтез великого різноманіття структурних і функціональних білкових гомологів. Подальше дослідження таких систем буде сприяти розвитку уявлень про організацію геному, тонку будову складних генетичних локусів і регуляцію активності генів еукаріот.

Внутрішньовидова мінливість макромолекулярних біохімічних ознак чітко спадково детермінована та імунологічно виявляється у вигляді генетичних систем антигенів. Майже кожний успіх імуногенетики як у фундаментальному, так і у практичному плані у кінцевому рахунку можливий тільки в результаті виявлення нових систем антигенів – предмета та інструмента імуногенетичних досліджень. У процесі виявлення аналізу таких систем розкривається базисна імуногенетична феноменологія, яка у подальшому використовується для всього різноманіття інтерпретацій і

додатків, подібно до того як це відбулося після відкриття поліморфізму головних комплексів гістосумісності ті імуноглобулінів.

Таким чином, з позицій сучасних набутків молекулярно-генетичних біотехнологій, імуногенетика є перспективним аспектом фундаментального і прикладного дослідження імунного гомеостазу організму людини і тварин з позицій розширення уявлення про генетичні механізми формування типу і сили імунологічного реагування організму і застосування біологічних лікувальних засобів, зокрема трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин. Тому подання матеріалу в даному підручнику базується на позиціях як фундаментальної так і прикладної імуногенетики.

Курс “Імуногенетика” викладається на факультеті біомедичних технологій Відкритого міжнародного університету розвитку людини “Україна” і на кафедрі загальної та молекулярної генетики біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка протягом багатьох років існування кафедри. Автори мають надію, що, запропонований підручник буде корисним для фахівців біології і медицини в формуванні сучасних уявлень про основні положення даної науки.

Головне завдання авторів підручника полягало у тому, щоб з великої кількості найновішої інформації відібрати основні перевірені факти, ідеї, та гіпотези, які визначатимуть сучасний стан і подальший розвиток фундаментальних і прикладних аспектів імуногенетики в галузях імунології і генетики.

В усіх розділах найважливіші положення виділені курсивом. Для ефективнішої оцінки засвоєння прочитаного тексту самим читачем у кінці кожного розділу наведені питання для самоконтролю. Пояснення багатьох термінів читач може знайти у “Словнику імуногенетичних термінів” в кінці підручника.

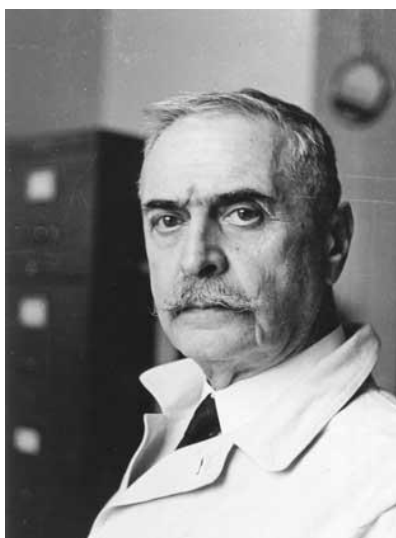
Автори мають надію, що запропонована книга допоможе студентам природознавчих факультетів в освоєнні основних положень і законів

імуногенетики і буде корисною фахівцям біологам і медикам різних спеціальностей, які мають бажання увійти в коло сучасних знань в галузі імуногенетики.

РОЗДІЛ І

ФОРМУВАННЯ ІМУНОГЕНЕТИКИ ЯК НАУКИ. ЗАВДАННЯ І МЕТОДИ.

Серед інших біологічних дисциплін імуногенетика відносно молода наука. Вона зародилася на початку минулого століття, коли Ландштейнер у 1900 р. відкрив групи крові людини, відкриття яких сприяло формуванню нових напрямків фундаментальної імунології – імуногематології, трансплантології і саме класичної імуногенетики, яка об'єднала всі ці напрямки з позицій генетичної детермінованості імунологічної відповіді на дію екзогенних і ендогенних агентів, несумісних за антигенною специфічністю.



Карл Ландштейнер
(Landsteiner)
(14 червня 1868 р. –
26 червня 1943 р.)

Австрійсько-американський бактеріолог та імунолог Карл Ландштейнер народився у Відні, в родині газетного видавця і журналіста Леопольда Ландштейнера і Фані Ландштейнер (Гесс). Коли Карлу було шість років, його батько помер, і хлопчика виховувала матір.

У 1885 р. по закінченню гімназії Ландштейнер вступив до медичної школи Віденського університету, а у 1891 р. одержав медичний диплом.

Тоді ж він зацікавився хімією, яку вивчав ще протягом п'яти років у Вюрцбурзі, Мюнхені і Цюриху. У 1896 р. він повернувся до Відня і став працювати на кафедрі гігієни Віденського університету, де зацікавився імунологією.

У той час коли Ландштейнер робив перші кроки в імунології, вона тільки ставала науковою дисципліною. У 1890 р. Еміль фон Беринг виявив, що імунітет до захворювань, який виникає після вакцинації або перенесення хвороби, обумовлений тим, що в організмі починають вироблятися антитіла, які взаємодіють з проникаючими в середину хвороботворними мікроорганізмами чи їх токсинами і тим самим знезаражуючими їх. Шість років потому Жюль Борде показав, що переливання тварині одного виду крові тварини іншого виду зазвичай призводить до аглютинації («злипання») і руйнуванню еритроцитів. Борде зрозумів, що такі ефекти викликаються антитілами, які утворюються у тварини-реципієнта та атакуються білки або антигени крові тварини-донора.

У перших дослідженнях з вивчення дії антитіл, проведених у 1896 р., Ландштейнер встановив, що лабораторні культури бактерій можуть бути аглютиновані шляхом додавання імунної сироватки крові. Оскільки він бажав повністю зосередитись на вивченні імунітету, він у 1898 р. перейшов на кафедру патологічної анатомії Віденського університету. Тут він розпочав працювати під керівництвом Антона Вейхсельбаума, вченого, який виявив збудника менінгіту та пневмонії.

В якості асистента Вейхсельбаума Ландштейнер провів 3639 розтинів, що дозволило йому глибоко вивчити медицину і патологію, а також здобути значний патолого-анатомічний досвід. Не дивлячись на те що науковим напрямком кафедри Вейхсельбаума було вивчення патологічної анатомії, він дозволив Ландштейнеру продовжувати працювати в області фізіології та імунології. У 1900 р. вчений опублікував статтю, у додатку до якої

розкрилась сутність одного з його визначних відкриттів: аглютинація, що відбувалася під час змішування плазми (рідкої частини крові, яка залишається після видалення її формених елементів) однієї людини та еритроцитів крові іншої людини, – це фізіологічне явище.

Через рік Ландштейнер описав простий спосіб поділу крові людини на три групи: А, В і С (остання група в подальшому стала позначатися як О). Пізніше з'явилася четверта група – АВ. Для поділу крові на групи змішували еритроцити з пробними сироватками – так званими сироватками анти-А та анти-В. Ландштейнер виявив, що еритроцити групи О не аглютинують з жодною з сироваток; еритроцити групи АВ аглютинують з обома сироватками і т.д.

Не дивлячись на те, що метод визначення груп крові за Ландштейнером був впроваджений у практику лише через кілька років, він надав можливості безпечно переливати кров однієї людини іншій. У 1914 р. Річард Льюїсон виявив антикоагулюючі властивості цитрату натрію і прийшов до висновку, що додавання цієї речовини в кров попереджає її згортання. Тим самим був знайдений спосіб консервування крові і з'явилася можливість зберігання донорської крові за умови її охолодження до трьох тижнів. Це було великим досягненням, оскільки операції на серці, легенях і судинах, які раніше практично не проводились в наслідок великих крововиливів, тепер набули можливості. Крім того, з'явилась можливість повного обмінного переливання крові під час інтоксикацій і важкої жовтухи новонароджених.

Ландштейнер виказав припущення, що індивідуальні властивості крові проявляються в антигенних особливостях. Він припускав, що за цими особливостям, як за відбитками пальців, можна відрізнити одну людину від іншої.

У 1930 р. Ландштейнеру була присуджена Нобелівська премія з фізіології і медицини «за відкриття груп крові людини». У Нобелівський

лекції Ландштейнер, говорячи про групи крові, сказав: «Удивительным было то, что, когда агглютинация происходила, она была выражена так же, как уже известная реакция взаимодействия между сывороткой и клетками животных разных видов». Відкриття Ландштейнером груп крові поклато початок новим напрямкам досліджень в численних наукових галузях і дозволило досягти значних успіхів у практичній медицині.

У 1940 г. Ландштейнер та його колеги Олександр Вінер і Пилип Левін описали ще один фактор крові людини – так званий резус, або *Rh*-фактор. Був виявлений зв'язок між цим фактором і гемолітичною жовтухою новонароджених. Виявилось, що якщо у матері відсутній резус-фактор (тобто резус-фактор негативний), то резус-позитивний плід може бути причиною утворення у матері антитіл проти резус-фактора плода. Такі антитіла викликають гемоліз еритроцитів плода, в результаті цього гемоглобін перетворюється на білірубін, що й є причиною жовтухи.

У 1916 р. Ландштейнер одружився з Хелен Влатсо. У їхньому шлюбі народився один син.

26 червня 1943 р. Карл Ландштейнер помер у Нью-Йорку під час серцевого нападу в його лабораторії.

На протязі життя Ландштейнер був удостоєний таких нагород і почесних звань, як Берлінська премія Фонду Ганса Аронсона (1926), золота медаль нідерландського товариства Червоного Хреста (1933), премія Камерона і звання почесного лектора Единбургського університету (1938). Він був також кавалером французького ордена Почесного легіону, членом Національної академії наук США тощо.



Бельгійський бактеріолог та імунолог Жюль Джин Баптист Вінсет Борде народився у Сойгні і був другим сином Шарля Борде, шкільного вчителя, і Селестини (Ванденейбіл) Борде.

Коли Жулю виповнилося 6 років, родина переїхала до Брюсселя, де згодом

Борде вивчив механізм захисту бактерій від поглинання їх іншими клітинами. Результати його досліджень були опубліковані у 1892 р.: в цьому ж році він одержав медичний вчену ступінь і своєю працею звернув увагу Іллі Мечникова. Влада Бельгії надала Борде стипендію, яка дозволила йому працювати в лабораторії Мечникова в Інституті Пастера у Парижі в 1894 р.

Борде розробив метод діагностики за допомогою сироватки крові тварини, у якої був вироблений імунітет до певного виду мікроорганізмів. Згодом серологічний метод (*serum* по-латині – сироватка) стали застосовувати в найрізноманітніших галузях медицини і біології.

Борде вдалося показати, що антитіла утворюються в організмі не тільки після введення хвороботворних мікробів, але й після введення клітин вищих організмів іншого виду (зокрема, еритроцитів). Еритроцити виявились дуже зручною моделлю для дослідження імунних реакцій *in vitro*. Кількість внесених в реакційну суміш еритроцитів легко можна підрахувати. На протязі руйнування еритроцитів під впливом антитіл середа інтенсивно забарвлюється гемоглобіном. Розрахувавши ступінь забарвлення, можна одержати кількісну характеристику інтенсивності імунної реакції.

Під час дослідження механізму імунних реакцій Борде звернув увагу, що для руйнування хвороботворних мікроорганізмів, крім антитіл, у сироватці крові необхідний ще один білковий компонент, який згодом одержав назву комплементу. Комплемент складається з цілого комплексу білків, кожний з яких вмикається в комплекс «антиген-антитіло» на певній стадії імунної відповіді.

У 1900 р. Борде показав, що комплемент зв'язується з чітко визначеними антигенами на поверхні клітини мікроорганізму. Нобелівська премія 1919 р. (медицина) за відкриття в галузі імунології, зокрема – за відкриття системи комплементу.

Після першої світової війни Борде починає вивчати взаємодію між бактеріями і бактеріофагами (вірусами, які вражають бактерії). Його експерименти зі спадковості бактеріальних клітин лізогенії (здатності викликати руйнування клітин) допомогли закласти основу успіхів в молекулярній генетиці в середині ХХ ст.

Серед багато чисельних нагород Борде – премія міста Парижа (1911), премія Хансена, медаль Пастера Шведського медичного товариства (1913). Він був членом Бельгійської королівської академії, почесним членом Лондонського та Единбургського королівських товариств, Французької медичної академії та американської Національної академії наук; удостоєний почесних звань університетів Кембриджа, Парижа, Страсбурга, Тулузи, Единбурга, Нансі і Квебека, а також багатьох інших наукових центрів.

Перші кроки імуногенетики були присвячені вивченню еритроцитарних генетичних систем крові людини. Так були відкриті системи MN; P; Rh-Hr; потім були ідентифіковані антигени систем Lewis; Lutheran; Kell; Daffy; Kidd та інші. Ці нові дані знайшли своє відображення в інших галузях фундаментальної і прикладної науки, зокрема в антропології (була дана генетична характеристика окремим расам), в генетиці (кожна генетична система крові надала змогу дати назву новим хромосомам. Але найбільш перспективним цей напрямок став для прикладної медицини, оскільки наукові набутки склали основу впровадження в лікування хворих компонентів крові, стовбурових гемопоетичних клітин кісткового мозку і периферичної крові, діагностика і подолання імунологічних конфліктів в системі мати-плід. Як фундаментальна наука імуногенетика заявила про себе після відкриття головного комплексу гістосумісності і встановлення його ролі в генетичній підтримці імунного гомеостазу.

Перший лейкоцитарний антиген було ідентифіковано Ж.Доссе у 1952 році і подальші дослідження дозволили вченому висловити припущення

відносно того, що саме лейкоцитарні антигени є фактором, який дозволяє відрізнити особисті тканини від тканин організму іншої людини.

Французький біолог Жан Баптист Габріель Іоакім Доссе народився у Тулузі і був четвертою дитиною у Генрі П'єрра Джуліуса Доссе, заможного лікаря-ревматолога, й Елізабет (Брулярд) Доссе. Перші роки свого життя він провів у Біарриці. Коли йому виповнилося 11 років, родина переїхала до Парижу. Там він почав навчатися в ліцеї Мішеле, який закінчив з математичним дипломом. Маючи бажання продовжити справу свого батька, Доссе вступив до медичної школи Паризького університету наприкінці 30-х рр. На початку другої світової війни, у 1939 р., він був призваним на медичну службу до французької армії, а в наступному році, після окупації Франції Німеччиною, приєднався до Вільної французької армії на півночі Африки.

У Тунісі та у Франції Доссе спостерігав багато чисельні переливання крові, які викликали важкі реакції у пацієнтів, навіть якщо кров пацієнта і донорська кров належали до однієї і тієї ж групи. Пізніше він описав такі несприятливі реакції, пояснивши їх особливостями крові донорів, у плазмі яких знаходяться активні анти-А антитіла. Він виявив, що такі антитіла з'являються після вакцинації дифтерійним і правцевим анатоксинами, які містять розчинний компонент, названий субстанцією А.

Після звільнення з військової служби у 1945 р. Доссе одержав медичний ступінь у Паризькому університеті, після закінчення якого в наступному році він був призначеним директором лабораторії Французького національного центра переливання крові. В середині 1948 р Доссе одержав відпустку і стипендію для вивчення імуногематології в Гарвардському університеті, де пропрацював цілий рік. Після повернення до Центру переливання крові, він наприкінці 40-х і на початку 50-х рр. досліджував різноманітні біологічні аспекти переливання крові, зосередився на проблемі патологічних реакцій.

У 1958 р., коли Доссе приєднався до досліджень медичного факультету Паризького університету, він відкрив у французів ряд варіантів антигену на поверхні лейкоцитів. Для опису цих антигенів він використав позначення МАС (ініціали трьох донорів, у крові яких він виявив ці антигени). Анти-МАС антитіла утворилися під час переливання крові МАС-негативним реципієнтам від МАС-позитивних донорів.

Доссе відмітив, що переливання крові представляє собою різновид трансплантації органів. На початку ХХ ст. було виявлено, що тканини, пересажені від однієї до другої людини, майже завжди відторгаються, за виключенням випадків близького споріднення донора і реципієнта (особливо близнюкової ідентичності). Доссе припустив, що МАС-антиген є одним з факторів, за допомогою якого організм може відрізнити свої власні тканини від тканин іншого організму.

Після відкриття Доссе варіантів МАС-антигену інші дослідники отримали дані про ново виявлені антигени, які потребували свого пояснення. На робочому засіданні, організованому у 1965 р. Бернандом Амосом з метою координації дослідження гістосумісності (сумісності різних тканин, яка дозволяє успішно здійснювати операції трансплантації), Доссе припустив, що більшість цих антигенів формує частину єдиної системи у відповідності до теорії, яку запропонував Джордж Д. Снелл з його колегами в 40-х рр. Снелл тоді довів, що відторгнення тканини у мишей контролюється декількома фізично зв'язаними генами, названими **головним комплексом гістосумісності (ГКГС)**. Доссе припустив існування ГКГС у людей. Він вважав, що трансплантаційні антигени дуже різноманітні не тому, що чисельні варіантні форми (алелі) утворюються з одного набору генів. Стало зрозумілим, що, як і у мишей, у людини ГКГС складається з декількох генів, названих групою людських лімфоцитарних антигенів (*HLA*). Оскільки кожний ген зустрічається у вигляді великої кількості алельних форм, можливі мільйони різноманітних комбінацій антигенів системи *HLA*.

У 1967 р. Доссе та його колега Фелікс Т. Рапопорт розпочали дослідження трансплантації шкіри, яку проводили між членами одної родини. Їх результати свідчили, що трансплантації між членами родини, які мали однаковий тип *HLA*-антигенів, більш успішні, ніж у випадках відмінностей типу *HLA*-антигенів. Ці результати дозволили Доссе рекомендувати хірургам підбирати перед трансплантацією органи донорів з урахуванням типу *HLA*-антигенів. Техніка типування *HLA*-антигенів привела до значного збільшення життєздатності пересаджених органів, але лише у тих випадках, коли донор і реципієнт є родичами (краще за все – близнюками). Серед осіб, які не є родичами, генетичні різниці (інші, не ідентифіковані Доссе) викликали відторгнення трансплантата, не дивлячись на підбір за системою антигенів *HLA*. Деякі з цих генетичних відмінностей були обумовленими іншими генами системи ГКГС. У 1967 р. Амос і його колега Фріц Бах відкрили інший ген, названий *HLA-D* (бо він був четвертим описаним геном *HLA*), який є людським еквівалентом генів *IR* (імунної відповіді) у ГКГС мишей.

Барух Бенасерраф та інші дослідники виявили, що гени *IR* не тільки впливають на виживання трансплантованих органів, але й відіграють важливу роль у здатності організму здійснювати імунний захист проти певних хвороб. На початку 70-х рр. стало очевидним, що гени *HLA-D* є важливим фактором, який обумовлює зв'язок між типами *HLA* і певними хворобами.

У 1967 р. Доссе вперше дослідив взаємодію між системою *HLA* і виникненням низки захворювань, і, хоча ці результати були передчасними, його зусилля стимулювали роботу інших вчених. На підставі цих досліджень було показано, що деякі типи *HLA* зв'язані зі збільшеним ризиком розвитку низки хвороб, як ураження суглобів, цукровий діабет та автоімунні захворювання. Доссе припустив, що «кожен гаплотип *HLA* (група алелей, які були внесеними кожним з батьків)... має власну конфігурацію генів, яка

визначає специфічну здатність імунної реакції,сприятливої в одних навколишніх умовах і несприятливої в інших».

У 1968 р. Доссе призначається директором Французького національного інституту наукових досліджень. У цьому ж році він розпочав викладати імуногематологію – дисципліну, яка вивчає антигени та антитіла різних складових частин крові – у Паризькому університеті. Крім того, з 1978 р. він став професором експериментальної медицини в Колежі де Франс. На протязі 70-х рр. він також працював запрошуваним професором в університетах Нью-Йорка, Брюсселя і Женеві.

Функція продуктів генів МНС (антигенів) не була до кінця встановлена, але в середині 70-х рр. ряд вчених, у тому числі Бенасерраф, показали, що взаємодія між різними клітинами, особливо імунної системи, обмежена ГКГС, тобто обидві взаємодіючі клітини повинні мати одні й ті самі ж антигени ГКГС на своїх поверхнях. Доссе припускав, що «феномен рестрикції (обмеження) є найбільш вагомим доказом ролі продуктів комплексу *HLA* в імунній відповіді людини». Хоча ще потрібно було багато з'ясувати про структуру генів ГКГС, їх активності в організмі і шляхах керування ними для медичних цілей, стало очевидним, що ГКГС є центральною ланкою у розумінні імунної системи в цілому.

За свої багаторічні праці Доссе розділив Нобелівську премію з фізіології і медицини 1980 р. с Бенасеррафом і Снеллом «за открытия, касающиеся генетически детерминированных структур на клеточной поверхности, регулирующих иммунологические реакции». У доповіді на представлення Джордж Клейн з Каролінського інституту підкреслив важливість досліджень трьох лауреатів, «сумевших превратить то, что сначала казалось областью основных экспериментов на инбредных мышах, понятной лишь для немногих, в стройную биологическую систему, имеющую важное значение для понимания механизмов клеточного «узнавания», иммунных ответов и отторжения трансплантата».

Крім Нобелівської премії, Доссе одержав міжнародну нагороду Гарднеровського фонду (1977) і премію Волфа з медицини Ізраїльського фонду Волфа (1978). Він був членом Французької академії наук и медицини, Бельгійської королівської Академії медицини, почесним членом Югославської та Американської Академії наук та мистецтв, кавалером ордена Почесного легіону.

У 1962 р. Доссе одружився з Розе Майораль Лопез; у них народилися син і донька. Його багаторічним незмінним кредом було: «Vouloir pour valoir», що означає: «Чого забажаєш, того і досягнеш».

Після перших публікацій Ж.Доссе значне коло вчених в галузі генетики, імунології і гематології присвятили свої дослідження новому науковому напрямку, який в той час отримав назву імуногематологія. Так, голландським дослідником van Rood виділив першу систему лейкоцитарних антигенів – групу 4 (4a, 4b). Припущення van Rood відносно двохалельного поліморфізму даної системи отримало подальший розвиток. Міжнародні кооперативні дослідження розпочалися з 1964 року і незважаючи на досить короткий шлях розвитку знань відносно структури, функції і геномної організації системи HLA. На сьогодні дана система є найбільш вивченою і систематизованою не тільки у людини, але і у тварин. При врученні Ж.Доссе Нобелівської премії, вчений зазначив, що вивчення цієї системи є яскравим прикладом світового гуманітарного співробітництва, оскільки в даному випадку не потрібно було навіть патентувати дослідницькі результати. Були створені спеціальні міжнародні програми по дослідженню системи HLA з обов'язковим обговоренням на робочих нарадах. До цієї програми залучені Американська, Британська, Французька спільноти гістосумісності та імуногенетики, а також Європейська федерація імуногенетиків.

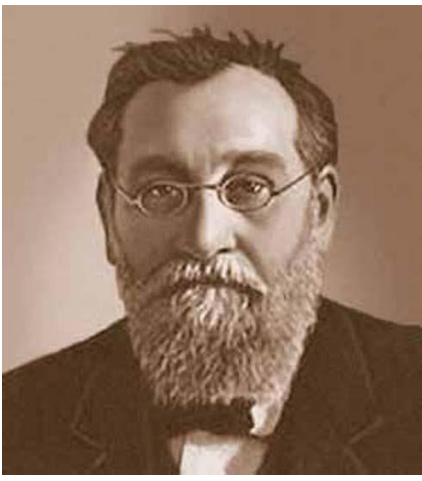
Базою для прогресу у цій науці є перш за все можливість співвідношення раніше і особливо знов одержаних за допомогою різноманітних імунологічних, молекулярно-генетичних і біохімічних методів.

Лавина фактів, методів, арсенал імуноактивних препаратів, який розширюється, інтерес клініцистів різних профілів до імуногенетики потребує створення і використання певних методологічних підходів до оцінки і систематизації фактів, раціонального підходу як до застосування методів імунодіагностики та імунотерапії, так і до розуміння ролі імунних процесів у патології.

Імуногенетика тісно пов'язана як з імунологією, так і з генетикою. Вона відноситься до швидко прогресуючих напрямків сучасного природознавства. За останні роки імуногенетика перетворилася на фундаментальну біологічну науку, всі розділи якої пронизують практичну і теоретичну медицину. З сучасних позицій вона розкриває механізми розвитку багатьох захворювань, а також таких загально патологічних процесів, як запалення, регенерація, проліферація, метаплазія і склероз (склерогенез). Питання практичної медицини: проблеми трансплантації органів і тканин, онкології і гематології, первинної і вторинної імунної недостатності, патологія вагітних і новонароджених та ряд інших задач, є стимулом для розвитку імуногенетики.

Головний і перший принцип вивчення генетичних особливостей імунної системи – використання системного підходу, методів системного аналізу, системотехніки, математичного і кібернетичного моделювання. Ці узагальнення базуються на великій кількості фактів. Будь-який вплив на функції імунної системи (антигенний, гормональний, дія стрес-факторів і т. ін.) супроводжується загальною, системною реакцією імунітету.

Значний внесок у вивчення ролі імунітету в організмі вніс Мечников І.І. - російський мікробіолог і патолог, який одержав у 1908р. Нобелівську премію з фізіології і медицини (разом з [П.Ерлихом](#)) за дослідження природи імунітету. Він народився у с. Іванівка поблизу Харкова. У 1864 закінчив Харківський університет, стажувався в університетах Гіссена, Геттінгена і Мюнхена, вивчав ембріологію в Італії.



Мечников І.І.
(3 (15 травня)1845 – 2
(15)червня 1916)

У 1868 захистив докторську дисертацію у Петербурзькому університеті. У 1870–1882 був професором зоології Новоросійського університету в Одесі; успішно сполучав викладацьку діяльність з науковою роботою. У 1886 організував (разом з М.Ф.Гамалією) першу в Росії бактеріологічну станцію. У 1887 переїхав до Парижу, у 1888 прийняв запрошення Л.Пастера очолити лабораторію в його інституті. З 1905 – замісник директора цього інституту.

Перші роботи Мечникова присвячені зоології безхребетних (губок і кишковопорожнинних), еволюційної ембріології. Вчений розробив теорію походження багатоклітинних організмів (теорію фагоцителі), виявив явище фагоцитозу – активного поглинання часток і живих клітин одноклітинними організмами чи особливими клітинами – фагоцитами (такими клітинами є, наприклад, деякі типи лейкоцитів). На основі теорії фагоцитозу розробив теорію фагоцитарного імунітету і порівняльної патології запалення.

Теорія фагоцителі- гіпотеза походження багатоклітинних тварин, згідно якої, вихідною формою багатоклітинних є гіпотетична тварина - фагоцитела (або паренхімела). Фагоцитела складається (подібно до личинки сучасних нижчих багатоклітинних - паренхімулі) з шару поверхневих клітин - ектодерми, або кінобласта, і в середині клітинної маси - паренхіми, або фагоцитобласта. Кінобласт виконує функції обмеження, зовнішнього обміну і руху; фагоцитобласт - внутрішнього обміну, внутрішньоклітинного

травлення. З кінобласта і фагоцитобласта під час еволюції виникли всі різноманітні форми тканин багатоклітинних тваринних організмів.

Фагоцитозом називають процес активного захоплення і поглинання живих і неживих часток одноклітинними організмами або особливими клітинами (фагоцитами) багатоклітинних тваринних організмів. Явище Ф. було відкрите Мечниковим, який простежив його еволюцію і виявив роль цього процесу у захисних реакціях організму вищих тварин і людини, гол. чином під час запалення та імунітету. Велику роль фагоцитоз відіграє при загоєнні ран. Здатність захоплювати і перетравлювати частки лежить в основі харчування примітивних організмів. У процесі еволюції така здатність поступово перейшла до окремих спеціалізованих клітин, спочатку травним, а потім - до особливих клітин сполучної тканини. У людини і ссавців активними фагоцитами є нейтрофіли (мікрофага, чи спец. лейкоцити) крові і клітини ретикуло-ендотеліальної системи, здатні перетворюватись на активні макрофаги. Нейтрофіли фагоцитують дрібні частки (бактерії і т. п.), макрофаги здатні поглинати крупніші частки (мертві клітини, їх ядра або фрагменти і т. п.). Макрофаги здатні також накопичувати негативно заряджені частки барвників і колоїдних речовин. Поглинання дрібних колоїдних часток називають ультрафагоцитозом, або коллоїдопексією. Фагоцитоз потребує витрат енергії і пов'язаний перш за все з активністю клітинних мембран і внутрішньоклітинних органоїдів - лізосом, які містять велику кількість гідролітич. ферментів. Під час фагоцитозу розрізняють декілька стадій. На початку частка, що фагоцитується прикріплюється до клітинної мембрани, яка потім обволікає її та утворює внутрішньоклітинне тільце - фагосому. З оточуючих лізосом у фагосому потрапляють гідролітичні ферменти, які перетравлюють фагоцитуючу частку. В залежності від фіз.-хім. властивостей останньої перетравлення може бути повним чи неповним.

Всі імунологічні феномени є наслідком головних функцій імунітету – охорони стійкості внутрішнього середовища організму протягом всього

життя індивідуума від всього генетично чужорідного незалежно від природи походження. В цьому розумінні імунітет можна розглядати як один з боків єдиного біологічного закону збереження індивідуальності. Спадковість охороняє її в ряду поколінь, імунітет – протягом індивідуального життя організму.

Існує декілька визначень імуногенетики. Х. Фьюденберг зі співавторами у 1975 р. вважав, що імуногенетика є галуззю досліджень, в якій спадкові відмінності індивідуумів, або генетичний поліморфізм, вивчаються за допомогою імунологічних методів. Два інших автори, Клус і Джелл (1967 р.) визначають цей науковий напрямок як використання точної хімічної специфічності антисироваток для аналізу генетичних відмінностей між індивідуумами і філогенетичних взаємовідносин між видами. Найбільш узагальненим вважають визначення Р.В. Петрова (1976), згідно якого “сучасна імуногенетика вивчає закономірності успадкування антигенної специфічності і роль генетичних механізмів у здійсненні імунних реакцій”.

Слід підкреслити значення досліджень, які дозволили:

- описати чисельні закономірності головних комплексів гістосумісності у людини і миші і показати існування гомологічних систем у декількох інших видів ссавців;
- виявити генетичне різноманіття імуноглобулінів.

Ці роботи, які розпочалися як імунологічні не тільки за методами, але й за цілями забезпечили неоціненну практичну віддачу і зараз є також дуже перспективними напрямками сучасної фундаментальної генетики. Їх результати показали, зокрема, існування у вищих тварин дуже складних, виключно поліморфних імуногенетичних систем, які контролюють синтез великого різноманіття структурних і функціональних білкових гомологів. Подальше дослідження таких систем буде сприяти розвитку уявлень про організацію геному, тонку будову складних генетичних локусів і регуляцію активності генів еукаріот. У цьому розумінні важко переоцінити значення

нових досягнень молекулярної імуногенетики, в наслідок яких не тільки одержані прямі докази участі двох різних генів (константного і варіабельного) у кодуванні одного поліпептидного ланцюга імуноглобуліну, але й показана під роздільність варіабельного гена на просторово віддалені один від одного генні сегменти, які поєднуються у процесі дозрівання плазматичних клітин.

Внутрішньовидова мінливість макромолекулярних біохімічних ознак чітко спадково детермінована та імунологічно виявляється у вигляді генетичних систем антигенів. Майже кожний успіх імуногенетики як у фундаментальному, так і у практичному плані у кінцевому рахунку можливий тільки в результаті виявлення нових систем антигенів – предмета та інструмента імуногенетичних досліджень. У процесі виявлення аналізу таких систем розкривається базисна імуногенетична феноменологія, яка у подальшому використовується для всього різноманіття інтерпретацій і додатків, подібно до того як це відбулося після відкриття поліморфізму головних комплексів гістосумісності ті імуноглобулінів.

Очікується, що імуногенетичний аналіз різних таксонів ссавців дозволить не тільки розширити і поглибити знання, які можна одержати під час дослідження людини і лабораторних тварин, але й можливо розкрити принципово нові закономірності. Очевидна також доцільність імуногенетичного вивчення видів, які є об'єктами господарської діяльності людини. В племінному тваринництві актуальними є питання застосування груп крові в генетичному аналізі та селекції сільськогосподарських тварин, аналіз еволюційної і генетико-селекційної ролі поліморфізму еритроцитарних антигенів на прикладі різних видів тварин, імуногенетична оцінка консолідації генофонду порід і стад сільськогосподарських тварин. На сьогоднішній день проводять моніторинг між- та внутрішньопородної диференціації популяцій сільськогосподарських тварин за системами груп

крові та аналізують основні напрями використання груп крові для збереження генофонду тварин.

На сучасному етапі становлення імуногенетики виникла необхідність розробки єдиної міжнародної номенклатури антигенів HLA на основі порівняння антигенів, які були відкриті в різних лабораторіях світу. Цей етап був завершеним в 1967 році і результати були оприлюднені на Уоркшопі в Туріні. В генетичному відношенні даний етап має важливе значення ще тому, що були представлені чіткі докази того, що антигени, які відкрили в різних країнах є ідентичними і представлені в усіх популяціях світу.

Було показано, що основна генетична інформація відносно детермінації антигенів гістосумісності, вміщена в одному локусі, який розташований на одній парі аутосомних хромосом, а сам локус отримав назву Human Leukocyte A-system. Повний символ алельних специфічностей HLA комплексу, складається із 3 компонентів: об означення всієї системи; символу сублокуса; номера самого антигену.

Вирішення етапних завдань різних аспектів розвитку імуногенетики невід'ємно пов'язане з проведенням міжнародних Histocompatibility Workshops, кожний з яких мав свою мету і програму: порівняння і стандартизація методів гістотипування; офіційне затвердження номенклатури HLA; уточнення генетичної моделі HLA; створення розділу популяційної генетики; розробка аспекту HLA і хвороби – це досить неповний перелік завдань цих міжнародних нарад.

На сьогодні втілення нових молекулярно-біологічних технологій значно розширило можливості імуногенетичних досліджень, зокрема ідентифікація специфічності алелей і окремих генів здійснюється на рівні геномної ДНК, що потребувало розробки нової номенклатури для алельних генів і підходів до співставлення серотипів і генотипів HLA. Молекулярно-генетичне гістотипування дозволило підняти на новий рівень диференційну діагностику захворювань, які певним чином пов'язані з генетичною

схильністю саме до патологічного процесу, або з генетичною схильністю до розладів в імунітеті, який є патогенетичним субстратом формування конкретних захворювань. Не менш важливим є новий рівень ідентифікації генотипу донора-реципієнта при селекції сумісних пар для алогенної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин крові. Нові біотехнології також сприяють відкриттю нових генів комплексу гістосумісності та визначенню місця, яке вони займають в механізмах генетичної детермінації імунного гомеостазу людини. Таким чином, імуногенетика як наука на сьогодні складає динамічний аспект розвитку імунології і генетики, як причино щільно пов'язаних наукових дисциплін.

Питання для самоконтролю

1. Що означає термін “імуногенетика”?
2. Що вивчає імуногенетика?
3. Які відкриття дали початок розвитку імуногенетики?
4. Розкажіть про зв'язок імуногенетики з іншими науками.
5. Хто перший ідентифікував лейкоцитарний антиген?
6. Які проблеми вирішує імуногенетика у племінному тваринництві?
7. Назвіть сучасні напрямки імуногенетики.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Бойд У. Основы иммунологии. - М.: Мир, 1969. – 648 с.

2. Иммунология: В 3-х т. Т.1./Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987-1988. – 476 с.
3. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1982 г. - 368 с.
4. Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. – М.: Медицина, 1976 г. - 338 с.
5. Эфроимсон В.П. Иммуногенетика. - М.: Медицина, 1971 г. - 336 с.
6. <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=404>
7. <http://www.molbiol.ru/forums/index.php?act=ST&f=1&t=105003>
8. <http://n-t.ru/nl>

РОЗДІЛ II

Генетичні системи крові людини

2.1 Загальна характеристика

Історично, дослідження структури, функції, специфічності, спадкового наслідування генетичних систем крові започатковано з відкриття групових ізоантигенів еритроцитів. В 1901 році Лайндштейнером і Вінером була відкрита перша генетична система крові АВО, завдяки чому класична імунологія отримала новий фундаментальний напрямок в вивченні механізмів формування і реалізації імунної відповіді на чужерідні агенти різного походження, яка отримала назву - наука про ізоантигени і антитіла організму людини. Великий внесок в цю галузь імунології зроблено вітчизняними вченими, зокрема І.І.Мечніковим, який ще в 1900 році розробив цілу програму в дослідженні антигенних властивостей еритроцитів, що дало змогу підтвердити його погляд на імунітет як на загально біологічну властивість організму, а не як окрему функцію захисту від інфекції. Ще в той час в його лабораторії були отримані перші специфічні сироватки – антилейкоцитарні. Фактично, ці результати дали змогу вченим висунути припущення відносно можливості знайти специфічні антитіла, для будь-якої категорії клітин. З 1958 року, коли французький дослідник Ж.Доссе відкрив і описав перший антиген гістосумісності Мас, почалась нова наукова епоха класичної імунології -вивчення імунофенотипу і антигенної специфічності імунокомпетентних клітин. Саме завдяки бурному розвитку біотехнологій і дослідницької роботи багатьох лабораторій в різних країнах, була підтверджена гіпотеза про генетичну детермінованість антигенів гістосумісності, яка має певну організацію – кожний з генів, який складає комплекс гістосумісності, має своє функціональне представництво на клітинній мембрані у вигляді антигена гістосумісності з певною

специфічністю. Були висвітлені нові аспекти механізмів антигенного диференціювання на рівні некомітованих і частково комітованих гемопоетичних клітин.

На сьогодні відомо, що антигенне диференціювання не обмежується виключно форменими елементами крові, а розповсюджується і на всі інші клітини організму, наприклад сперматозоїди, сироваткові білки, секрет. Тому, обмежувати поняття антигенного диференціювання організму виключно „групами крові” не є точною характеристикою цього явища.

Наявність внутривидової біохімічної антигенного диференціювання притаманне не тільки організму людини. Це явище має загально біологічний характер. Антигенні відмінності всередині виду свідчать, в певній мірі про те, що самі види продовжують розвиватися еволюційно у відношенні своєї біохімічної антигенної структури, створюючи велику різноманітність внутрішньовидових антигенних властивостей. Ми не маємо підстав для сумнівів в тому, що причиною створення внутрішньовидових біохімічних ознак антигенних структур є чинники зовнішнього середовища. Під впливом останніх склалися різноманітні антигенні структури, які закріплювалися спадково і передавалися нащадкам.

Даний розділ присвячений розгляду антигенного поліморфізму клітин крові людини, зокрема генетичних систем еритроцитів, який відіграє важливу роль в забезпеченні стабільності імунного гомеостазу. Саме інтенсивність антигензалежного антитілогенезу, авидність продукованих антитіл, ступінь ізосенсибілізації організму характеризують імунологічні порушення, викликані ізоімунізацією до тканинних антигенів. Тобто імуногенетичні аспекти поліморфізму генетичних систем крові вміщують в себе і ізосерологічну характеристику продукованих антитіл, що є необхідною умовою оцінки специфічності і активності антитілогенезу з позицій загальної імунології. Оскільки антигени генетичних систем крові є в імунологічному розумінні повноцінними антигенами, то розглядання закономірностей

імунологічного реагування організму людини на екзогенне втручання інородних агентів є загальним і для повноцінних антигенів іншого походження.

Таким чином, імунологія ізоантигенів і ізоантитіл виникла в тісному зв'язку з розвитком загальної імунології і стала її розділом, вивчення якого базується на основних категоріях імунологічних понять – антигени, антитіла, специфічність і інші, які мають виключне значення при дослідженні ізоантигенної диференціювання організму людини.

2.2. Ізоантигени і ізоантитіла.

Поняття „антиген” було сформульовано Deutsch, 1899, яке з того часу стало загальноприйнятим. За даним поняттям **антиген є речовиною, яка має дві основні властивості: здібність викликати утворення антитіл поза шлунково-кишкового тракту і здібність з'єднуватись з антитілами.**

Антигени, яким властиві саме ці якості мають назву **повноцінних антигенів**. Антигени, які мають лише здібність з'єднання з антитілами мають назву – **неповноцінних**. Виходячи з цього поняття, всі антигени груп крові людини є **повноцінними антигенами**.

Згідно законам класичної імунології імунологічне реагування організму на чужерідні агент відбувається на рівні двох тісно пов'язаних між собою ланок імунного гомеостазу – на рівні клітинного реагування і на рівні синтезу специфічних антитіл. Сама поява антитіл є по суті заключним етапом цілої низки клітинних, міжклітинних і молекулярних взаємодій, які відбуваються в строгій послідовності.

Цей процес відбувається у декілька етапів:

- Розпізнавання антигену T-клітинами і перехід, останніх в активований стан;*
- взаємодія T-клітин з антигенпрезентуючими B-клітинами;*

- Проліферація активованих В-лімфоцитів і диференціювання останніх в антитілосинтезуючі клітини;

- синтез специфічних антитіл;

Таким чином, синтез специфічних антитіл є заключним проявленим етапом імунологічного реагування організму і класифікований як **гуморальний імунітет**.

В даному розділі ми розглядаємо виключно імуногенетику основних генетичних систем крові, але повинні мати на увазі, що ізоантигенне диференціювання організму не обмежується лише форменими елементами крові, а розповсюджується і на інші клітини, наприклад, сперматозоїди, тканини органів, білки сироватки крові, різні секрети і екскрети – слину, шлунковий сік, жовч, амніотичну рідину. **Розрізняють повноцінні і неповноцінні антигени.**

Повноцінні антигени за хімічною природою є білками за винятком протамінів і гістонів, які мають виражені основні властивості, а також желатина, білка, який є продуктом гідролізу колагену. При гідролітичному розчепленні білків, а також рацемізації (обробки лужними розчинами) вони втрачають свою здібність викликати продукцію антитіл. Амінокислоти антигенних властивостей не мають. Окрім білків повноцінними антигенами є високомолекулярні вуглеводи – полісахариди. Ліпіди, які відокремлені від білків мають властивість **неповноцінних антигенів**.

Ще дослідженнями Landsteiner та інших дослідників було показано, що специфічність антигену визначається не всією білковою молекулою, а лише певною її частиною, яка є активною хімічною групою і відповідає саме за специфічність. Ця група була визначена як **детермінантна група**, або **антигенна детермінанта**.

У білкових антигенів функцію антигенних детермінант несуть різні комбінації амінокислот, у комплексних – вуглеводи. Так, наприклад у детермінанти антигену Н важливу функцію виконує 1-фукоза, в детермінанті

групового антигену А цю функцію несе N-ацетилгалактозамін, в детермінанті В – d-галактоза. Таким чином, антигенні детермінанти можуть бути різними за хімічним складом і структурою.

Роботами Landsteiner було також показано, що антигенна детермінанта може бути отримана штучно при йодуванні, хлоруванні і діазотуванні білкових антигенів, але в даних умовах, отримані білки представляють собою антигени з новими специфічними детермінантними групами.

Можливе отримання **кон'югованого антигену**. Наприклад, якщо до метанілової кислоти приєднати конячий білок, остання починає виконувати в ньому функцію антигенної детермінанти. Антитіла, отримані до такого кон'югованого антигену, будуть реагувати з будь-яким білком, до якого приєднана метанілова кислота. Дана кислота сама по собі, без кон'югації з білками, також може вступати в реагування з відповідними антитілами і нейтралізувати їх, але без зовнішнього прояву цієї реакції. Зовнішнє ця імунологічна реакція може бути визначена лише у випадку сполучення з будь-якою високомолекулярною речовиною, наприклад, ліпідом, або полісахаридом. Такий комплекс антигенної детермінанти має назву – **гаптен**. Наявність в гаптені антигенної детермінанти обумовлює високу специфічність антигену в різних імунологічних реакціях, але за відсутністю білка, гаптен сам не може викликати продукцію антитіл, тобто він є **неповноцінним антигеном**. Приєднання до гаптена білка (в даному випадку цей білок має назву „шлепер”- носій) додає йому властивості повноцінного антигену.

Антигенність різних речовин неоднакова. Вона залежить від природи саме антигену, імуногенних властивостей виду і індивідуальних особливостей організму. Основу імунологічного реагування організму складає саме поняття чужорідності по відношенню до антигену. Чим більш проявлена неспорідненість до антигену, тим скоріше і активніше продукуються специфічні антитіла. Це добре проілюстровано на прикладі

видового співвідношення: отримати ізоіммунні антитіла у антропоїдної мавпи по відношенню до сироваткових білків людини дуже складно, тоді як від кроликів їх отримати вельми легко.

Специфічність групових антигенів визначають полісахариди, з яких саме і побудовані їх антигенні детермінанти. Строма кожного еритроциту вміщує в себе велику кількість різних антигенів і за структурою і за специфічністю. Так, на поверхні еритроцитів знаходяться гетерогенні антигени, тобто загальні для людини і для тварин; знаходяться також і видоспецифічні антигени, зокрема ідентичні сироватковим білкам; строма еритроцитів представлена великою кількістю ізоантигенів внутрішньовидових групоспецифічних ознак людини. Їх кількість значно перевищує кількість вже визначених специфічностей різних сполучення яких і дають вельми велику кількість біохімічних структур, які притаманні людині.

Розміщені антигени на поверхні еритроцитів не за єдиним принципом, що і робить необхідним застосування в дослідженнях різних методів ідентифікації, зокрема, в певних випадках проведення попередньої обробки еритроцитів пепсинами.

Нездібність організму продукувати антитіла до антигенів, специфічні детермінанти яких є ідентичними до антигенних детермінант самого організму є твердо встановленим правилом. Організм може синтезувати ізоантитіла тільки при умові відсутності у нього антигенної детермінанти, яку несе антиген.

Але, на сьогодні представлено достатня кількість фактів, які свідчать про можливість викривлення імунологічних реакцій і утворення антитіл по відношенню до антигенів особистих клітин і тканин. Це явище відносять до розряду патологічних станів. Вважається, що здоровий організм не має клонів клітин, які продукують антитіла проти особистих компонентів. Реакцію можна назвати аутоіммунною, якщо імунокомпетентні клітини впливають на нормальні компоненти організму. При певних обставинах в

організмі можуть з'явитись нові клони клітин, які починають продукувати антитіла до особистих антигенів, тобто аутоантитіла, які і складають причину аутоагресивних захворювань. Як приклад добре вивчених патологій можна навести надбану гемолітичну анемію. Відомо, що коли особисті антигенні речовини наразити впливом вірусів, бактерій, лікарськими препаратами, фізико-хімічними чинниками, то можливе виникнення антитіл до цих змінних комплексів. Відносно певних генетичних структур крові, зокрема еритроцитів, вважається, що неушкоджені еритроцити не можуть мати аутоантигенних властивостей.

Мають місце також інші гіпотези. Наприклад, деякі автори вважають, що продукція аутоантитіл здійснюється не як результат реагування організму на аутоантигени, а внаслідок надлишкової продукції глобулінів (оскільки антитіла є білками глобулінової природи) з властивостями аутоантитіл, які можуть з'явитися в організмі людини і в нормальних умовах, але в невеликій кількості. Вважають за можливе також, що вплив екзогенних і ендогенних чинників може стати причиною змін у біосинтезі білків, зокрема γ -глобулінів, які набувають властивості з'єднуватись як з різними клітинними елементами самого організму (аутоантитіла), так і з іншими здорових осіб (ізоантитіла). Деякі антитіла з'являються в плазмі людини без явного контакту з відповідним антигеном. Існує декілька поглядів на це питання: одні автори вважають, що такий контакт відбувається непомітно, інші вважають, що такі антитіла є генетичними елементами, титр яких дорівнює титру антигенів.

Успадкування антигенної специфічності антигенів еритроцитів усіх генетичних систем здійснюється за кодомінантним типом, загальний принцип якого наведений на схемі:

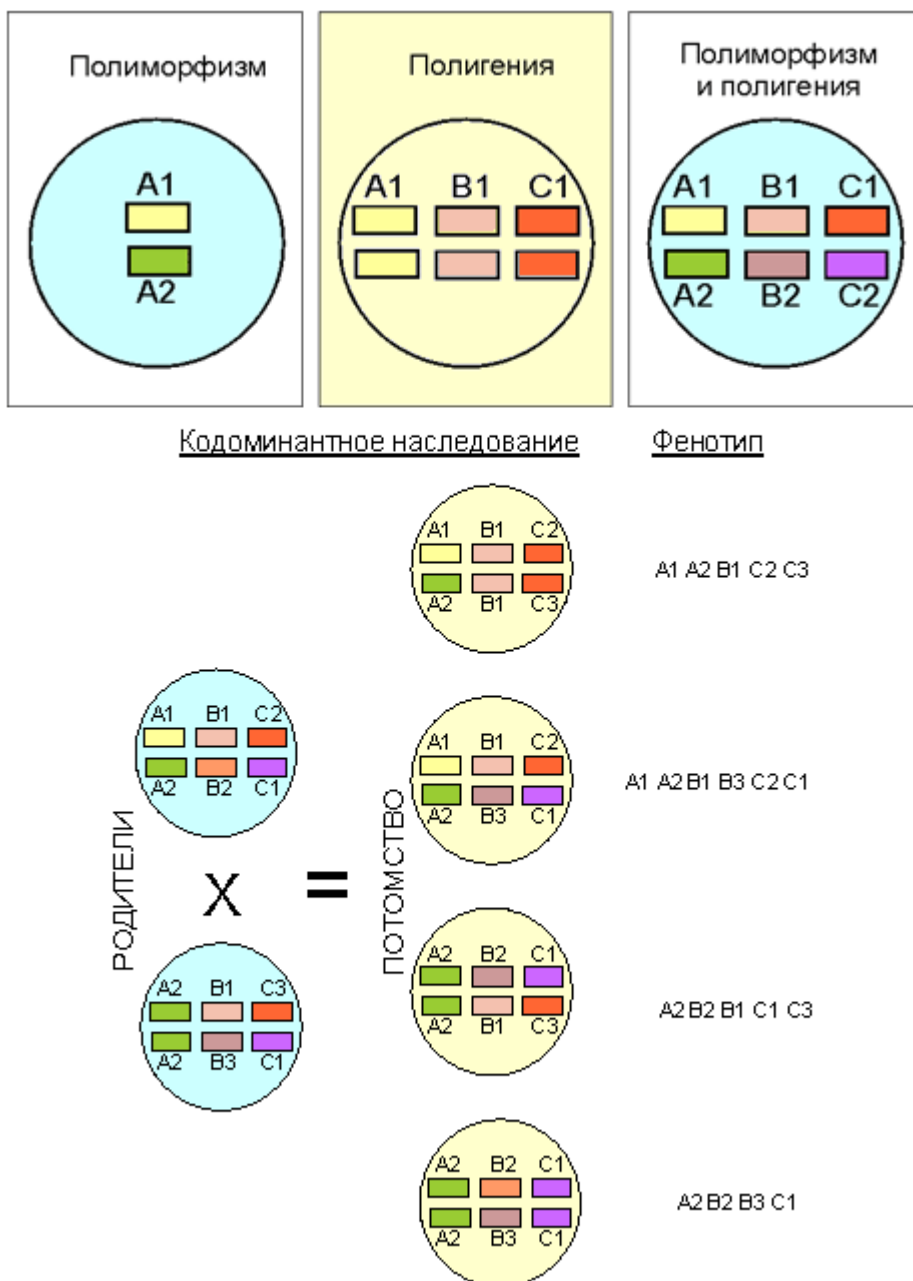


Рисунок 2.2.1 - Схема кодомінантного успадкування поліморфних і полігенних ознак, які визначають антигенну індивідуальність організму.

Відомі дві форми генетичної варіабельності ознак (антигенів, ферментів і інш.) - поліморфізм і полігенія. Поліморфізм визначає наявність багатьох алельних варіантів одного і того ж гену (на рис. A1, A2 і т.д.). Полігенією розуміють як наявність декількох неалельних близькозчеплених генів, які контролюють ізогенні ознаки (A1, B1, C1 або A2, B2, C2). **При кодомінантного успадкування сполучення поліморфізму і полігенії**

створює набір фенотипних ознак, які визначають індивідуальність осіб виду (на нижньої частині рисунку для простоти розуміння наведено спадкування лише двох полігенних і двох поліморфних генів). Схема демонструє виявлення індивідуальності потомства за гено- і фенотипом.

Антитіла

Антитіла являють собою сироваткові білки глобулінової природи, які мають здатність утворювати специфічні комплекси з відповідними антигенами.



Рисунок 2.2.2 – Серологічна характеристика антитіл

Специфічність, в силу якої антитіла можуть фіксуватись тільки на відповідних антигенах.

Авідитет (спорідненість), який характеризує швидкість фіксації на відповідному антигені і силу серологічної реакції. Вірогідність дисоціації комплексу антиген-антитіло зворотно пропорційне їх авідитету.

Температурний оптимум є відмінним для конкретних антитіл. Окремі з них діють лише при низькій температурі (холодові); інші при температурі тіла (теплові). Максимальна температура, при якій антитіла зберігають свою активність визначає їх термічну амплітуду.

Оптимум рН;- є відмінним для конкретних антитіл. Одні з них діють лише в кислому середовищі, інші – в лужному.

Титр – найбільше розведення сироватки, яка вміщує антитіла, при якому ще їх дія може бути визначена.

Антитіла розрізняють за механізмом їх взаємодії з антигенами.

Так, антитіла, які нейтралізують токсини бактеріального, тваринного, або рослинного походження мають назву **антитоксини**, а антитіла, які мають здібність осаджувати антигени – **преципітини**. **Аглютинінами** називають антитіла, які мають здібність викликати аглютинацію мікробів, еритроцитів і інших клітин крові і організму. Розрізняють багато варіантів антитіл, які розчинюють корпускулярні елементи: **гемолізینی, бактеріолізینی, цитолізینی та інші**. **Гемолізینی** зустрічаються значно рідше ніж аглютиніни, їх дія проявляється в лізисі клітини. **Опсоніни** сприяють фагоцитозу еритроцитів лейкоцитами.

За механізмом синтезу розрізняють природні і ізоімунні антитіла: характерною серологічною ознакою **природних антитіл** є той факт, що їх температурний оптимум має температуру нижчу за температуру тіла. На практиці це має велике значення, оскільки при ідентифікації таких антитіл їх титр буде тим вище чим більше температура реакції буде наближатись до 16 °С. Тобто це і є холодіві антитіла.

Класичним прикладом природних антитіл є ізогемаглютиніни. За нормальних умов в крові людей повинні бути присутні антитіла до антигенів системи АВО. Їх відсутність вважається генетичною ознакою, яка успадковується від батьків. У осіб групи АВ викликати продукцію даних антитіл неможливо. Специфічність цих антитіл значно вище ніж

специфічність ізоімуних антитіл проти антигенів еритроцитів, при імунізації тварин. Інколи також можна зустріти антитіла до антигенів систем MN; P; Le^a і Le^b, а також до анти-Н.

Ізоімуні антитіла відрізняються в серологічному відношенні від **природніх** тим, що їх температурний оптимум дорівнює температурі тіла (теплові антитіла). Прикладом ізоімуних антитіл в межах генетичних систем крові можуть слугувати аглютиніни анти-резус, лімфоцитотоксини, тромбо і лейкоагглютиніни.

Диференціювання антитіл за серологічною характеристикою: на початку імунного реагування на антигенну стимуляцію з'являються антитіла, які здатні реагувати незалежно від характеру середовища (**повні антитіла**). У випадку продовження сенсibiliзації серологічні ознаки антитіл змінюються - з'являються антитіла, які здатні викликати аглютинацію лише в певному середовищі (сироватка, плазма, альбумін, сік акації, декстран, желатин). У солевому середовищі такі антитіла фіксуються на еритроцитах, але не викликають їх аглютинації (сенсibiliзують еритроцити). Саму аглютинацію вони можуть здійснювати при умові обробки еритроцитів протеолітичними ферментами. Такі антитіла мають назву **неповних**.

Розрізняють **гетероантитіла** - продукуються виключно до еритроцитів тварин іншого виду; **ізоантитіла** - продукуються до еритроцитів певних групових антигенів; **аутоантитіла** – специфічні групові ізоантитіла, які продукуються до ізоантигенів особистих еритроцитів; **неспецифічні** антитіла – продукуються до всіх видів еритроцитів.

Хімічна природа антитіл.

За хімічною природою і імунобіологічними властивостями всі антитіла відносяться до класу імуноглобулінів. У білковому спектрі крові глобуліни являють собою грубодисперсні системи білків на відміну від тонкодисперсних – преальбумінів, альбумінів, швидких і повільних пост альбумінів.

В нормальних умовах співвідношення тонкодисперсних і грубодисперсних білків збалансоване. При електрофоретичному розділенні сироватки крові здорових осіб на протеїнограмі ідентифікується від 18 до 25 білкових фракцій, які розрізняють за електрофоретичним посуванням, за молекулярною вагою, за розміром білкових молекул, за коефіцієнтом седиментації за хімічною структурою, за кількістю. Наприклад, сама швидка фракція білкового спектру має коефіцієнт електрофоретичного посування $R_T=2.47$, належить до α_1 -глікопротеїдів, розміщується у преальбуміновій зоні, кількість білка складає від 2.5 до 4.5%. Далі йде альбумін, слідом - α_1 - α_2 -глобуліни. Далі йде трансферин- $R_T=1.0$, який відноситься до швидких β -глобулінів і має константний коефіцієнт рухомості, відносно якого і ідентифікуються інші білкові фракції за електрофоретичною рухомістю. Слідом розташована фракція швидких посттрансферинів, яка утворена β_1 фракцією IgA; далі розташовані повільні посттрансферини – які представлені фракціями швидких імуноглобулінів G,M,A; далі представлені α_2 -макроглобуліни і β_1 -ліпопротеїди. Електрофоретична рухомість зменшується вже в ділянці швидких імуноглобулінів $R_T=0.62$, а останні фракції мають $R_T=0.05$. В умовах гіперімунізації організму природний баланс між тонкодисперсними білками і грубодисперсними порушується, що спричиняє не тільки зміни в імунному гомеостазі, але і в білковому обміні. Процес продукції антигензалежних імуноглобулінів за суттю відображає процес продукції антиген залежних антитіл. Однак, сам процес нарощування кількості грубодисперсних глобулінів відбувається за рахунок різних глобулінових фракцій і відрізняється в кожному окремому випадку динамікою, швидкістю, інтенсивністю і стабільністю. Як правило, даний процес супроводжується продукцією нормальних неантигензалежних імуноглобулінів. При цьому відбуваються зміни в концентрації окремих класів імуноглобулінових молекул, в залежності від того, за якими серологічними ознаками продукуються антитіла. Існує думка, що ізо- і

аутоімунні антитіла у різних індивідів мають різну білкову структуру, яка в той чи іншій мірі пов'язана з усіма білковими фракціями і фракції альбуміну напевно приймають участь в формуванні ізоімунних антитіл.

Вище ми вже розглянули серологічну характеристику антитіл:

Повні (здібні реагувати незалежно від характеру середовища)

Неповні (сироватка, плазма, альбумін, декстран, желатин)

Розглянули розвиток серологічних ознак у динаміці. За класичною схемою імунної відповіді на початку ізоімунізації проявляються аглютиніни (повні антитіла), які здібні реагувати з форменими елементами крові, зокрема з еритроцитами, безпосередньо, незалежно від середовища. У випадку продовження сенсibilізації серологічні ознаки антитіл змінюються і з'являються гіперімунні антитіла, які мають здібність реагувати лише в певному середовищі і при певних умовах (неповні антитіла). В усіх випадках проявлення сенсibilізації організму супроводжується перерозподілом рівнів білків в ізольованих класах імуноглобулінів.

На сьогодні ідентифіковано п'ять класів імуноглобулінів.



Рисунок 2.2.3 – Класи імуноглобулінів

Імуноглобуліни розрізняються за фізико-хімічними властивостями: розмірами молекул, заряду, амінокислотному складу, вмісту вуглеводів, коефіцієнтом седиментації, середньої концентрації у сироватці, терміном піврозпаду.

Молекули імуноглобулінів мають властивість широкої гетерогенності не тільки між класами, але і в межах окремих класів (ізотипи). За електрофоретичною рухомістю імуноглобуліни зустрічаються в усіх фракціях білків нормальної сироватки, хоча існують певні генетичні відмінності між молекулами імуноглобулінів .

В імунологічному аспекті імуноглобуліни є біфункціональними:

- **Функція зв'язування з с антигеном**
- **Функція зв'язування з тканинами організму, з клітинами імунної системи (фагоцитами), з першим компонентом комплементу (C1g) при активації даної системи за класичним шляхом.**

Методом рентгеноструктурного аналізу визначена структура імуноглобулінів. Встановлено, що основна структурна одиниця імуноглобулінової молекули складається з двох важких і двох легких ланцюгів, які з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Молекула Ig кожного класу має свій характерний тип важкого ланцюга: IgG(γ), IgM(μ), IgA(α), IgD(δ) IgE(ϵ).

Всередині певних класів також існують різні варіанти важких ланцюгів, що обумовлює розділення на підкласи. Наприклад, IgG має підкласи - G1 (66%), G2(23%), G3(7%), G4(4%), кожний підклас має відповідні важкі ланцюги $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$, які за імунохімічною характеристикою визначаються як γ ланцюги, але мають певні імуногенетичні відмінності. Імуноглобулін IgA має два підкласи – A1(α_1) і A2(α_2). Дослідження серологічної характеристики (специфічності, авидітету, активності) антитіл в залежності від принадності

до певного підкласу імуноглобулінів показало, що при направленій активній імунізації, згідно законам класичної імунології першими проявляються повні антитіла IgM. Однак, у випадках наявності предсенсibiliзації організму, або внаслідок формування імунологічної пам'яті за умов попередньої ізоімунізації організму, можливий факт синтезу специфічних антитіл IgG вже впродовж першого тижня імунізації.

IgG(γ) – головний ізотип імуноглобулінів нормальної сироватки людини, який складає 70-75% загальної кількості імуноглобулінів організму людини. Чотирьох ланцюговий мономер. Коефіцієнт седиментації 7S, молекулярна маса 146 кДа. (рис. 2.2.4)

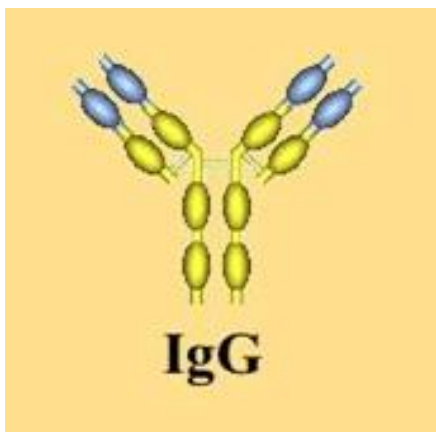


Рисунок 2.2.4 - Схематичне зображення молекули **IgG**

Молекули IgG рівномірно розподілені між внутрішньосудинним- і зовнішньосудинним пулом молекул і складають більшість антитіл вторинної імунної відповіді. Існує залежність продукції різних ізотипів імуноглобулінів IgG в залежності від причин ізоімунізації (направлена імунізація специфічним антигеном, або імуноконфліктна вагітність). В першому випадку переважно продукуються молекули IgG 1,2, в другому – IgG2,4. В

медичній практиці саме молекули імуноглобулінів класу G мають переважне значення, оскільки за розміром вони мають здібність проходити через біологічні бар'єри, зокрема через плаценту, чим, з одного боку забезпечують захист дитини, з іншого викликають небезпеку сенсibiliзації плода і розвиток гемолітичної хвороби у випадку імуноконфліктної вагітності. Крім того, титр специфічних антитіл цього класу має переважне значення при ізоімунізації організму людини будь яким антигеном, а також обумовлює активність препаратів, виготовлених з імуноглобулінової фракції крові.

IgM(μ), складає 10% від загального пула молекул (рис. 2.2.5).

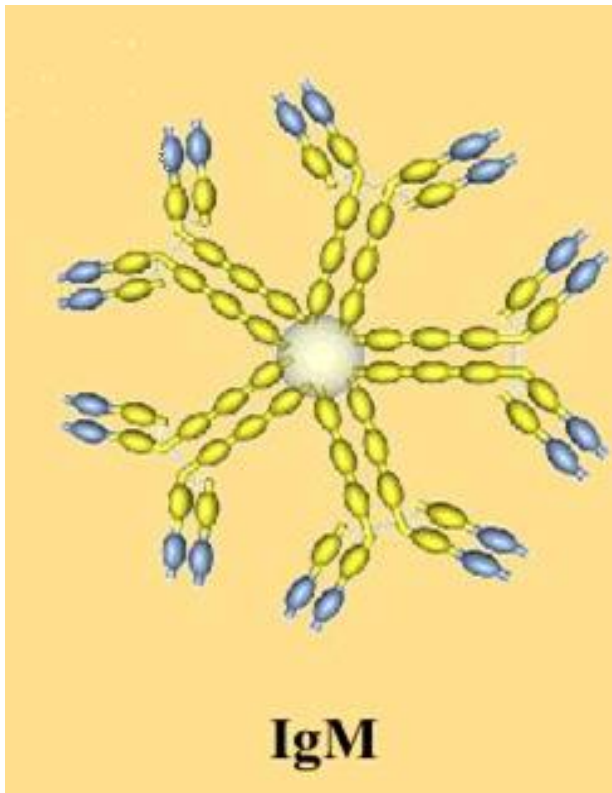


Рисунок 2.2.5 - Схематичне зображення молекули **IgM**

Молекула являє собою пентомер основної чотирьохланцюгової одиниці з молекулярною масою 146 кДа. В більшості розміщується в серединносудинному пулі імуноглобулінів. Вважаються ранішніми антитілами при первинній імунній відповіді, як у випадку проникнення

складних за антигенним складом мікроорганізмів, так і при імунізації тканинними антигенами.

IgA(α) являє собою мономер чотирьохланцюгової одиниці (80%) (рис.) і складає -15-20% від загального пула молекул.

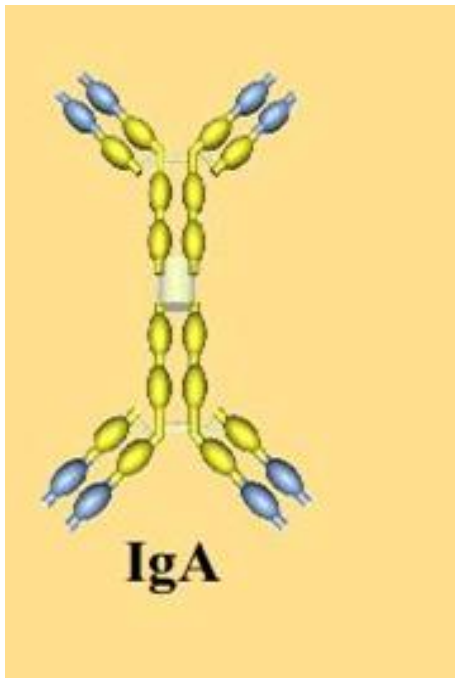


Рисунок 2.2.6 - Схематичне зображення молекули **IgG**

В сироватці інших ссавців IgA має полімерну структуру, найчастіше як димер чотириланцюгової одиниці. IgA презентує головний клас імуноглобулінів серозно-слизьових секретів (слина, молозиво, молоко, а також виділень слизової оболонки легенів і січе полові системи). Секреторні імуноглобуліни sIgA представлені димерною формою з коефіцієнтом седиментації 11S, молекулярною масою 385 кДа і представлені ізотипами A1(α 1) і A2(α 2).

IgD(δ) – Чотирьохланцюговий мономер (рис.), коефіцієнт седиментації 7S, кількісно дорівнює менш ніж 1% в загальному пулі молекул, але щільно

представлений на мембрані В-клітин. Імунобіологічна роль достатньо не визначена, але вважається, що саме ці молекули активно приймають участь в антигензалежній диференціації лімфоцитів.

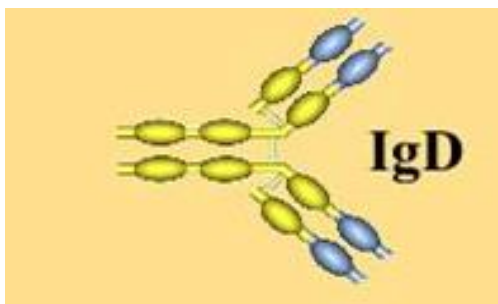


Рисунок 2.2.7 - Схематичне зображення молекули **IgD**

IgE (ε) – Чотириланцюговий мономер (рис 2.2.8), має слідові кількості в загальному пулі молекул, представлений на поверхні мембрани опасистих клітин і базофілів, а також IgE сенсibiliзовані клітини слизових оболонок носової порожнини, бронхів і кон'юнктиви. В світовій медичній практиці визнана пріоритетна роль IgE в патогенезі алергічних хвороб.

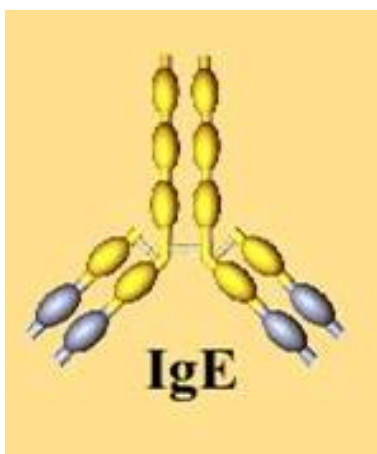


Рисунок 2.2.8 - Схематичне зображення молекули **IgE**

Імуноглобулінова структура антитіл

Структуру антитіл складає основна чотирьох ланцюгова одиниця (мономер) імуноглобулінової молекули. (рис. 2.2.9)

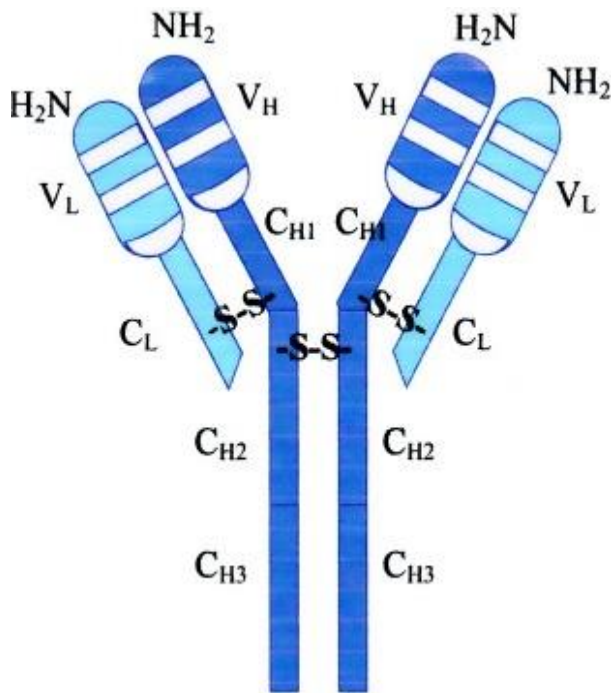


Рисунок 2.2.9 - Структура молекули імуноглобуліну

Імуноглобулінова молекула має поліпептидні ланцюги двох різних типів: легкі L (light) і важкі – H (heavy). Менші за розміром L ланцюги мають мол. масу 25 кДа і однакову структуру для всіх класів. H- ланцюги мають мол. масу 50-77 кДа і структурно різні у різних класів і підкласів імуноглобулінів. Поліпептидні ланцюги утримуються разом за рахунок ковалентних і нековалентних зв'язків. Легкі ланцюги існують у двох ізотопових формах – Капа (κ) і лямбда (λ). В молекулі імуноглобулінів можливо поєднання пар різних типів важких і легких ланцюгів, але в кожному випадку обидва ланцюга повинні належати до одного типу.

Легкі ланцюги (L) складаються з двох регіонів(областей)-С-кінцева половинка, яка є однаковою для ланцюгів усіх типів (за винятком деяких алотипових і Ізотопових варіантів) і утворена приблизно 107 амінокислотними залишками. Вона названа константною C_L – ділянкою

(constant light chain). N-кінцева половина даного ланцюга має багато варіантів амінокислотної послідовності, внаслідок чого отримала назву - варіабельної V_L -ділянки (variable light chain). Слід зазначити, що N-кінцева послідовність як для легких (L) так і для важких (H) ланцюгів імуноглобуліну G1, відносно якого, притаманна варіабельність, тому ці області отримали назву відповідно V_L і V_H . Усі інші частини молекули мають відносно стабільну структуру - константну - C. Константна частина важкого ланцюга має три структурно відокремлені області - C_{H1} C_{H2} C_{H3} . Варіабельні і константні області є стабілізованими внутрішньоланцюговими дісульфідними зв'язками (червоний колір) і утворюють стабільні глобулярні структури – домени. Антигензв'язуючі центри молекул імуноглобуліну утворені варіабельними доменами V_L і V_H . Відрізок важкого ланцюга між доменами C_{H1} і C_{H2} має назву шарнірної” області, яка дозволяє обом антигензв'язуючим центрам функціонувати незалежно один від одного.

Антитільна специфічність Ig визначається послідовністю амінокислот в V- регіонах легких і важких ланцюгів. Синтез кожної константної ділянки як важких, так і легких ланцюгів, кодується своїм геном.

Як можливі джерела різноманітності структур, які мають властивості розпізнавання антигену визначені:

- **Множинність гаметних генів V- регіонів;**
- **Соматичний мутагенез;**
- **соматичні рекомбінації між сегментами, які утворюють повний V- ген;**
- **Генні конверсії;**
- **Вставки додаткових нуклеотидів;**

Значний поліморфізм генів, які кодують варіабельні ділянки імуноглобулінів, забезпечує поліморфізм специфічних антитіл.

Поліморфізм специфічних антитіл, в свою чергу, забезпечує імунологічну підтримку імунного гомеостазу організму людини.

Порушення поліморфізму імуноглобулінових структур антитіл призводить до порушень в імунному гомеостазі, які проявляються імунодефіцитними станами і класифіковані як моноклональні гампатії. Причиною виникнення моноклональних гампатій є продукція моноклональних імуноглобулінів (парапротеїнів) замість поліморфних імуноглобулінів.

Моноклональні імуноглобуліни (парапротеїни)

Моноклональні імуноглобуліни є продуктом секреції одного клону В-лімфоцитів, або плазматичних клітин; презентовані пулом структурно гомогенних молекул; мають важкі ланцюги одного класу (субкласу) і легкі ланцюги одного типу; ідентичний ідіотип (активний центр) і підгрупу V-доменів;

Продукція моноклональних імуноглобулінів призводить до суттєвих змін в імунному гомеостазі і, як наслідок, реалізації певних патологічних станів, які за конкретними категоріями класифікують як **моноклональні гампатії**.

Таблиця 2. 2.1 - Моноклональні гампатії

Категорії моноклональних гампатій	Характер патології
1	2
Імунодефіцитні стани дисбалансом Т- і В-ланок імунної системи C(Ig) менш 2.5 г/л	Первинні (синдроми Віскотта-Олдрича, Ди Георге, Незелефа, важкого комбінованого імунодефіциту) Вторинні (вікові, які викликані застосуванням імунодепресантів, або є супутніми онкологічним захворюванням нелімфоїдної природи) Перебудова імунної системи після пересадки гемопоетичних стовбурових клітин Антигенна стимуляція в ранньому

	онтогенезі (внутрішньоутробна інфекція)
В-клітинні злаякісні С(Ig) більш 25 г/л	Множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема Плазмоцитома, лімфома, хронічний лімфолейкоз, хвороба важких ланцюгів
1	2
В-клітинні доброякісні С(Ig) більше 25 г/л	Моноклональні гамопатії неясного генезу
Гомогенна імунна відповідь С(Ig) менш 2.5 г/л	Бактеріальні інфекції Автоімунні захворювання, такі як кріоглобулінемія, системна червона вовчанка, ревматоїдний артрит і інші

Таким чином, аналіз структури, синтезу, динаміки продукції специфічних антитіл як заключного (проявленого) етапу імунологічного реагування організму в контексті характеристики антитіл з позицій генетики, біохімії, біофізики, молекулярної біології, значно розширює нашу уяву відносно їх структури, біологічної функції, а також відносно механізмів реалізації імунологічних реакцій в біологічній системі. Багаторічний досвід дослідників в цієї галузі свідчить також про необхідність розглядати серологічні аспекти антитілогенезу у взаємозв'язку з протеїногенною функцією організму, зокрема на рівні стану імуноглобулінового спектру, оскільки було встановлено наявність структурної гомології антитіл з молекулами імуноглобулінів, а також певної гомології імуноглобулінів з молекулами антигенів гістосумісності. Враховуючи той факт, що обидва типи молекул здійснюють імунологічне реагування організму людини на вторгнення екзогенних і ендогенних чужорідних агентів, можна з певною мірою застережливості зробити висновок про загальне еволюційне призначення цих молекул.

Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте хімічну природу і імунологічні властивості повноцінних і неповноцінних антигенів
2. Сформулюйте за імунологічною класифікацією поняття гуморальний імунітет.
3. Розпишіть увесь процес імунологічного реагування на рівні синтезу специфічних антитіл.
4. Які компоненти молекули визначають специфічність групових антигенів? - За яким спектром ознак розрізняють антитіла?
- 5. Яку хімічну природу мають антитіла?
6. В чому полягає імунологічна біфункціональність імуноглобулінів?
7. З яких складових утворена основна структурна одиниця імуноглобулінової молекули?
8. Назвіть можливі джерела різноманітності структур, які мають властивості розпізнавання антигену
9. Що являють собою за структурою моноклональні імуноглобуліни?
10. Які ви знаєте категорії моноклональних гампатій?

Література

1. Шахович В.Н. Общая биология. Блок-схемы, таблицы, рисунки: Учеб. пособие. – Мн.: Книжный Дом, 2006. – 112 с.
2. Иммуногенетика и эволюция/ Стил Э. Дж., Линдли Р. А., Бландэн Р. В.; Кузнецова О . В. (пер. с англ.); Животовский Л. А. (ред.). - М.: Мир, 2002. - 237с.
3. Пальцев, Михаил Александрович. Иммуногенетика человека и биобезопасность/ М. А. Пальцев, Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев. – М.: Медицина, 2007. – 143 с.
4. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология // Москва, "Медицина" - 2000. - стр. 79-80, 131-134.
5. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. - К.: Здоров'я, 1989. - 200 с.

РОЗДІЛ III

ІМУНОГЛОБУЛІНИ ТА ГЕНИ, ЯКІ ЇХ КОДУЮТЬ

В попередньому розділі ми вже розглядали загальну структуру і біологічні функції імуноглобулінів з позиції структури і функцій антитіл і визначились, що імуноглобуліни (група білків з деякими загальними особливостями структури, які продукують антитіло утворюючі клітини) мають антигенну специфічність, тобто здатність взаємодіяти з антигенами - чужорідними для організму речовинами і багатомільйонна різноманітність молекул імуноглобулінів пов'язана перш за все з специфічністю їх антитіл (АТ). В даному розділі ми приділяємо увагу генетичній побудові молекул даних білків, генетичному контролю продукції імуноглобулінів і закономірностям об'єднання генетичних елементів в єдиний функціонуючий ген імуноглобуліну

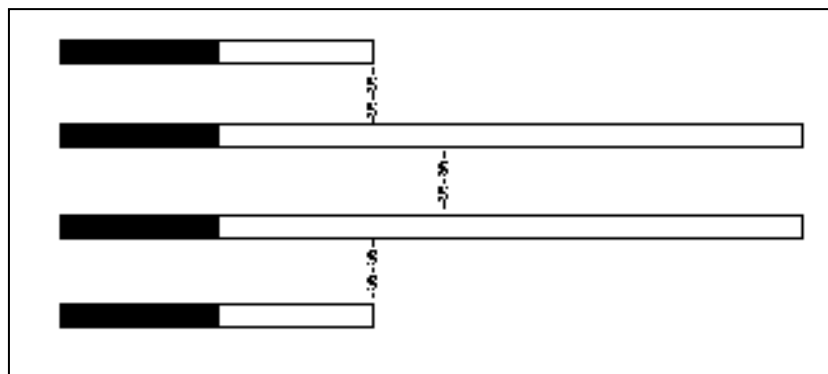


Рисунок 3.1 - Схема будови молекули імуноглобуліна

Загальні структурні властивості імуноглобулінів, характерні для всіх молекул (рис.3.1) і полягають у наступному:

1. Молекула імуноглобуліну складається з 4-х поліпептидних ланцюгів двох типів: L- і H-ланцюгів.

2. H- і L- ланцюги мають суттєві відмінності у первинній структурі, якщо їх порівнювати між собою, то обидва L- ланцюги у складі окремої молекули ідентичні одна одній по структурі і обидва H-ланцюги також мають однакову послідовність амінокислот.

3. У функціональному відношенні кожний поліпептидний ланцюг молекули АТ можна поділити на дві частини: варіабельну (V) і постійну (C). До V частини відноситься 110-120 N-кінцевих залишків поліпептидних ланцюгів, а інші залишки входять в C-частину ланцюга.

4. В межах V-частини виділяються три райони, які називаються гіперваріабельними. Саме в цих районах містяться амінокислотні залишки, які беруть участь у побудові антиген-зв'язуючого центра (АЗЦ).

5. V-частину L-ланцюгів можна розбити на два сегменти : V-сегмент і J-сегмент, а V-частину H-ланцюгів можна розбити на три сегменти: V-, D- і J-сегмент. Ці сегменти були відокремлені при аналізі характеру амінокислотних замін, але згодом виявилось, що кожний з них кодується окремою ділянкою ДНК.

6. Поліпептидні ланцюги молекули мають доменну організацію. Кожен домен містить біля 110 амінокислотних залишків, що мають один внутрішньоланцюговий дисульфідний зв'язок, і всі домени мають певну гомологію в первинній структурі та подібну просторову організацію.

7. Існує два типи L-ланцюгів: χ - і λ -. Відмінності в амінокислотній послідовності між χ - і λ - ланцюгами складають біля 60%, і слід підкреслити, що такі великі відмінності виявляються як у V-, так і в C-частині L-ланцюгів. При локалізації генів L-ланцюгів на хромосомах виявилось, що χ - і λ - гени знаходяться на різних парах негомологічних аутосом.

8. На відміну від L-ланцюгів, H-ланцюги можуть бути ідентичними по V-частині, але відмінності в будові їх C-частин можуть доходити до 70%. За характером амінокислотної послідовності C-частини імуноглобуліни поділяються на п'ять класів: IgM, IgA, IgJ, IgD і IgE. Відповідні ділянки H-ланцюга позначаються грецькими буквами: μ , α , γ , σ , ϵ .

9. В середині H-ланцюгів знаходиться ділянка, що одержала назву шарнірної. Вона містить велику кількість залишків проліну, які запобігають утворенню регулярної вторинної структури. Тут же знаходяться залишки цистеїну, що утворюють дисульфідні зв'язки між H-ланцюгами. Можливо, саме шарнірна ділянка молекули забезпечує її гнучкість і координовану передачу сигналу від антиген-зв'язуючої частини молекули до її ефectorної частини. Якщо всі домени-молекули імуноглобулінів мають між собою певну структурну і просторову подібність, то шарнірна ділянка не гомологічна з жодною ділянкою поліпептидних ланцюгів імуноглобуліну.

10. Антигензв'язуючий центр (АЗЦ) (активний центр антитіла, який комплементарно взаємодіє з антигенною детермінантою (епітопом)) молекули АТ будується завдяки взаємодії двох поліпептидних ланцюгів - одного L- і одного H-ланцюга. Основна роль у побудові АЗЦ відіграють гіперваріабельні ділянки обох ланцюгів.

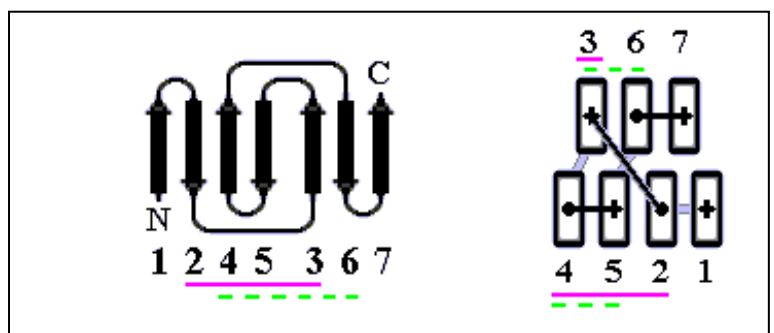
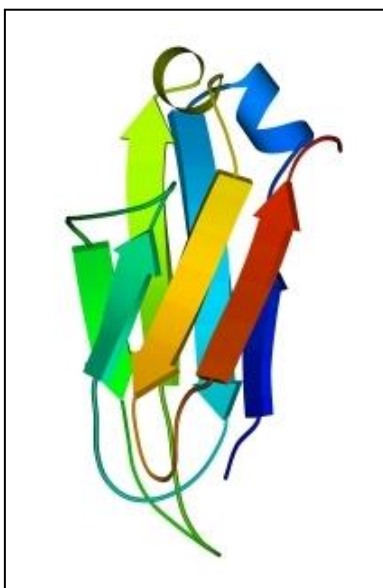


Рисунок 3.2 - Подовжня упаковка b-листіків у константному домені легкого ланцюга імуноглобуліну α . Зліва представлена докладна картина білка; райдужна розцвітка (від синього до червоного) трасує хід ланцюга, від N- до C-кінця. На топологічній схемі (в центрі рисунка) підкреслені "грецькі ключі". На рисунку праворуч подано вид на білок "знизу" (з торців структурних сегментів). Прямокутники - торці b-тяжів. Хрестик відповідає N-кінцю сегмента (тобто він "іде від нас"), точка — його C-кінцю (тобто він "рухається до нас"). Хід петель, які сполучають структурні сегменти, показаний чорною лінією, якщо петля повернута до нас, і світлою, якщо вона знаходиться на протилежній стороні укладки. Така схема дозволяє представити колінеарну упаковку цих сегментів (b-тяжів) найбільш просто. Крім того, вона дозволяє побачити просторову будову "грецьких ключів" і помітити, що два існуючих "ключа" у просторі організовані по-різному.

Багато років тому австралійський вірусолог та імунолог Ф. Бернет сформулював теорію «Одна клітина - одне антитіло». Гіпотеза достатньо швидко блискуче підтвердилась, але тільки недавно став зрозумілим молекулярно-генетичний механізм створення індивідуального «обличчя» молекул АТ. Виявилось, що в індивідуальній лімфоїдній клітині із багатьох сотень генів імуноглобулінів активним є тільки мінімальний набір генів, необхідний для синтезу одного L-ланцюга і одного H-ланцюга. Різноманітність молекул АТ, що дорівнює 10^7 , утворюється за рахунок того, що в різних лімфоїдних клітинах активуються різні гени імуноглобулінів і, відповідно, популяція лімфоїдних клітин гетерогенна за специфічністю.

Таким чином, різноманітність молекул АТ на рівні цілого організму поєднується з суворою індивідуальністю молекул АТ, котрі синтезуються в межах даного клону лімфоїдних клітин. Вибір конкретних генетичних елементів, які «утворюють» функціонуючі гени імуноглобулінів в певній лімфоїдній клітині є, напевне, випадковим.

Більш того - далеко не всі поєднання генетичних елементів приводять до утворення функціонально активних генів імуноглобулінів. Але молекулярно-генетична «машина» працює таким чином, що в решті-решт реалізуються всі закладені в неї можливості і організм забезпечується певним набором АТ.

Структурна організація генетичних елементів, які контролюють утворення імуноглобулінів

Генними сегментами домовимось називати ті ділянки ДНК, які перебувають в ембріональному недиференційованому стані. Як стане відомо з подальшого викладення, «зібраний» V-ген імуноглобуліну утворюється шляхом поєднання на рівні ДНК ділянок, котрі знаходяться далеко одна від одної. Поєднання цих ділянок відбувається тільки в лімфоїдних клітинах, а в клітинах печінки, нирок і інших тканин, як і в ембріональній ДНК, генні сегменти імуноглобулінів існують розрізнено.

V-геном L-ланцюга ми будемо називати ген, що зібраний із V- і J-сегментів, а V-геном H-ланцюгів - ген, зібраний із V-, D- і J-сегментів. С-гени в процесі диференціювання лімфоїдних клітин перебудові на рівні ДНК не піддаються. Змінюватись можуть лише ділянки ДНК за межами структурної частини С-генів.

V-сегменти

V-сегменти контролюють утворення n-кінцевих ділянок поліпептидних ланцюгів. Рахунок амінокислотних залишків починається завжди з n-залишка «зрілого» поліпептидного ланцюга, що секретується клітинами. Але при трансляції мРНК імуноглобуліну в гетерологічних безклітинних системах виявилось, що первинний продукт трансляції більш довгий, ніж зрілий ланцюг, і має з n-кінця екстрапептид, що одержав назву **лідуючого**, або **сигнального**. Цей пептид піддається швидкому внутрішньоклітинному відщепленню; відповідно до цього ген V-сегмента має окремий екзон, який

контролює утворення лідируючого пептиду. На межі екзон/інтрон у генів імуноглобулінів виявлені ті ж сигнальні послідовності для сплайсингу мРНК, що і у інших генів еукаріотів, а саме 5'-екзон /GT-інтрон-AG-екзон/ - 3'. Не зважаючи на великі відмінності в структурі лідируючих екзонів різних V-сегментів, всі вони містять саме цей кодон, що є останнім кодоном лідируючого екзону і не формує своїми двома нуклеотидами сигнал для сплайсингу.

На відміну від однозначності даних про розміри V-сегментів питання про кількість V-сегментів до кінця остаточно не вирішено.

Розмір V-сегмента, враховуючи лідируючий екзон і інтрон між двома екзонами, становить у середньому 500 нуклеотидних пар, але відстань між сусідніми V-сегментами набагато більша - в середньому 15000 пар. У тих випадках, коли вдавалося виділити фрагменти ДНК, які несуть одночасно два V-сегменти, незмінно виявлялося, що сусідні V-сегменти належать до однієї V-підгрупи і мають суттєву гомологію не тільки у своїй структурній частині, але і в міжгенних просторах. Звідси випливає, що V-сегменти однієї підгрупи зібрані до одного класу. Припускається, що V-сегменти однієї підгрупи виникли шляхом тандемних дуплікацій одного початкового предкового гена, а їх подібність між собою не тільки у структурній, але й міжгенній частині дозволяє цим сегментам шляхом рекомбінації обмінюватись генетичним матеріалом.

J-сегменти

На рівні поліпептидного ланцюга J-сегмент об'єднує V-сегмент з C-частиною ланцюга. На генному рівні J-сегменти являють собою окремо розташовані ділянки ДНК. Відстань від комплексу V-сегментів невідома, але відносно C-генів їхнє положення точно локалізовано. Найближчий до C-гену J-сегмент χ -ланцюгів миші розташований на віддалі 2,6 тис. пар основ, а для

H-ланцюгів імуноглобулінів миші відстань між J_H - і C_H -сегментами становить 6,5 тис. пар.

J-сегментам звичайно надаються порядкові номери у напрямку 5' - 3', тобто найближчий до C-гену J-сегмент буде мати найбільший номер.

J-сегменти L-ланцюгів кодують ділянку поліпептидного ланцюга розміром в 13 амінокислотних залишків. Довжина J-сегментів залишається незмінною для всіх видів, що досліджувалися (миші, щурі, людина), і для обох типів L-ланцюгів імуноглобулінів миші, але якщо у χ -ланцюгів J-сегмент поліпептидного ланцюга охоплює амінокислотні залишки з 96 по 108, то λ -ланцюгів з 98 по 110-й. Відстань між J сегментами χ -ланцюгів становить, як правило, в середньому 300 пар основ.

Різні види тварин відрізняються за кількістю J-сегментів χ -ланцюгів, але тут треба враховувати не тільки загальну кількість J-сегментів, але і наявність так званих псевдогенів. **Псевдогенами називаються ділянки ДНК, які мають певну структурну подібність з істинними генами, але з якихось причин не здатні реалізуватися на рівні поліпептидного ланцюга.** До цих причин відносяться:

- 1) відсутність сигналів для сплайсингу з 3' кінця J-сегмента;
- 2) наявність стоп-кодону в межах структурної частин;
- 3) спотворені фланкуючі послідовності, що не допускають об'єднання V- і J- сегментів;
- 4) структурна подібність псевдогенів істинним J-сегментам може бути такою віддаленою, що ніколи не виявиться на рівні поліпептидного ланцюга.

На відміну від подібності розмірів і міжгенних віддалей J-сегментів χ -ланцюгів, J-сегментів H-ланцюгів мають за обома ознаками суттєві відмінності, із них один псевдоген, два кодують ділянку H ланцюга розміром в 15 амінокислотних залишків і два - в 17. Ще більша різноманітність спостерігається серед J_H -сегментів імуноглобулінів людини. Тут із 9 J_H -

сегментів, 3 відносяться до категорії псевдогенів, сегменти J1 і J2 кодують ділянку ланцюга в 17 амінокислотних залишків, J3 і J4 - 15, J5 - в 16 і J6 - в 20.

D-сегменти

D-сегменти як ділянки ДНК, що кодують певні відрізки Н-ланцюгів, були виявлені в 1981 році в результаті цілеспрямованих пошуків. Припустили, що існують окремі генетичні елементи, які контролюють утворення невеликого за розмірами пептиду, і цей пептид грає важливу роль у побудові АЗЦ, оскільки він цілком входить в 3-тю гіперваріабельну ділянку. Але головна відмінність D-сегментів від інших генетичних елементів імуноглобулінів полягає, як з'ясувалось, не в їх малих розмірах, а в тому, що жоден із D-сегментів не здатний за своєю структурою реалізуватися в послідовність амінокислот у тому вигляді, в якому він існує в ембріональній ДНК. Цей висновок впливає вже із самих розмірів D-сегментів. До сьогоднішнього дня встановлена нуклеотидна послідовність 10 D-сегментів і, напевно, існують ще, як мінімум, ще 4 D-сегменти Н-ланцюгів імуноглобулінів миші. Всі D-сегменти можна розділити на 3 родини, довжина структурної частини становить відповідно 10, 11 і 17 пар основ, тобто в жодному випадку немає числа, кратного трьом. Більш того, на рівні поліпептидного ланцюга довжина D-сегментів може досягати 9 амінокислот, а може складатися і із одного амінокислотного залишку. Нині вже стало ясно, що D-сегменти найбільш піддаються генним перебудовам і здатні об'єднуватися не тільки з V- і J-сегментами Н-ланцюгів, але і між собою.

Не зважаючи на свої невеликі розміри, D-сегменти займають ділянку ДНК, як мінімум, в 60 тис. пар основ, а віддаль між сусідніми D-сегментами складає від 5 до 10 тис. пар.

C-гени

C-гени (гени, які кодують константні області важких і легких ланцюгів імуноглобулінів) контролюють утворення постійних частин L- і Н-

поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів. Уже із самої номенклатури зрозуміло, що С-частина ланцюга у межах даного типу, класу або підкласу імуноглобулінів залишається незмінною за своєю будовою. Роз'яснимо це положення на прикладі χ -ланцюгів імуноглобуліну миші. Існує 300 V-сегментів χ -ланцюгів і 4 J-сегмента. Комбінацією цих двох генетичних елементів утворюється як мінімум 12000 варіантів V-частин капа-ланцюгів, але всі варіанти капа-ланцюгів мають одну і ту ж о кінцеву половину поліпептидного ланцюга (залишки 109-215) і відповідно з цим в геномі миші щура і людини виявлено єдиний С капаген.

С-гени L-ланцюгів імуноглобулінів не містять інтронів і не зазнають жодних перебудову у процесі диференціації лімфоїдних клітин. Щодо λ -генів, то вони не одиничні: чотири С λ -гени імуноглобулінів миші і шість – людини. До цього часу не з'ясовано, з чим пов'язана багатоманітність С λ -генів.

Гени λ - і χ -ланцюгів, як уже було з'ясовано, локалізовані на різних негомологічних аутосомах, і у відповідності з цим V і J сегменти χ -ланцюгів проявляються тільки разом з С χ -геном; теж справедливо для λ -ланцюгів. Таким чином, перебудови генів L-ланцюгів, що приводять до їх об'єднання та експресії відбувається тільки в межах даної хромосоми, причому не зареєстровано жодного випадку міжхромосомного обміну генами імуноглобулінів. В результаті λ - і χ -поліпептидні ланцюги можна легко відрізнити не тільки за С-частиною, але за V-частиною ланцюга. В процесі диференціювання лімфоїдних клітин одні і ті ж генетичні елементи, що формують V_n-ген, можуть проявлятися в комбінації з різними С_n-генами.

Екзон-інтронна структура С_n генів є поки що єдиним прикладом відповідності між генними і поліпептидними рівнями організації. Як відомо, поліпептидні ланцюги імуноглобулінів складаються із доменів, що мають певну структуру і просторову організацію. На рівні генів кожному домену відповідає окремий екзон, і якщо у μ -ланцюгів на один домен більше, ніж у

γ -ланцюгів, то і на генному рівні у C_H -гена буде додатковий екзон. Окремий екзон існує також і для шарнирної ділянки, котра не має гомології з доменами H ланцюгів.

Таким чином, здатність одного і того ж V_H -гена об'єднуватись з різними C_H -генами вносить додаткову різноманітність в імунну відповідь, залежно від класу імуноглобулінів утворення АТ може призвести до інших різних наслідків.

Закономірності об'єднання генетичних елементів в єдиний функціонуючий ген імуноглобуліну

Принципова відмінність генів імуноглобулінів від всіх інших генів еукаріотів полягає у тому, що функціонуючи ген імуноглобуліну “збирається по цеглинах” з окремих ділянок ДНК. У процесі диференціації лімфоїдних клітин даний V-сегмент якимось чином фізично відокремлюється від того району ДНК, де він знаходився раніше (тобто в ембріональній ДНК), та опиняється у зовсім новому для себе оточенні (поруч з J-сегментом у випадку L-ланцюгів імуноглобулінів або D-сегментом у випадку H-ланцюгів. Природно, що цей процес перебігає не механічно, а за допомогою якоїсь ферментативної системи. Ферменти, що “займаються” перенесенням генних сегментів поки не виділені, але відомі ті послідовності ДНК, які можна розглядати як сигнальні. Саме ці сигнальні послідовності ДНК, які є універсальними для V, D і J сегментів генів H і L ланцюгів, вносять певний порядок у складний процес перебудови генних сегментів.

У випадку V-сегментів сигнальні послідовності йдуть безпосередньо (або через одну-дві основи) за останнім кодоном перед структурною частиною J-ДНК.

Інша ситуація виявлена для D-сегментів: структурна частина D-сегменту має сигнальні послідовності з обох сторін.

Генні сегменти розташовані на одній і тій же хромосомі і мають потенційну здатність до поєднання. Мають різну довжину між сигнальними послідовностями. Відстань у 12 пар основ приблизно відповідає одному оберту подвійної спіралі ДНК, а віддаль у 23 пари – двом виткам. Звідси виникло припущення, що існують два різні ферменти (або дві субодиниці одного ферменту), один із яких впізнає сигнальні послідовності, що розташовані на відстані одного оберту один від іншого, а другий фермент (або субодиниці) – на відстані двох витків. Можна вважати, що один фермент (або ферменти) вилучає V-сегмент з місця, яке йому властиве, а інший фермент (або ферменти) сам (або за допомогою першого ферменту) проводять об'єднання двох раніше різних генних сегментів в єдиний V-ген. При цьому сигнальні послідовності видаляються з ДНК і 3' кінцева ділянка V-сегмента стикається з 5' кінцевою ділянкою J-сегмента.

Правило 12/23

Структура сигнальних послідовностей генних сегментів імуноглобулінів наведена нижче:

Генний сегмент	Сигнальні послідовності
V_{χ}	3' (7) - (12) - (9) 5'
V_{λ}	3' (7) - (23) - (9) 5'
V_H	3' (7) - (23) - (9) 5'
J_{χ}	5' (9) - (23) - (7) 3'

J_{λ}	5' (9) - (12) - (7) 3'
J_H	5' (9) - (23) - (7) 3'
D_{20}	3' (7) - (12) - (7) - D -(7) - (12) - (9) 3'

Правило 12/23 було встановлено на початку для генів L-ланцюгів. Потім виявилось, що у V- і J- сегментів H-ланцюгів відстань між сигнальними послідовностями однакова -23 пари. Виходячи з цього виникло припущення, що D-сегмент (тоді ще не знайдений) повинен мати віддаль між гепта- і нонамерами у 12 пар основ, причому з обох сторін D-сегмента, а не з однієї. Припущення повністю підтвердилось.

Дослідження у галузі генетики імуноглобулінів проводяться, як правило, на трьох рівнях: 1) вивчається структура генних сегментів імуноглобулінів у недиференційованому стані, для чого використовують ДНК сперми або таких тканин як нирка або печінка; 2) вивчається структура перебудованих генів імуноглобулінів в диференційованих лімфоїдних клітинах, мієломних, гібридомних або нормальних В-лімфоцитах, виділених на флуоресцентному сортувальнику клітин; 3) вивчається структура поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів, синтез яких визначається генами, що досліджуються.

Структурні дослідження на вказаних трьох рівнях дуже швидко дозволили зробити висновок: багатоманітність V-генів у диференційованих клітинах і відповідно багатоманітність поліпептидних ланцюгів суттєво вища, ніж кількість V-сегментів в ембріональній ДНК. Певний вклад в цю багатоманітність вносять соматичні мутації. Але постійно діючим генератором багатоманітності є процес об'єднання розрізнених ембріональних генних сегментів в єдиний V-ген, що експресується у диференційованих клітинах.

Диференціація В-лімфоцитів за генами імуноглобулінів

В індивідуальній лімфоїдній клітині синтезуються гомогенні за структурою молекули АТ (згідно теорії Бернета “Одна клітина – одне антитіло”). Це визначається тим, що з декількох сот генетичних елементів, потенційно здатних брати участь у побудові генів імуноглобулінів, реально експресується тільки така кількість генетичних сегментів, яка необхідна для синтезу одного індивідуального L-ланцюга і одного H-ланцюга.

Механізм подібної вибіркової експресії легко собі уявити, якщо його розглядати в межах одного комплексу генних сегментів імуноглобулінів. Так, можна уявити, що об'єднання V_χ -сегмента з одним із J_χ -сегментів в даній лімфоїдній клітині запобігають об'єднанню з будь-яким іншим V_χ -сегментом в тій же клітині. Справа в тому, що V_χ -сегмент “переноситься” до J_χ -сегмента разом з ділянкою ДНК, котра межує з структурною частиною V_χ -сегмента з 5' кінця. Довжина цієї ділянки точно не відома.

Довжина структурної частини V-сегмента складає біля 500 пар основ, в район J-сегментів переноситься ділянка ДНК завдовжки приблизно 1000 нуклеотидів. Разом з цим вся ділянка геному, в якому розташовані J_χ -сегментт займає біля 1500 пар основ, і введення в цю ділянку фрагмента ДНК завдовжки в 1000 пар нуклеотидів призводить до повторних змін.

Таким чином, сам процес складання V-гена визначає диференціювання в межах даного комплексу генних сегментів імуноглобулінів. Однак, крім цього типу диференціації, в межах родини генів імуноглобулінів здійснюється вибір ще за двома параметрами: за негомологічними хромосомами, де локалізовані гени χ - і λ -ланцюгів, і за гомологічними хромосомами.

Фенотипово диференціювання за негомологічними χ - і λ - хромосомами визначається за синтезом відповідних L-ланцюгів і, як правило, в індивідуальній лімфоїдній клітині спільний синтез χ - і λ - ланцюгів не

відчувається. Феномен алельного виключення полягає в тому, що в одній лімфоїдній клітині не виявляються повноцінні продукти активності генів імуноглобулінів, розташованих на гомологічних хромосомах. Це відноситься як до L-, так і до H- ланцюгів. Алельне виключення є унікальним феноменом для генів імуноглобулінів, оскільки звичайно в одній клітині проявляються обидва алельних гена, як, наприклад, у випадку гемоглобінів або антигенів гістосумісності.

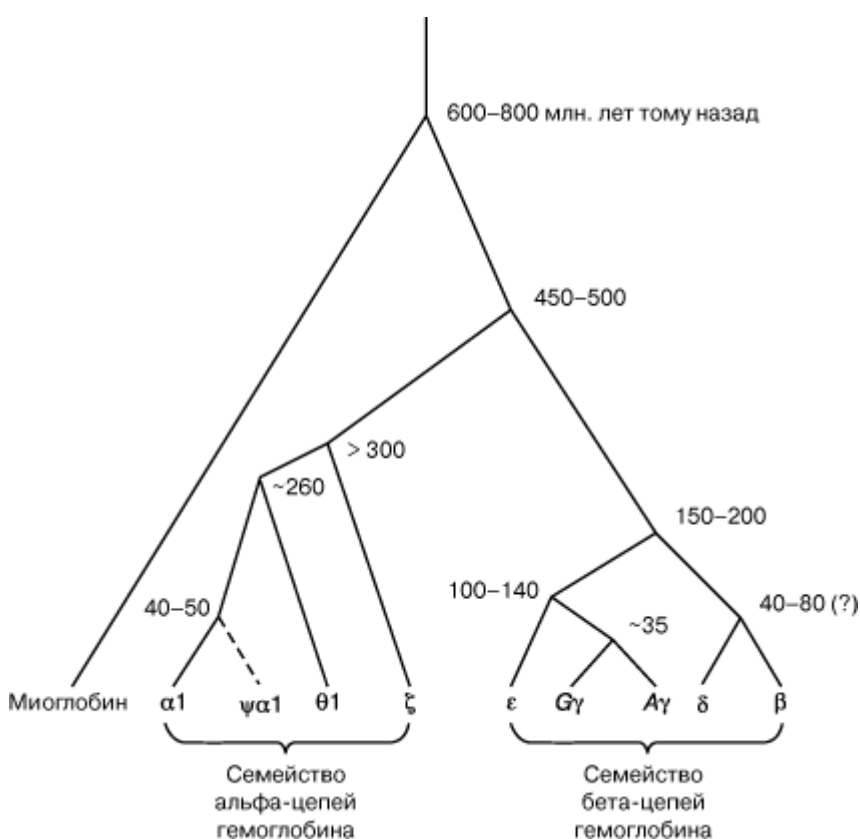


Рисунок 3.2 - Еволюція генів людини.

На рисунку представлена частина глобінових генів людини з оцінкою їх дивергенції (розходження) в часі. Видно, що гени, які кодують альфа- і бета-ланцюги гемоглобіну, дивергували один від одного приблизно пол. міліарда літ тому, а їх предок і міоглобін відокремились один від одного на кількасот мільонів років раніше. Потім відбулися подальші дуплікації і їх дивергенція в межах даного сімейства генів. Внаслідок цього виникли гени,

які несуть певні функції і гени, які не мають конкретних функцій (псевдо гени). (відмічено грецькою літерою у).

Гени імуноглобулінів розташовані на трьох парах аутосом, і в результаті диференціації із 6 хромосом диплоїдної клітини експресуються гени тільки двох аутосом. Виявилось, що в основі цієї вибіркової активності лежить той же самий процес складання гена, який визначає в межах одного комплексу генних сегментів імуноглобулінів.

Якщо імовірність появи функціонально активного V-гена на одній гомологічній хромосомі достатньо низька, то це зразу ж пояснює, наприклад, феномен алельного виключення. Для цього достатньо припустити, що складання V-гена на гомологічних хромосомах відбувається незалежно, а отже, поява клітини з двома активними алельними активними V-генами визначається як добуток двох низьких частот і тому повинна бути дуже рідкою подією. Так само можна пояснити і вибіркового прояв в одній клітині χ - і λ - генів. Разом з тим існують певні закономірності прояву генів імуноглобулінів під час індивідуального розвитку: **спочатку активуються гени H-ланцюгів, потім χ - і в останню чергу λ -ланцюгів.** Але і цей порядок визначається не регуляторними факторами, а кількістю генетичних сегментів, які беруть участь у побудові V-гена: чим вище це число, тим вища вірогідність генних перебудов.

Розглянемо експериментальний матеріал, покладений в основу наведеної точки зору про ймовірний характер диференціації лімфоїдних клітин за генами імуноглобуліну.

1. Об'єднання на одній з χ -хромосом спричиняється до утворення послідовності із зсувом рамки зчитування через делеції одного нуклеотиду першого кодону J-сегмента.

2. Процес V-J об'єднання іде з великою кількістю помилок: кількість некоректних перебудов збільшується із-за існування псевдогенів і псевдосигнальних послідовностей.

3. У складі J_γ-сегментів імуноглобулінів миші є псевдоген, у якого відсутня сигнальна послідовність для сплайсингу, тому об'єднання з ним будь-якого V_γ-сегмента не може привести до послідовності, що транлюється.

4. У половині випадків вибіркова експресія тільки однієї із хромосом пов'язана з тим, що на іншій хромосомі (або хромосомах) перебудови взагалі не відбулися, або генні сегменти С-ланцюгів знаходяться в ембріональному, недиференційованному стані.

Отже, враховуючи багатомільярдність популяції лімфоїдних клітин, її постійне самооновлення, легко прийти до висновку, що вклад генних перебудов приводить до появи все нових і нових варіантів АТ, що як кінцевий результат підтримання імунного гомеостазу людини при дії екзогенних і ендогенних негативних чинників має позитивний характер.

Питання для самоконтролю.

1. Що таке псевдогени. Які механізми їх виникнення.
2. Що таке феномен алельного виключення
3. Де розташовані гени імуноглобулінів.
4. Охарактеризуйте Правило 12/23
- 5.Що називають генними сегментами ДНК.
- 6.Охарактеризуйте будову молекули імуноглобуліна

Література

1. Ройт А.,Бростофф Дж.,Мейл Д. Иммунология / Пер.с англ. В.И.Кандрора, А.Н.Маца, Л.А.Певницкого, М.А.Серовой.-М.;Мир,2000.- 581с.
2. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.

3. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб пособие. – К. Вища школа, 1989. – 736 с.
4. М. Якобияк. Імунологія/Переклад з польської за ред.. проф.. В.В. Чоп'як. –Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
5. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
6. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и алергология. – М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.: ил.

РОЗДІЛ IV

Системи еритроцитарних антигенів людини

Загальна характеристика

Відомо, що найбільш численною з популяцій формених елементів крові є еритроцити і їх антигени, які широко представлені в усіх тканинах, за виключенням хрусталика, хряща, яєчок. За сучасною номенклатурою еритроцитарних антигенів розробленою і оприлюдненою Міжнародним товариством переливання крові в 1998 році (ISBT) - відомо понад 250 груп крові, які об'єднані в 25 систем.

Таблиця 4.1 – Перелік систем антигенів еритроцитів

Назва системи	ISBTсимвол	Номер системи	Кількість антигенів
1	2	3	4
ABO	ABO	001	4
MNS	MNS	002	43
P	P1	003	1
Rh	RH	004	48
Lutheran	LU	005	19
Kell	KEL	006	24
Lewis	LE	007	6
Daffy	FY	008	6
Kidd	JK	009	3
Diego	DI	010	21
Yt (Cartwright)	YT	011	2
Xg	XG	012	1
Scianna	SC	013	4
Dombrock	DO	014	5
Colton	CO	015	3

Landsteiner-Wiener	LW	016	3
Chido-Rodgers	CH/RG	017	7
1	2	3	4
Hh	H	018	1
Kx	KX	019	1
Gerbrich	GE	020	7
Cromer	CROM	021	11
Knops	KN	022	8
Indian	IN	023	2
Ok	OK	024	1
Raph	RAPH	025	1
JMH	JMH	026	1
I	I	027	1
Globoside	GLOB	028	1
GIL	GIL	029	1

Згідно нової номенклатури ISBT (табл.4.1) системам антигенам еритроцитів задані трьохзначні номери від 001 (система ABO) і далі в залежності від року відкриття. Всі антигени всередині системи також мають трьохзначні номери. Таким чином при ідентифікації антигену певної системи еритроцитів для позначання використовують шестизначний номер: перші три цифри – це номер системи антигенів; другі три цифри – це порядковий номер антигену саме в системі. Нова номенклатура антигенів даних систем не відмінює загальноприйняте літерне позначання антигена.

Насьогодні має місце переміщення антигенів між системами, наприклад, об'єднання антигенів системи Auberger з антигенами системи Lutheran. Це явище має місце завдяки вивченню генів, які контролюють

продукцію антигенів, оскільки, **основною ознакою антигенів еритроцитів в систему є загальність генів, які їх контролюють.**

Найбільш поширеними і важливими для прикладної імунології визнані еритроцитарні системи **ABO; Rh-Hr; MNSs; Pp;Kell; Daffy;kidd;Lewis**, які ще називають **основними ізосерологічними генетичними системами груп крові.** Ці системи мають важливе значення в імунологічному реагуванні організму тому, що навіть слабкі (мінорні) форми деяких антигенів формених елементів крові можуть призводити до продукції специфічних антитіл, що, в свою чергу, є причиною посттрансфузійних і пострасплантацийних реакцій та ускладнень гемолітичного характеру.

Ізосерологічна система антигенів груп крові вміщує антигени, які успадковуються автономно від інших, але в середині серії успадкування антигенів взаємно пов'язане завдяки існуванню алелей. Окрім системи антигенів еритроцитів ще існує поняття колекції і серії антигенів. **Колекція** – вміщує антигени, які біохімічно і серологічно пов'язані на рівні специфічності, але не відповідають вимогам на рівні генів, які кодують їх продукцію.

Серії - вміщують антигени, для яких ще не вивчені гени, які кодують їх продукцію.

Алелі - альтернативні спадкові варіанти гена, розташовані в одному і тому ж локусі на гомологічних хромосомах, успадкування їх кодомінантне, тобто на еритроциті, лейкоциті, тромбоциті представлені продукти всіх алелей, експресованих на гомологічних хромосомах.

Незаперечливим є факт відносно того, що велика різноманітність антигенів еритроцитів забезпечує не тільки індивідуальність кожної особи, але й приймає активну участь в процесах метаболізму, у адгезії та транспорті мочевины (системи Лютеран, Кід, Даффі), рецепції хемокинів (Кромер та Кнопс), як транспортер води у середину еритроцитів - система Колтон.

На сучасному етапі розвитку імуногенетики досить повно вивчено антигенний склад формених елементів крові людини і відомо, що кожна популяція клітин крові, будь-то еритроцити, лейкоцити чи тромбоцити має багатий набір власних антигенних маркерів. Відносно систем еритроцитарних антигенів сформульована концепція про значення для підтримки нормального гомеостазу людини як системи, яка забезпечує імунологічну стабільність і еволюційну толерантність до оточуючого середовища

Мозаїка специфічностей антигенних детермінант групових антигенів знаходиться в безпосередньої залежності від генетики групових антигенів. Тобто, спектр специфічностей ізольованих антигенів залежить від алельності системи. Алельність, в свою чергу, системи обумовлена генетикою групових антигенів, згідно якої гени еритроцитів можуть зізнавати мутації.

Якщо мутація поодинокі – це система двох алельних генів

Kell, Daffy, Kidd

Множинні мутації – ознака системи, яка утворена парою алельних генів - ABO

Є системи, які утворені декількома алельними парами

MNSs, Rh-Hr

Генотип груп крові є інтерпретацією фенотипу еритроцитів, оскільки самі еритроцити генотипувати неможна в зв'язку з тим, що **еритроцити не мають ядра. В зв'язку з чим серологічні тести виявляють наявність саме антигенів.**

Відомо, що гомозиготними вважаються індивіди з двома ідентичними генами, а гетерозиготними є індивіди з двома різними генами. Дані терміни не використовуються для по відношенню до еритроцитів, тому, що вони характеризують генетичну ситуацію. При характеристиці гомо- або

гетерозиготності для еритроцитів прийнято говорити: „еритроцити від осіб, які є А гомозиготами” і неможна казати – „гомозиготні еритроцити А”. За номенклатурою гени, які кодують еритроцитарні антигени позначаються тими ж символами, але курсивом. Наприклад, ген, який кодує антиген **D**, позначається *RHD*. Серед генетичних систем еритроцитів є система **Xg**, антигени якої на відміну від усіх інших систем кодуються генами, які розташовані не на аутосомах а на статевій X хромосомі, тому ці групові антигени називають зчепленими з полом.

4.1 Система АВ0

Система антигенів **AB0(H)**, відкрита Карлом Ландштейнером першою, понад сто років тому, з усіх антигенних систем клітин крові є найстарішою філогенетичною системою антигенів клітин крові; у кожної людини представлена двома антигенами в гомозиготному (**00**) або гетерозиготному (**AB**) стані.

Антигени системи **AB0** експресовані на поверхні багатьох клітин організму - епітеліальні та ендотеліальні клітини, тромбоцити і лімфоцити у виділителів з групою крові **Se⁺** і в біологічних рідинах, але відсутні на моноцитах та лейкоцитах.

Слід визначити існування двох точок зору, що до антигену **0**: антиген **0** є продуктом гену **P**, однак специфічний субстрат для антигену **0** та специфічні антитіла до нього не виявляються, і він не виділяється з секретом. По іншій речовина **0** являє собою негативну ознаку, яка вказує на відсутність антигенів **A** та **B** на еритроцитах осіб з групою крові **0(I)**.

Однак є в навколишньому середовищі речовини рослинного походження - лектини *Lotus Tetragonolobus*, *Ulex Europeus*, *Cyticis*, які можуть аглютинувати еритроцити. Дослідники знайшли, що слина осіб з групою

крові 0 здатна на преципітацію під дією лектинів, вона затримує аглютинацію 0-еритроцитів вищевказаними лектинами, тобто діє як антиреагент при аглютинації. Очевидно у осіб з групою крові 0 і у слині є групоспецифічна речовина, яка відрізняється від речовин А та В, але близька до речовини А₂. За пропозицією Morgan цю речовину назвали "Н", а система антигенів отримала повну назву АВ0(Н)-система. Виявлення антигену Н в еритроцитах груп 0, А0, В0 історично було можливо тільки за умов особливого підходу. Сучасний рівень генетичних біотехнологій розширив можливості вивчення речовини Н і відповідно до нової класифікації антиген Н не є більше антигеном системи АВ0, а складає окрему систему антигенів еритроцитів - (018) з хромосомною локалізацією 19q13/3 на відміну від еритроцитарних структур А і В, які мають хромосомну локалізацію 9q34,2.

Антиген А маркує групу крові А_β (II) і має виразну форму А₁, яка є найбільш розповсюджена - до 75%, а також відкриті на сучасному рівні ще 15 серотипів, найбільш зустрічаємий серед них А₂ (12%), проти якого також є природні неповні ізогемаглютинини. Але відносно даного серотипу говорять у випадках, коли вони перестають аглютинуватися антитілами анти-А, попередньо адсорбованими еритроцитами, які вміщують даний антиген. В той же час, по відношенню до еритроцитів А₁, ці антитіла зберігають свою активність попередньому титрі. Сироватки осіб групи В і 0 вміщують, таким чином, антитіла анти -А+ А₁. Ці два субтипи антигену А являють собою трансфузійно значимі антигени. Так, у 1-2% осіб групи крові А₂ в сироватці вміщуються антитіла анти - А₁. Останні зустрічаються у 26% осіб групи крові А₂В. Антигени А₃ являє собою ще більш слабкий антиген, навіть дуже активні сироватки анти-А дають вельми слабку аглютинацію, більшість еритроцитів в реакції залишаються у вільному стані. Еритроцити А₄ не аглютинуються природніми антителами анти-А, отриманими від особи

групи В. Всі ці мінорні субтипи антигену А зустрічаються вкрай рідко - від 1:10 000 до 1:30 000 в різних популяціях.

Антиген В не має такої багатой серотипової різноманітності як антиген А і тільки в невеликій кількості визначено антиген **В₂** серед декількох сімей японців (Т.Когуга). Речовина **Н** не являє собою продукта гену **0**, але її кількість, певне, зворотно пропорційне кількості речовини А і В, тобто **сума А+Н є постійною величиною**. Речовина **Н** виявляється в секретах видільної групи **0**. Достатньо значна кількість її виявляється в слині виделителів групи 0, менше – в слині групи **А₂** і зовсім мало у осіб групи **А0** і **В0**; у осіб групи **А₁В** – вона відсутня. Слід зазначити, що окрім водонерозчинної фракції на поверхні еритроцитів індивідів у 78% осіб присутні антигени в розчинному вигляді в різних секреторних рідинах організму. Ці особи відносять до класу **виделителів**. Осіб, які не мають такої розчинної фракції в рідких секретах відносять до класу **невиделителів**.

Здібність трансформувати групові антигени в секрети є спадковою ознакою, яка контролюється двома генами *Se*. і *se*. *Se*-ген для виделительства є домінантним, *se* –рецесивним. Індивіди за генотипом *Se Se*, або *Se se* є виделителями, а особи, які мають гени *se se* –невиделителями. Секреторні гени діють шляхом руйнування ліпід-полісахаридних зв'язків в А і В тканинних антигенах.

Відносно фізіологічної ролі даної системи антигенів, вище ми вже зазначили, що вона забезпечує індивідуальну тканинну специфічність індивіду і еволюційну толерантність до оточуючого середовища. Насьогодні досить глибоко вивчаються механізми цих процесів на рівні визначення асоціативного зв'язку з певними патологіями. Наприклад, відомо, що при злоякісних трансформаціях клітин, має місце зміна експресії антигенів груп крові. Так, при серологічних дослідженнях деякими авторами відмічений факт соматичної

модифікації - втрата антигенів А і В. Вважається, що при розвитку пухлинного процесу перше місце за поширенням посідає група крові А, друге місце - група О, але в окремих випадках (множинна мієлома) за частотою зустрічальності перше місце посідає група О. Соматична модифікація антигенів даної системи на рівні специфічності спостерігається також при дії шкідливих екзогенних чинників.

З позицій взаємозв'язку тканинних детермінант і патології, такі зміни на рівні специфічності свідчать про взаємний вплив патологічного процесу і тканинних структур генетичної схильності. Вважають, що така зміна генетичних маркерів груп крові може бути пов'язана з порушенням активності глікозилтрансферази, ферменту, який є первинним продуктом відповідного гену і який визначає синтез групових еритроцитарних антигенів. Оскільки зміни у серологічній активності антигенів А і В спостерігаються задовго до розгортання клінічної картини захворювання, цей факт може бути використаний для розпізнавання передпатологічних станів.

Можливі також випадки, коли основу механізмів асоціативного зв'язку генетичних АВО-детермінант з окремим захворюванням складають відмінності в структурних основах А, Н, В і О антигенів в кДНК.

Групові антигени АВО визначаються вже в ранньому ембріональному періоді, починаючи з 4-го - 6-го місяців ембріонального розвитку плоду, але досягають повної активності в межах трьох років життя. Групові ізогемаглютиніни з'являються в більш пізній період індивідуального розвитку. Специфічність антигенів не змінюється на протязі всього життя, хоча при деяких патологічних станах можлива соматична модифікація, зниження серологічної активності і зтирання антигенів з наступним відновленням (дивись вище). Групові антигени визначаються не тільки в еритроцитах, але і в тканинах печінки, нирки, мозку плоду в пізнішому

ембріональному періоді. Антигени O і H визначаються ще більш пізніше – після народження і формуються тільки з першого року життя.

Структура і біохімічна природа антигенів A, B і H

Структура реактивних специфічних груп антигенів A, B і H може бути представлена формулами:

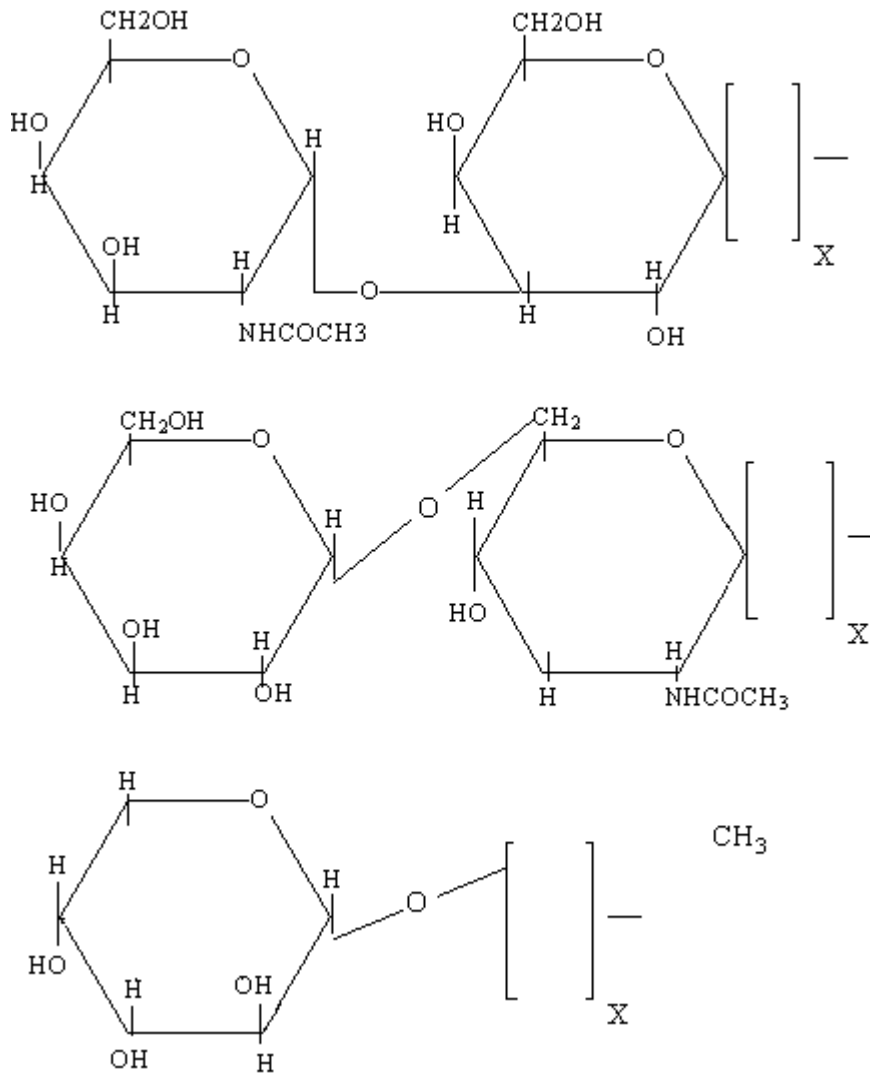


Рисунок 4.1.1 – Біохімічна структура антигенів груп крові A, B, H (Boyd, Бойд 1962).

За даними Morgan специфічна речовина **O(H)** є загальною для всіх груп крові, оскільки вона з'являється в результаті ферментативного розщеплення як антигена A так і антигена B ферментами із *Clostridium*

tertium і *Trichomonas foetus* і є замаскованою детермінантними сахарами цих антигенів. Під впливом вже генетичних механізмів із цієї основної речовини синтезуються специфічні антигени для кожної групи крові. Тобто, на сьогодні немає сумнівів в тому, що біосинтез групових антигенів здійснюється під контролем відповідних генів, але певний порядок сахаридів в ланцюгу групових полісахаридів здійснюється не шляхом матричного механізму, як для протеїнів, а виникає як результат строго координованої дії специфічних глікозилтрансферазних ферментів. Згідно гіпотезі Watkins, Morgan групові антигени, структурні детермінанти яких є вуглеводами, можна розглядати як вторинні продукти генів. Первинними продуктами генів є протеїни – глікозилтрансферази і при суцям цим ферментам властивість переносу особого сахару і поєднання його з іншими молекулами для утворення специфічних детермінант.

Визначено, що за хімічною природою антигени А, В, Н є гліколіпідами і глікопротеїнами. Три детермінанти мають один і той же хімічний склад. Відмінності в серологічній специфічності визначаються термінальними цукрами, які закріплені на основному ланцюзі і є відмінними у даних трьох антигенів:

L- фукоза

D- галактоза

Na-цетілглюкозамін

N-ацетілгалактозамін

Схематично синтез антигенів А,В,Н відбувається таким чином:

Рис. Синтез антигенів А,В,Н

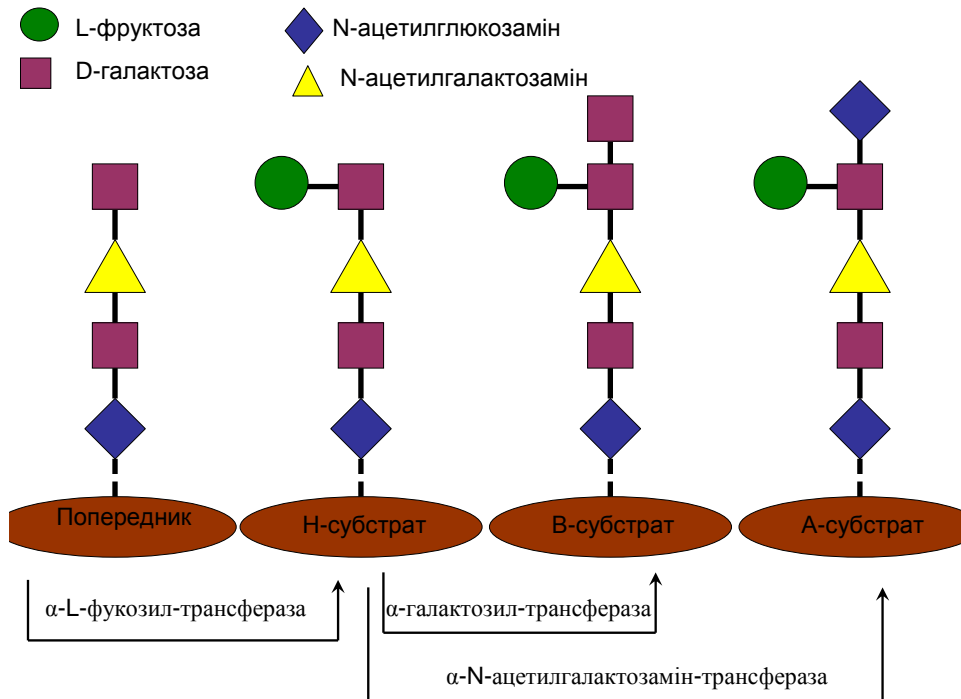


Рисунок 4.1.2 – Біохімічний склад антигенних детермінант А, В, Н (Цитовано за Минеевой Н.В.,2004)

На мембрані одного еритроцита людини вміщується близько 10^6 А і В антигенних детермінант. Оскільки серологічно активні ділянки розміщуються на поверхні еритроциту і є легкодоступними для антитіл, реакція гемаглютинації між антигенами системи АВО і специфічними антитілами відбувається безпосередньо в сольовому середовищі без додавання колоїдних розчинів.

Таким чином, білковими продуктами генів А, В, Н і Le є специфічні глікозилтрансферази, які каталізують переніс сахарів від глікозидної похідної нуклеозиддифосфату на вуглеводні ланцюги глікопротеїна-попередника. Серологічні, генетичні і біохімічні дослідження дають можливість припустити, що гени, які контролюють синтез групових речовин, задіяні лише на пізньої стадії формування макромолекули попередника і надають йому конкретну специфічність.

Генетика АВО системи

Система АВО(Н) складається з пари поліалельних генів, число яких у кожного індивіду не может бути більше двох.

Основна речовина Н може мутувати в трьох різних напрямках

- O_c, A_c, B_c :
 - O_c, A_c, B_c - повна мутація;
 - $A_1; A_2; A_3; A_4; A_5$ - проміжна*

Наприклад, коли ми говоримо про повну мутацію відносно алеля А, ми маємо на увазі групу крові A_1 , з позицій серології, так зване А сильне (домінантний алель), коли ми говоримо про інші специфічності, зокрема про мутацію A_2 , то маємо на увазі серологічно А слабе (проміжна мутація – мінорний алель). Гени А і В є доміантними по відношенню до гену 0 і кодомінантними по відношенню один до одного. Ген 0 є рецесивним по відношенню до генів А і В. Насьогодні встановлено, що відмінності між A_1 і A_2 антигенами є якісними і кількісними. Якісні відмінності обумовлені особливостями біохімічної структури цукрів (більше розгалужена структура антигену A_1). Кількісні відмінності пов'язані зі збільшеним вмістом А детермінант на A_1 клітинах (приблизно в три рази) в порівнянні з A_2 клітинами. Для A_1 і A_2 клітин були визначені різні константи рівноваги і швидкість дисоціації комплексу антиген-антитіло. Частота зустрічальності варіантів антигена А в європейської популяції складає 1:50000 досліджень, в інших расах – частіше.

Таблиця 4.1.1 - Кількість А антигенних детермінант на еритроцитах осіб в залежності від варіанту антигена А.

Варіант антигена А	Число антигенних детермінант На еритроциті
A_1	810 000 – 1 170 000
A_2	160 000 – 440 000
A_3	40 600 - 118 000

A_x	7 500 – 10 500
A_{end}	2 100 – 2 700
A_m	100 - 1900
A_{el-}	100 - 1400
A_y	100 - 1900

Слабкі форми В антигена B_3 , B_x , B_w , B_m , також існують, але є дуже рідко поширеними серед населення Європи. За частотою зустрічальності вони більш поширені серед населення Китаю.

Гени системи АВО

О ген

Завдяки прогресу новітніх біотехнологій cDNAs O клітин, гомологічних до A і B генів були ізольовані, ідентифіковані і упорядковані. Результати досліджень показали високу гомологічність O генів з A і B генами, які виключають одну нуклеотидну делецію для більшості обох типів загальних типів O алелі, або нуклеотидні заміщення в додавання до цієї делеції у варіанті O алелі. Таким чином, визначено три типа алелі O , які відрізняються за такими ознаками:

O^I алель. Делеція нуклеотида 261 G, викликана зміщенням зчитування основи (основания, остова, каркаса) і кодуванням неактивного протеїну. Зчитування основи відбувається в новому кінці кодона (TAA) 353 – 355 нуклеотидів, інші кінці TGA 386 – 388 кодона, є бездіяльними і набагато коротшими ніж нормальний A чи B ензим ([рис. 4.1.2](#); [4.1.3](#)).

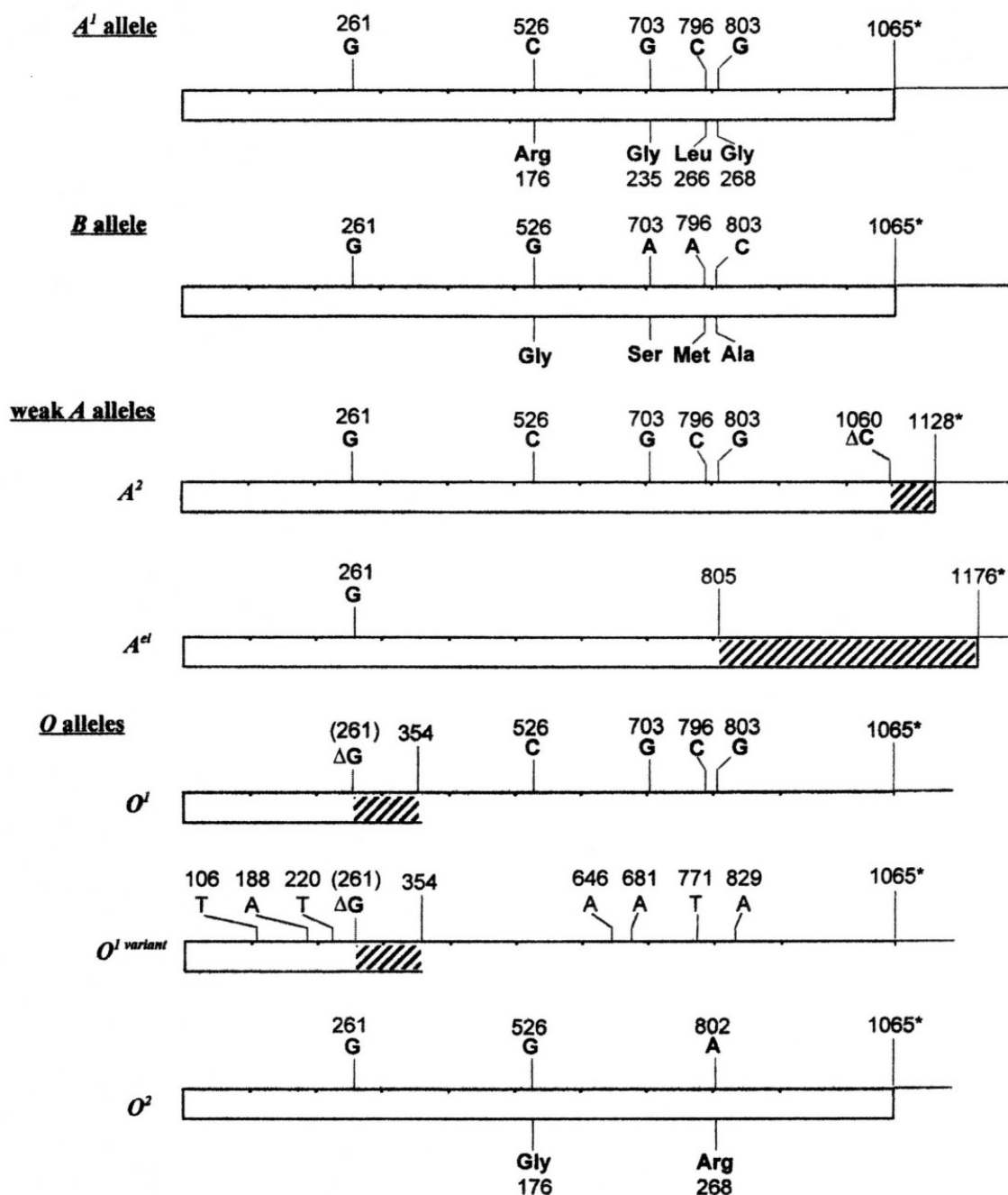


Рисунок 4.1.2 - Структура *A*¹, *B*, слабких *A* та *O* алелей. *A*¹, *B*, слабкі *A* алелі кодують (відповідно) *A*₁, *B*, *A*₂ та *A*_d ферменти, структурні відмінності між ними показані на верхніх чотирьох схемах. Три типи *O* алеля, *O*¹-варіант та

O^2 , що кодують неактивні білки, показані на нижніх трьох схемах. А1 та В алелі мають термінуючий кодон в області нуклеотиду 1063-1065 (якщо рахувати від ініціюючого кодона). Кількість ключових нуклеотидів, що складають відмінності між цими алелями, показано в верхній частині кожної схеми. Амінокислотний залишок, що відрізняється в А та В ферментах, показаний внизу кожної схеми (Houkomori D., 2004).

O^2 алель. Мутація нуклеотида G 802 викликає заміну гліцину на аргинін (Gly by Arg) що призводить до блокування активності А і В ензимів, завдяки чому амінокислоти можуть забезпечувати регіон для зв'язування з цукровим нуклеотидом. Немає делеції 261 G в O^2 алелі (рис.4.1.2). Дана алель вміщує близько 5% усіх O алелей O^1 -варіант алель. Поширений варіант алелі O^1 був не так давно описаний Olsson and Chester і отримав назву O^1 в або O^1 варіант. Дана алель розкриває 9 нуклеотидних послідовностей і ще вміщує 261 G делецію, тобто 4 в екзоні 7, один в екзоні 6, один в екзоні 5, два в екзоні 4 і один в екзоні 3. Розміщення цих змін, за виключенням 189 T в екзоні 4 і 297 G в екзоні 6, показані і пояснюються (рис.4.3) в legend. В доповнення до O^1 , O^2 і O^1 варіант алелям був визначений новий тип O алелі в результаті комбінації A^2 з нуклеотидної делецією A^{el} нуклеотидної вставкою.

Відмінності між А і В генами

cDNA, яка кодує В трансферазу була клонована, базуючись на високій гомологічності з А трансферазою. Були визначені **4 послідовних відмінних нуклеотидних заміщень** серед декількох клонів cDNA А трансферази і для cDNA В трансферази, ізольованої з різних джерел. Ці загальні відмінності між А титрованої (vs) cDNA В трансферазою показано на [Fig. 2](#). Нуклеотидні числа в цієї cDNAs на один кодон (три нуклеотида) вище ніж у клону FY-59-5 і кількість амінокислотних послідовностей вище.

В процесі досліджень виникло питання - чи є превалюючими заміщення чотирьох амінокислот між А і В трансферазами у відмінності визначення активності А і В? Аналогічні конструкції порівнювались в плазмідах, які були трансфектовані (заражені клітини чужеродною нуклеиновою кислотою) в HeLa клітини (генотип **OO**) і презентовані в групах крові А і В відповідними антигенами. Результати свідчать, що третій і четвертий нуклеотиди (i.e. nucleotides 796 and 803) і амінокислоти, які кодовані таким чином (i.e. 266 and 268), є домінуючими у визначенні активності А чи В трансфераз. Це, можливо, забезпечується завдяки 266 і 268 амінокислотам, які зв'язують регіони UDP-GalNAc або UDP-Gal.

Відмінності між A^1 , A^2 і іншими слабкими (мінорними) А алелями

A_1 трансфераза якісно відмінна від A_2 трансферази у відношенні опізнання типу 3 ланцюга Н (А-асоційовані Н) або типу 4 ланцюга Н (globo-Н). На основі вивчення відмінностей між генами, які кодують A_1 і A_2 трансферази проведено порівняння нуклеотидної послідовності і амінокислотної послідовності між A_1 і A_2 трансферазами. Отримані результати ілюструють вагомі відмінності між ними, (рис. 4.1.3) A^1 алель має кінцевий кодон TGA, який складений з 1063 – 1065; С-кінець амінокислоти Р закодований в слідуєчому кодоні CCG. В A^2 алелі С в 1059 – 1061 віддалений, таким чином, зміщується зчитування матриці, видалення кінцевого кодона і подовження С-кінця до 22 амінокислот. Тобто, A_2 ензим може бути подовженим до залишених 375 з С-кінцем F. Дана гіпотеза передбачає, що саме подовження може впливати на каталітичну активність трьох амінокислот (235, 266 и 268). Слабкий варіант фенотипу A_x дає негативну або слабку аглютинацію з анти-А, но активну зі сумішшю анти-А і анти-В антитілами. A^x алель має одне нуклеотидне заміщення (T A at nucleotide 646), яке призводить до заміни в положенні 216. Інша слабка (мінорна) підгрупа А

- A^3 алель, була визначена як вміщуюча одне базове заміщення (G 871 A), яке складається в Asp-291 Asn.

Слабка В підгрупа (B^3 алель) характеризується поодиноким нуклеотидним заміщенням 930 A.

A

	234						252			261		270			
A/B	ACA	CCG	TGT	AGG	AAG	GAT	GTC	CTC	GTG	GTG	ACC	CCT	TGG	CTG	GCT
	T	P	C	R	K	D	V	L	V	V	T	P	W	L	A
O	*	*	*	*	*	*	*	*	*	GTA	CCC	CTT	GGC	TGG	CTC
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	P	L	G	W	L

	279			288			297			306		315			
A/B	CCC	ATT	GTC	TGG	GAG	GGC	ACA	TTC	AAC	ATC	GAC	ATC	CTC	AAC	GAG
	P	I	V	W	E	G	T	F	N	I	D	I	L	N	E
O	CCA	TTG	TCT	GGG	AGG	GCA	CAT	TCA	ACA	TCG	ACA	TCC	TCA	ACG	AGC
	P	L	S	G	R	A	H	S	T	S	T	S	S	T	S

	324			333			342			351		359			
A/B	CAG	TTC	AGG	CTC	CAG	AAC	ACC	ACC	ATT	GGG	TTA	ACT	GTG	TTT	GCC ---
	Q	F	R	L	Q	N	T	T	I	G	L	T	V	F	A
O	AGT	TCA	GGC	TCC	AGA	ACA	CCA	CCA	TTG	GGT	TAA	CTG	TGT	TTG	CCA ---
	S	S	G	S	R	T	P	P	L	G	=	no translation			

B

	1040			1050			1060			1071	
A¹	AAC	CAC	CAG	GCG	GTC	CGG	AAC	CCG	TGA	GCG	GCT
	N	H	Q	A	V	R	N	P	=	-----	
A²	*	*	*	*	*	*	*	CGT	GAG	CGG	CTG
	*	*	*	*	*	*	*	R	E	R	L

			1080			1090				1104	
A¹	GCC	AGG	GGC	TCT	GGG	AGG	GCT	GCC	GGC	AGC	CCC
	no translation										
A²	CCA	GGG	GCT	CTG	GGA	GGG	CTG	CCG	GCA	GCC	CCG
	P	G	A	L	G	G	L	P	A	A	P

		1110			1120			1128		
A¹	GTC	CCC	CTC	CCG	CCC	TTG	GTT	TTA	---	
	no translation									
A²	TCC	CCC	TCC	CGC	CCT	TGG	TTT	TAG		
	S	P	S	R	P	W	F	=		

Рисунок 4.1.3 - Делеція нуклеотидів, яка виникає на участку після рамки зчитування, спостерігається в O^1 та A^2 алелях. (Верхня група) Порівняння нуклеотидних послідовностей та амінокислотних послідовностей між A^1 і A^2 алелями. Делеція нуклеотиду 1060 С в A^1 алелі призводить до зсування рамки зчитування, порушує термінуючий кодон TGA (1063-1065). Подовження з 22 амінокислот в С-термінальному регіоні показано виділеними літерами. *, ідентичні амінокислоти, як показано вище. =, термінуючий кодон.

—, нуклеотиди без трансляції. (Нижня група) Структура O^I алеля, що походить від делеції 261 G в A та B нуклеотидній послідовності. Ця делеція призводить до зміщення рамки зчитування, в результаті чого утворюється новий термінуючий кодон TAA в нуклеотидах 353-355. Встановлена амінокислотна послідовність, що кодується рамкою зчитування, показана виділеними літерами. Короткий поліпептид, що утворюється, складається з 30 амінокислот і є A та B неактивним (Houkomori D., 2004).

Таким чином, в слабких A і B фенотипах насьогодні ще невідомо, саме яке поодиноке заміщення в алелі стало причиною зниження активності A чи B трансфераз і експресії A або B антигенів.

Геномна побудова ABO генів

Зміна гліколізаційного зв'язку з диференціацією та розвитком в онтогенезі залежить від зміни експресії гена глікозамінотрансфераз в залежності від впливу різних чинників. Антигени A та B груп крові не експресуються взагалі у мозку, мінімально – на мезенхімальних клітинах печінки, селезінки і нирок, і високо експресується на епітеліальних клітинах гастроінтестинального тракту, роту, бронхолегеньової і сечеполової тканини.

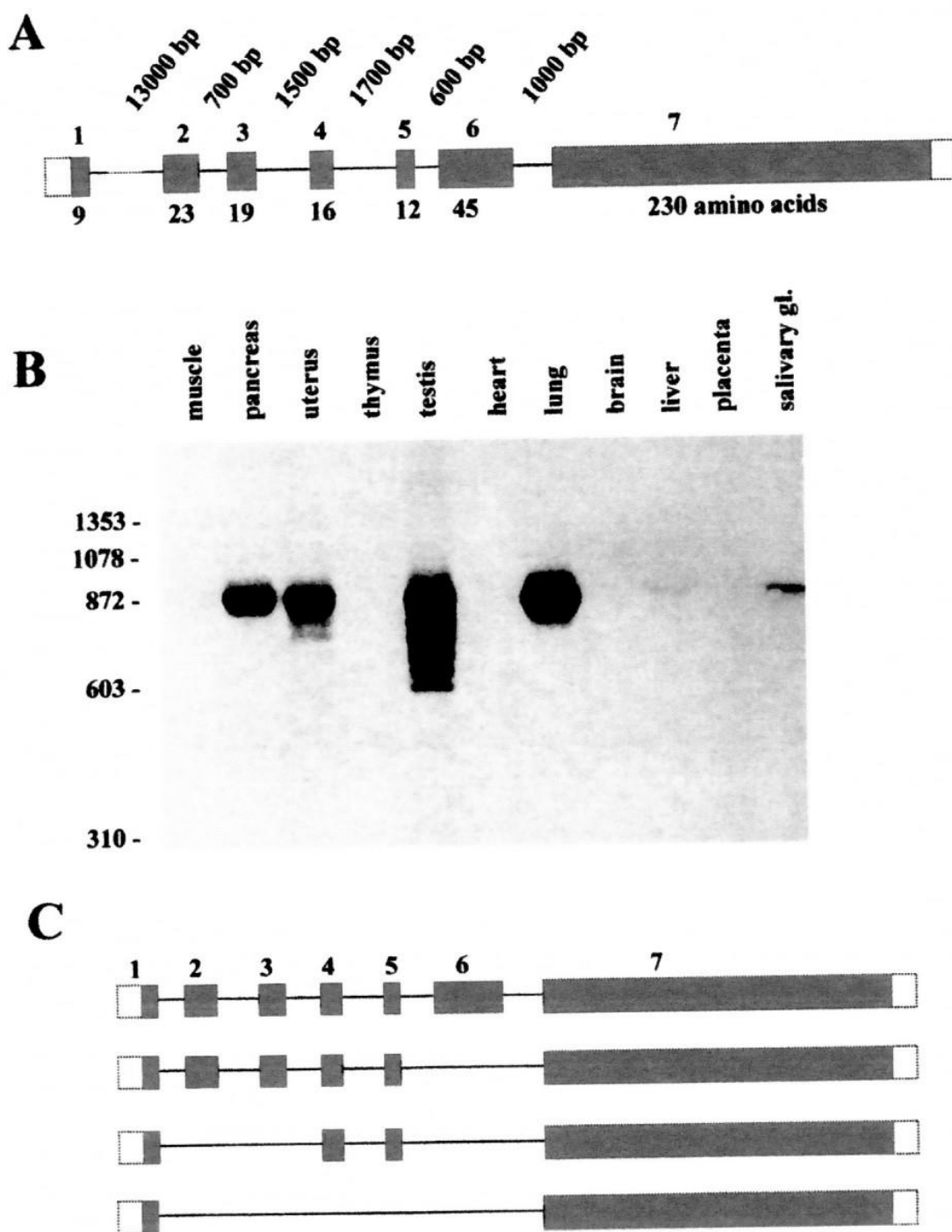


Рисунок 4.1.4 - Організація АВО локусу людини і РТ-ПЛР аналіз транскрипту гена АВО в органах людини. (А) Екзонна та інтронна організація зрілого загального локусу АВО. Розмір інтрону (п.о.) показаний між кожним екзоном, крім між екзонами 1 і 2. Цифра внизу кожного екзону вказує число кодованих амінокислот. (В) РТ-ПЛР продукт гібридизований з 7 специфічним зондом. Привертає увагу повна відсутність транскрипту в м'язах, тимусі, серці, мозку, плаценті та ступінь гетерозиготності в кожному

органі. (С) Гетерогенність транскриптів у тканині яєчка. (Houkumogi D., 2004).

Зміни специфічності і серологічної активності А та В антигенів може відбуватись при онкогематологічної атології, або в продовж онтогенеза людини. Тобто, експресія гену складно регулюється різними типами клітин і що така регуляція становиться аберантною при патологічних станах. Який же є регуляторний механізм? Часто експресія регулюється шляхом ініціювання транскрипції і відповідальності *cis*-регуляторних елементів ДНК так же добре, як і *trans*-виконуючих факторів, які можуть бути визначені. Продемонстровано, що це є геномна ДНК довжиною ~19 kb на 9 хромосомі q34 смуга. Локалізація exons і introns були картовані і нуклеотидні exon-intron boundaries були визначені. Послідовність смуг (хромосоми) відповідає GT-AG правилу і це правило має відношення до усіх поєднуючих зв'язків АВО генів людини. АВО гени людини складаються з 7 екзонів і кодуються із послідовністю цих екзонів довжиною більш 18 kb геномної ДНК. Екзони з 1 по 5 мають протяжність від 35 до 69 bp. Більшість кодованих послідовностей презентовані в 7 екзоні, який складається з 688 bp. Гідрофільний регіон зазначений трансмембранним доменом і представлений, головним чином, в екзоні 2. Нуклеотид G 261, делеція якого представлена O алелем, розміщеним в 6 екзоні каталізується доменами, які локалізовані в 7 екзоні. По суті, за схожею генетичною побудовою АВО локуса, який складений з 7 екзонів, він був визначений як єдиний клон, який отримали при скринингу P1 phage library, за допомогою ПЦР праймерів FY57 и FY46. Типова геномна структура і особливість (pattern) експресії була розшифрована в різних органах людини. Високу гетерогенність транскрипту знайдено в яєчках; гомогенність транскрипту була визначена в підшлункової і слинної залозах і на мінімальному рівні, - в печінці. Не виявлено транскрипт в м'язах, тимусі, серці, мозку і плаценті.

I	0 0	0	00 I	AO II	00 I	BO III	00 I	AO II	BO III
II	A -	A	AO II	AA II	AO II	AB IV	AO II	AA II	AB IV
		0	00 I	AO II	00 I	BO III	00 I	AO II	BO III
III	B -	B	BO III	AB IV	BO III	BB III	BO III	AB IV	BB III
		0	00 I	AO II	00 I	BO III	00 I	AO II	BO III
IV	A B	A	AO II	AA II	AO II	AB IV	AO II	AA II	AB IV
		B	BO III	AB IV	BO III	BO III	BO III	AB IV	BB III

Примітка. В таблиці наведені усі можливі комбінації успадкування від батьків генетичних алелей на рівні специфічності і проявлення у фенотипі груп крові. Наприклад – *AO* генотип проявиться як фенотип II і група крові за фенотипом буде позначена як A(II).

Можливі унікальні комбінації:

1. IIxIII = F1: у нащадков всі чотири групи крові будуть представлені з однаковою певністю.
2. IxIV = F1: групи крові нащадків не будуть співпадати з групами крові їх батьків.

Фенотипово антигени A і B проявляються з однаковою інтенсивністю як в однократній, так і в подвійній дозі (AA; AO)

Вплив біологічних чинників на ізоантигени системи AB0

Світові багаточисельні дослідження свідчать про стабільність антигенів еритроцитарних систем крові на рівні специфічності, зокрема системи **AB0**.

Антигени даної системи, як правило не підлеглі якісним змінам на протязі індивідуального життя людини. Відмічаються лише кількісні зміни. Сформовані досить рано (в еритроцитах плоду к 2 – 3 місяцям внутрішньотробоного життя), групові антигени досягають найбільшої активності в 3 роки. На протязі кількох десятків років активність їх утримується на постійному рівні, а потім спостерігається поступове зниження. Навіть після смерті людини клітини тканин і органів зберігають ізоантигенні ознаки досить довго, поки їх складові речовини не зазнають

значних змін і розпаду. Одним із значних чинників цього процесу є мікробний світ. Ферментативні процеси розпаду клітин тканин і органів, які викликані дією мікроорганізмів, порівняльно швидко призводять до зміни внутріклітинних речовин, які обумовлюють тканинно специфічну функцію. Але якщо труп зберігається при низьких температурах, процеси розпаду є повільними і групоспецифічні речовини можуть зберігатися впродовж невизначеного часу. Цей факт має значення для трансплантаційної імуногенетики, оскільки пересадка тканин і органів від кадаверного донора повинна базуватись на тканинній сумісності за антигенами еритроцитів і лейкоцитів.

Таким чином, на сьогодні не викликає сумніву, що антигенний поліморфізм генетичних систем еритроцитів, зокрема АВО системи, має важливу фізіологічну функцію – еволюційно забезпечує стабільність імунного гомеостазу людини в оточуючому середовищі. Інтенсивність антигензалежного антитілогенезу, авидність продукованих антитіл, ступінь ізосенсибілізації організму інтегрально відображають стан імунного гомеостазу при дії антигенно чужерідними агентами. Тобто імуногенетичні аспекти поліморфізму генетичних систем крові дають можливість зрозуміти ізосерологічні підходи до характеристики антигензалежних антитіл з позицій загальної імунології.

Питання для самоконтролю.

1. Сформулюйте, що таке ізосерологічна система, колекція, серія антигенів груп крові.
2. Які генетичні механізми відповідають за алельність систем еритроцитарних антигенів.

3. За якими характеристиками особи розподіляються відносно класів виделителів і невиделителів за системою АВО
4. Охарактеризуйте антигени А, В, Н за хімічною природою
5. Надайте характеристику геномної побудові АВО генів.
6. Назвіть відмінності між А і В генами.
7. Які форми генетичної варіабельності ознак ви знаєте.
8. Назвіть види посттрансфузійних ускладнень.
9. Що таке сенсibiliзація організму і яке значення має предсенсibiliзація для трансфузійної терапії.
10. Яке значення має тканинна несумісність батьків за системою АВО в системі мати – плід.

Характеристика групових антитіл АВО

Вище ми вже розглянули загальну характеристику антитіл генетичних систем еритроцитів і з'ясували, що розрізняють дві категорії групових антитіл: **природні, які виникають в процесі формування організму людини і ізоіmunні, які виникають в результаті іmunізації людини груповими антигенами А і В.** Природні антитіла, як правило, пов'язані з γ М-глобулінами. Ізоіmunні групові антитіла пов'язані як з γ М, так і з γ G глобулінами. За даними характеристиками до антитіл, які продукуються в межах системи **АВО** відносяться **як природні так і ізоіmunні антитіла.**

Характеристика антитіл системи АВО

Анти-А+ А₁ антитіла - природні, повні, холодкові, абсорбуються речовинами А і В, руйнуються при нагріванні до 70° впродовж 10 хвилин.

Анти-А+ А₁; ; Анти-В антитіла - інколи ізоіммунні, неповні, теплові, не абсорбуються речовинами А і В, не руйнуються при нагріванні до 70° впродовж 10 хвилин.

Анти-0 антитіла - повні, холодкові, аглютинують 0, А₂В і А0, не абсорбуються речовиною Н.

Анти-Н антитіла - зустрічаються у людей (А₁ або А₁В – виделітелів), повні, холодкові, іноді зустрічаються у тварин (природні - бик, угорь)

Ізоіммунні (кролик, коза, курча)

В сироватці крові можуть зустрічатись усі три класи групових АВ0(Н) імуноглобулінів IgM; IgA; IgG. Антитіла секреторного типу (IgA) зустрічаються в молозиві, молоці, слині, мокроті. Біля 90% імуноглобулінів γ A зустрічається в молозиві і титр їх значно вище ніж у сироватці. У осіб групи 0 обидва типи антитіл – анти-А і анти-В завжди відносяться до одного класу імуноглобулінів. І γ M, так і з γ G групові антитіла мають гемолітичні властивості, тобто властивості зв'язувати комплемент в присутності відповідного антигену. Навпаки, γ A антитіла гемолізу не викликають, оскільки не зв'язують комплемент. Групові антитіла анти-А в залежності від відношення до конкретного класу імуноглобулінів мають неоднакову здібність нейтралізації груповою субстанцією А. Активніше нейтралізуються молекули γ M –антитіл, трудніше – γ G. Молекули антитіл з властивостями γ A по активності займають середнє місце. Імуноглобуліни класу γ G (AB0) підвищують свою активність в сироватковому середовищі по відношенню до сольовому розчину. Молекули антитіл класів γ A і γ G здатні сенсibiliзувати еритроцити і в таких випадках виявляються в пробі Кумбса з сироваткою анти-.G. До нагрівання більш групові антитіла γ M в порівнянні з γ G.

Групові антитіла починають виявлятися у людини в перші місяці після народження і досягають максимального титру в 5 – 10 років. Потім титр природніх антитіл утримується на високому рівні на протязі багатьох років, але з віком він поступово знижується, що інтегрально свідчить про зниження адаптаційних можливостей організму в оточуючому середовищі. В нормі титр ізогемаглютининів α у дорослих знаходиться в діапазоні 1:64 – 1:512, а титр ізогемаглютининів β – в межах 1:16 -1:64. Тобто титр антитіл β завжди значно нижче титру антитіл α . У випадках гіпо- або агамаглобулінемії групові антитіла виявляються в дуже низькому титрі, або не виявляються зовсім.

Ще в 1933 році Fritdenreigh, Witt встановили, що відповідно складу еритроцитів групи В, ізогемаглютинини β також представлені неоднорідним складом за своєю специфічністю. Є три типи агглютининів β_1 , β_2 , β_3 . у одних осіб (рідко) присутні одразу усі три типи ізогемаглютининів, у інших – β_1 відсутній, але як правило присутній фенотип β_2 . В сироватці крові здорової людини окрім гемаглютининів можуть виявлятися і гемолізینی, але в невисокому титрі. Гемолізینی α більш активні ніж гемолізینی β . У імунізованих осіб імунні аглютинини анти-А і анти-В майже завжди супроводжуються імунними гемолізінами анти-А і анти-В. При підвищенні титру аглютининів титр гемолізінів також може нарастати. Тобто, ізоімунні гемолізини є протиеритроцитарними антитілами, які в присутності комплекменту викликають гемоліз еритроцитів. Активними чинниками гемолітичних реакції є також імунні комплекси антиген-антитіло та система комплекменту, яка активується за класичним шляхом, коли фрагменти компонента С3 приєднують імунний комплекс до рецепторів на мембрані еритроцитів. Оскільки мембрана еритроцитів має три види рецепторів CR1; CR2; CR3, щільність і афінність яких є надзвичайно високою, лізіс еритроцитів відбувається швидко. Тобто, імунний конфлікт за ситемою АВО обумовлений тим, що формування комплексу антиген-антитіло відбувається

в епітопах мембрани еритроцитів, в яких розташовані групові антигени даної системи і саме які є індукторами антитілоутворення. Таким чином, ізосенсибілізація організму людини до антигенів системи АВ0(Н) в усіх випадках є небезпечною і має велике значення в прикладній медицині в галузі трансфузіології, імуноконфліктних станів в системі мати-плід, в трансплантології.

До останніх часів в світовій практиці трансфузіологів існувало поняття „універсальний донор” на основі вивчення структури і серології антигенів системи АВ0(Н) і розроблені основні принципи переливання крові.

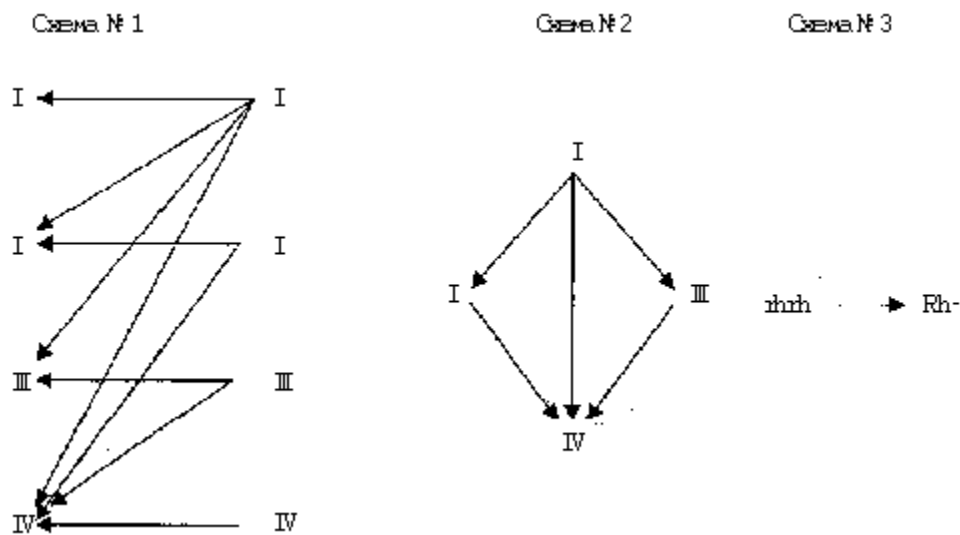


Рисунок 4.1.6 - Принцип переливання крові

Згідно цієї схеми були зазначені основні імуногенетичні параметри поняття „універсальний донор” і обчислена частота зустрічаємості індивідів з таким фенотипом крові.

Таблиця 4.1.3 - Частота зустрічаємості універсального донора і універсального реципієнта (по двом параметрам: група крові АВ0 і резус-фактор; в%)

Група крові	I	II	III	IV
	00	A0 (AA)	B0 (BB)	AB
Резус фактор	43%	37%	13%	7%
Резус- позитивний	I Резус- позитивний	II Резус- позитивний	III Резус- позитивний	IV Резус- позитивний
Rh+	00 Rh +	A0 (AA) Rh +	B0 (BB) Rh +	AB Rh +
85,0%	36,55%	31,45%	11,05%	5,95%
Резус- негативний	I Резус- негативний	II Резус- негативний	III Резус- негативний	IV Резус- негативний
rh rh	00 rh rh	A0 (AA) rh rh	B0 (BB) rh rh	AB rh rh
15,0%	6,45%	5,55%	1,95%	1,05%

Вважається, що універсальний донор – людина з групою крові 0 α β , резус-негативний - генотип 00 rh rh. Частота зустрічаємості в популяції - 6,45%.

Універсальний реципієнт – людина з групою крові AB₀ IV, резус-позитивний; генотип AB Rh. Частота зустрічаємості - 5,95%. **Але на сьогодні, коли встановлені факти негативного впливу високих титрів ізогемаглютининів „універсального донора” на реципієнта, непреложним правилом є переливання тільки сумісної за груповими факторами крові. Застосування крові „універсального донора” дозволено лише у виключних випадках, оскільки в трансфузійній практиці найважливішою умовою є запобігання посттрансфузійних ускладнень.**

За механізмом дії розрізняють два види посттрансфузійних ускладнень:

Прямі: руйнування еритроцитів донора антителами реципієнта

Побічні: руйнування еритроцитів реципієнта антителами донора (приклад – небезпечний універсальний донор).

Прикладне значення ізоімуних антитіл всіх еритроцитарних систем крові в практичній медицині не обмежується завданнями трансфузіології. Несумісність за антигенами еритроцитарних антигенів, зокрема за антигенами системи АВ0, може викликати ізоімунізацію організму матері в системі мати-плід, що супроводжується продукцією специфічних антитіл, титр яких підвищується в динаміці вагітності і може призвести до мертво народження, або до гемолітичної хвороби немовляти. Продукуються в таких випадках антитіла анти-А і антиВ. За імуноглобуліновою структурою ці антитіла належать до класу IgM, тобто за серологічною ознакою – повні крупно молекулярні антитіла.

За даними технічного бюлетеню № 148, 1990, „супровід ізоімунізації при вагітності” світової спільноти акушерів і гінекологів розроблена діагностична система сумісності пар мати-плід за системою АВ0.

Оцінюючи можливість ізосенсибілізації організму матері в період вагітності можна мінімізувати негативні наслідки тканинної несумісності дитини і матері. Встановлено, що гемолітична хвороба новонароджених (ГХН), яка викликана АВ0 несумісністю реалізується досить часто, але тяжкі форми хвороби діагностуються досить рідко. Це можна пояснити тим, що антигени плоду мають ще досить низьку імуногенність (чутливість до відповідних антитіл), а також тим, що антитіла анти-А і анти-В у кровообігу матері частково блокуються різними субстанціями цих антигенів плоду. В деяких випадках для лікування ГХН потребуються замінні переливання крові, тому під час вагітності проводять інтенсивну десенсибілізуючу терапію для мінімізації можливих важких наслідків.

Таблиця 4.1.4 – Діагностична система сумісності пар мати-плід за системами крові АВ0 та резус-фактор.

	0(I)Rh-	0(I)Rh+	B(III)Rh-	B(III)Rh+	A(II)Rh-	A(II)Rh+	AB(IV)Rh-	AB(IV)Rh+
AB(IV)Rh+	X	X	X	X	X	X	X	X
AB(IV)Rh-	X		X		X		X	
A(II)Rh+	X	X			X	X		
A(II)Rh-	X				X			
B(III)Rh+	X	X	X	X				
B(III)Rh-	X		X					
0(I)Rh+	X	X						
0(I)Rh-	X							

В таблиці позначені (X) сумісні комбінації антигенів пар мати-плід за фенотипами АВО і резус, коли не виникає імунологічного конфлікту в системі мати-плід. В усіх інших випадках виникає імунологічний конфлікт між антигенами матері і плоду, що призводить до продукції специфічних антитіл (сенсibiliзації) в крові матері, які впливають на плід і можуть викликати гемолітичну хворобу новонародженого.

У сироватці кордової крові виявляються антитіла, які є ідентичними антитілам у сироватці крові і молоці матері, але вони можуть бути зовсім неактивними у відношенні до еритроцитів дитини. Треба відзначити, що наявність ізоімуних анти-А і анти-В антитіл у вагітних жінок не завжди є ознакою імуноконфліктної вагітності тому, що дівчата з 0(I) групою крові можуть отримувати антигени А і В ще в дитинстві внаслідок щеплення, оскільки препарати для щеплення виготовляють на сироватці коней, що мають систему груп крові подібну до людської. Інколи до моменту першої вагітності в організмі майбутньої мами вже накопичені антитіла проти еритроцитів плоду, інколи – формується імунологічна пам'ять і при несумісності за антигенами матері і плоду вже при першій вагітності продукуються специфічні антитіла.

Велике значення має несумісність за антигенами системи АВО в трансплантаційній практиці, оскільки сенсibiliзація організму реципієнта може призвести до виражених пострасфузійних реакцій (при великій

кількості перелитої крові навіть до летального кінця), а при органної трансплантації до відторгнення аллотрансплантату.

Таким чином, значна фізіологічна роль системи еритроцитарних антигенів АВО в еволюційному існуванні людини в оточуючому середовищі, свідчить про необхідність не тільки розуміння структури і функції антигенів, але і розуміння закономірностей активізації антитілогенезу в процесі антигенної стимуляції, що не тільки розширює уяву про механізми формування імунних реакцій, але і дозволяє своєчасно ідентифікувати стан сенсibilізації на рівні специфічності антитіл, що, в свою чергу, дозволяє мінімізувати наслідки сенсibilізації організму людини.

Питання для самоконтролю.

1. Які структурні і серологічні відмінності існують між двома категоріями групових антитіл – природних і ізоімуних.
2. Що таке ізогемаглютиногени і ізогемаглютиніни.
3. Назвіть основні принципи переливання крові.
4. До якого класу за імуноглобуліновою структурою і серологічною ознакою належать антитіла системи АВО.
5. Надайте загальну серологічну характеристику груповим антителам системи АВО.

4.2. Визначення еритроцитарної групи крові за системою АВО.

В кров'яному руслі людини виявлено понад 600 антигенів. Всі форменні елементи крові, білки плазми, а також тканини мають свою антигенну структуру, індивідуальну для кожної людини. За різноманітними сполученнями антигенів, які містяться тільки на поверхні еритроцитів, виділяють понад 1,5 млн. груп крові.

Групами крові, як правило, називають природні імуногенетичні ознаки крові людини, що являють собою певні сполучення групових ізоантигенів (аглютиногенів) в еритроцитах із відповідними їм антигенами в плазмі. Групи крові – це спадкові ознаки крові, які формуються в період ембріогенезу і не змінюються в природних умовах за весь період життя людини.

На поверхні еритроцитів кожної людини розташовані багато чисельні групові антигени, які формують незалежні системи груп крові з одною або кількома парами антигенів.

Для еритроцитарної групи крові людей АВО постійною ознакою є наявність ізоантигенів А і В на поверхні еритроцитів та аглютинінів - α (анти-А) і β (анти-В) в плазмі крові. Різні сполучення цих компонентів формують 4 групи крові: $0\alpha\beta$ (I); $A\beta$ (II); $B\alpha$ (III); AB_0 (IV).

(табл. 4.2.1, рис. 4.2.1).

Таблиця 4.2.1 - Групи крові людини за системою АВО

Групи крові	Аглютиногени, які містяться в еритроцитах	Аглютиніни, які містяться в сироватці крові
0(I)	0	α та β
A(II)	A	B
B(III)	B	A
AB(IV)	A та B	0

Виходячи з загальної характеристики антитіл генетичних систем еритроцитів відносно категорій (природні, які виникають в процесі формування організму людини і ізоіммунні, які виникають в результаті імунізації людини груповими антигенами А і В), α (анти-А) і β (анти-В) ізогемаглютиніни відносяться до природних антитіл і пов'язані з γ М-глобулінами. При несумісних га груповою принадністю гемотрансфузіях продукуються ізоіммунні антитіла, які належать до класів імуноглобулінів IgM і IgG. На рис. __ представлено якої специфічності антитіла мають синтезуватися по відношенню до групової специфічності антигена.

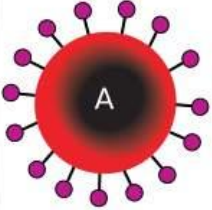
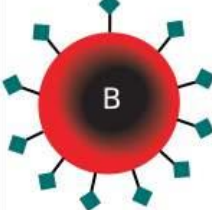
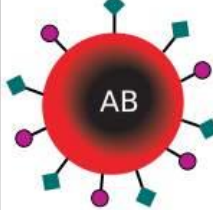
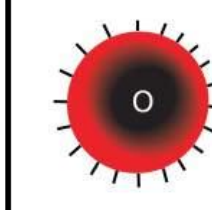
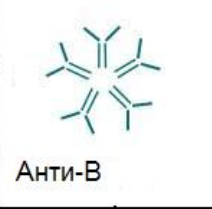
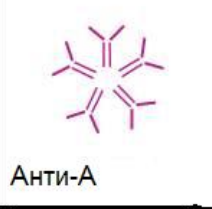
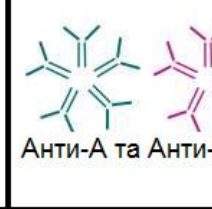



	A(II)	B(III)	AB(IV)	O(I)
Еритроцити груп крові				
Антитіла	 Анти-В	 Анти-А	Антитіла відсутні	 Анти-А та Анти-В
Антигени	 А антиген	 В антиген	 А та В антигени	Антигени відсутні

Рисунок 4.2.1. - Антигени та антитіла в залежності від груп крові за системою АВО

Таким чином, група крові $O\alpha\beta$ (I) характеризується наявністю в сироватці аглютининів α і β ; група крові $A\beta$ (II) - еритроцити містять тільки аглютиноген A, в плазмі присутній аглютинін β ; група крові $B\alpha$ (III) - еритроцити містять тільки аглютиноген B, в плазмі міститься аглютинін α ; група крові $AB(IV)$ - на еритроцитах присутні антигени A і B, плазма аглютининів α та β не містить.

Відкриття групи крові ABO дало розуміння таких явищ, як сумісність та несумісність при переливанні крові. Під сумісністю розуміють біологічно сумісне сполучення крові донора та реципієнта за антигенами та антитілами, що сприятливо впливає на стан реципієнта. Для забезпечення сумісності слід зважати на те, щоб донорська кров та її компоненти належали до тієї ж групи системи ABO, що і кров реципієнта. Переливання крові іншої групи при наявності в крові донора групових антигенів, до яких в кров'яному руслі реципієнта знаходяться антитіла, призводить до несумісності і розвитку трансфузійних ускладнень. У виняткових випадках можливе переливання еритроцитів крові (але не цільної крові) групи O(I) реципієнту з іншою групою крові в невеликих дозах і тільки дорослим пацієнтам. Це обмеження пов'язано з тим, що в крові групи O(I) присутні α - і β -антитіла, які в деяких випадках мають велику активність і можуть викликати несумісність при наявності у реципієнта ізоантигена A та/або B (табл. 4.2.2.).

Таблиця 4.2.2 - Варіанти несумісності за системою крові ABO

Кров донора	Кров реципієнта			
	$O\alpha\beta(I)$	$A\beta(II)$	$B\alpha(III)$	$AB(IV)$
$O\alpha\beta(I)$	-	+	+	+
$A\beta(II)$	+	-	+	+
$B\alpha(III)$	+	+	-	+
$AB(IV)$	+	+	+	-
Еритроцити донора	Кров реципієнта			
	$O\alpha\beta(I)$	$A\beta(II)$	$B\alpha(III)$	$AB(IV)$
O(I)	-	-	-	-

A(II)	+	-	+	-
B(III)	+	+	-	-
AB(IV)	+	+	+	-

Примітки: "-" – відсутність аглютинації;

"+" – наявність аглютинації.

Існують підтипи (слабкі варіанти) антигену А в більшій мірі та антигену В – рідше. Антиген А має декілька варіантів: "сильний" А1 (понад 80%), слабкий А2 (менше 20%), та ще більш слабкий (А3, А4, Ах - рідко). Слабкі форми антигенів А та В можуть викликати помилки при визначенні груп крові за системою АВО. Цей факт слід враховувати при визначенні групи крові та переливанні крові, оскільки можливі нещасні випадки при визначенні донорської крові А2(II) як групи крові О(I), чи донорської крові А2В (IV) - як групи крові В (III). Точне визначення слабких варіантів антигенів А та В потребує досліджень із специфічними реагентами. Суттєве зниження або повна відсутність природних аглютининів α та β іноді трапляється при імунодефіцитних станах (у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями та онкогематологічною патологією – хвороба Ходжкіна, множинна мієлома, гострі та хронічні лейкемії; уродженими гіпо- та агамаглобулінеміями; у новонароджених дітей та людей похилого віку; при проведенні імуносупресорної терапії та під час тяжких інфекцій. Труднощі у визначенні груп крові в наслідок пригнічення реакції гемаглютинації виникають також після введення плазмозамінників, переливання крові, трансплантації органів та тканин, септичних станах та інш.

Таким чином, розподіл груп крові за системою АВО ґрунтується на виявленні на поверхні еритроцитів групових антигенів (аглютиногенів) А та В, а в сироватці крові - певних антитіл (аглютининів) α та β . При з'єднанні відповідних аглютиногенів (А та α чи В та β) виникає аглютинація (склеювання) еритроцитів та їх руйнування (гемоліз). Гемаглютинація – це

процес склеювання та випадіння в осад еритроцитів під впливом вірусів, бактерій, токсинів та інших чинників, що здатні адсорбуватися на поверхні еритроцитів, а також гемаглютининів.

Методи визначення груп крові за системою АВО.

Визначають групи крові за системою АВО за допомогою реакції аглютинації еритроцитів у нативній або стабілізованій за допомогою консервантів (гепарин, цитроглюкофосфат, глюгіцир та ін.) крові, яку брали з пальця або вени. Реакцію проводять у спеціально обладнаному приміщенні з достатнім освітленням в температурному режимі від 15°C до 25°C, при масовому скрикуванні – на планшетах або за допомогою автоматичних систем; при індивідуальному визначенні - на білій порцеляновій або іншій плоскій пластинці з поверхнею, яка змочується, або прозорій гідрофільній поверхні при кімнатній температурі, хорошому освітленні приміщення. Існують три стандартних способи визначення груп крові:

- визначення груп крові за допомогою стандартних моноклональних антитіл (ізогемаглютинуючими сироватками)
- визначення груп крові перехресним способом: одночасно за допомогою стандартних моноклональних антитіл та стандартних еритроцитів;
- гелевий тест.

Перший спосіб дозволяє стандартними ізогемаглютинуючими сироватками із специфічними моноклональними антитілами класу М (анти-А, анти-В, анти-АВ) визначити групу крові людини за системою АВО – шляхом виявлення антигенів А і/або В еритроцитів людини за допомогою прямої реакції аглютинації. На планшет або пластинку під відповідними написами наносять по одній краплі (100 мкл) діагностичних моноклональних антитіл анти-А, анти-В, анти-АВ. Поруч з краплями антитіл наносять по одній краплі (50 мкл) крові, що досліджується. Реагенти

та кров ретельно змішуються індивідуальною для кожної реакції піпеткою або скляною паличкою. Спостерігають за ходом реакції при легкому похитуванні пластини або планшету протягом 5 хвилин.

Результат реакції в кожній краплі може бути негативним або позитивним. Позитивний результат виражається в аглютинації еритроцитів. Аглютинацію можна спостерігати неозброєним оком у вигляді дрібних червоних агрегатів, які швидко зливаються, утворюючи великі аглютинати. При негативній реакції крапля залишається рівномірно забарвленою у червоний колір, аглютинати в ній не спостерігаються. Аглютинація з моноклональними діагностичними реагентами, як правило, настає у перші 3-5 секунд, однак спостереження слід вести протягом 5 хвилин, тому що можливий більш повільний початок аглютинації з еритроцитами, які містять слабкі різновиди антигенів А або В. Аглютинації немає (-) ні з реагентом анти-А, ні з реагентом анти-В, ні з реагентом АВ. Отже, еритроцити, що досліджувалися, не мають антигенів А та В і кров належить до групи 0 (I). Це підтверджується наявністю аглютинінів α та β і в досліджуваній сироватці (плазмі) за результатом позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами груп А(II) та В(III).

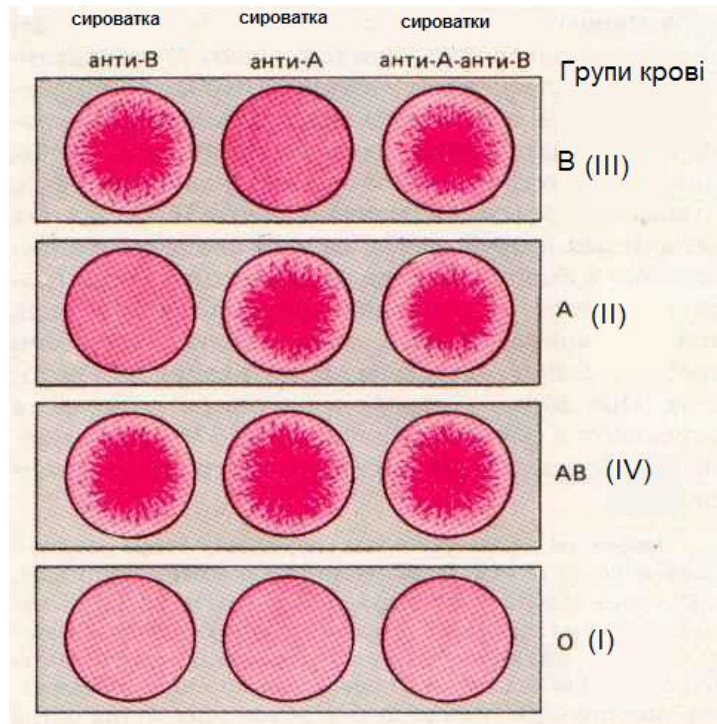


Рисунок 4.2.2 - Схематичне зображення обліку результатів при визначенні груп крові АВО

Другий спосіб визначення груп крові за системою АВО передбачає одночасне використання ізогемаглютинуючих сироваток із специфічними моноклональними антитілами та стандартних еритроцитів. Цей спосіб дозволяє виявити наявність чи відсутність групових антигенів (А, В) та визначити наявність чи відсутність групових антитіл (α , β), що в результаті дозволяє отримати повну групову характеристику крові.

Для аналізу кров беруть завчасно з вени в пробірку і досліджують після розділення на сироватку та еритроцити. На пластинку під попередньо нанесеними відповідними маркувальними записами, як при першому способі, наносять по одній краплі (100 мкл) діагностичних моноклональних антитіл анти-А, анти-В, анти-АВ. Поруч з краплями антитіл наносять по

одній краплі (50 мкл) еритроцитів крові, що досліджується. На нижню частину пластинки наносять три краплі сироватки крові (100 мкл), що досліджується, а поруч з ними по одній краплі (50 мкл) стандартних еритроцитів в наступній послідовності з ліва на право: група O(I), A (II) і B(III). Еритроцити групи O(I) є контролем, оскільки вони не повинні давати реакцію аглютинації ні з якою сироваткою. У всіх зразках сироватку ретельно перемішують з еритроцитами індивідуальною для кожної реакції піпеткою або скляною паличкою. Спостерігають за ходом реакції при легкому похитуванні пластини і додаванні ізотонічного розчину хлориду натрію протягом 5 хвилин.

1. Аглютинація (+) спостерігається з реагентом анти-A та реагентом анти-AB. Отже, еритроцити, що досліджувалися, містять у своєму складі тільки антиген A, і кров належить до групи A(II). Це підтверджується наявністю аглютининів β у досліджуваній сироватці (плазмі) за результатом позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами групи B(III) .

2. Аглютинація (+) спостерігається з реагентом анти-B та реагентом анти-AB. Отже, еритроцити, що досліджувалися, містять у своєму складі тільки антиген B, і кров належить до групи B(III). Це підтверджується наявністю аглютининів α у досліджуваній сироватці (плазмі) за результатом позитивної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами групи A(II) .

3. Аглютинація (+) спостерігається з реагентом анти-A, з реагентом анти-B, з реагентом анти-AB. Отже, еритроцити, що досліджувалися, містять у своєму складі обидва антигени A та B, і кров належить до групи AB(IV). Це підтверджується відсутністю аглютининів α та β у досліджуваній сироватці (плазмі) за результатом негативної реакції аглютинації зі стандартними еритроцитами груп A(II) та B(III).

Трактування результатів реакції аглютинації з моноклональними діагностичними реагентами анти-А, анти-В, анти-АВ представлено у таблиці 4.2.3 , в якій також зведені результати визначення аглютининів в сироватці крові (плазмі) досліджуваної крові за допомогою стандартних еритроцитів.

Таблиця 4.2.3 - Трактування результатів визначення груп крові системи АВО за допомогою моноклональних діагностичних реагентів та стандартних еритроцитів.

№	Реакція еритроцитів, які досліджуються з діагностичними моноклональними реагентами			Реакція сироватки (плазми), що досліджується, із стандартними еритроцитами груп		Кров, що досліджується, належить до групи
	анти-А	анти-В	анти-АВ	А(II)	В(III)	
1	–	–	–	+	+	О(I)
2	+	–	+	–	+	А(II)
3	–	+	+	+	–	В(III)
4	+	+	+	–	–	АВ(IV)

Примітки: "–" – відсутність аглютинації;

"+" – наявність аглютинації.

Визначення специфічності реакції аглютинації за системою АВО

Реагенти анти-А, анти-В та анти-АВ для визначення груп крові виготовлені на розчині хлористого натрію, що перешкоджає спонтанній аглютинації еритроцитів. Однак, для виключення аутоаглютинації , яка може спостерігатися у деяких хворих (мієломна хвороба, опікова хвороба, а також у пуповинній), крові новонароджених, у випадку позитивної реакції

аглотинації з реагентами анти-а, анти-В та анти-АВ, тобто встановлення групи крові А(IV), необхідно провести додаткове контрольне дослідження зразка крові з ізотонічним розчином хлористого натрію. Для цього змішують одну каплю (100мкл) ізотонічного розчину з каплею (50мкл) крові, що досліджується. При відсутності аглотинації у цій контрольній каплі кров належить до групи АВ(IV). За наявності спонтанної аглотинації (позитивна реакція в контрольній каплі) рекомендується повторити визначення групи крові використовуючи відмиті еритроцити зразка крові.

У випадку розбіжності результатів визначення груп крові у донорів за допомогою моноклональних реагентів та за допомогою стандартних еритроцитів не допускається використання такої крові для переливання хворим.

До помилок в оцінці результатів при визначенні груп крові за системою АВО може призвести неправильний порядок розташування реактивів і нанесення їх на пластинку (відмінності у маркуванні і нанесенні реактивів), недотримання часового та температурного режимів проведення реакції, відсутність контрольних досліджень, забруднення чи використання вологих піпеток, скляних паличок чи пластин, а також використання неякісних стандартних реактивів, наприклад з простроченими строками використання чи забруднених.

Третім способом визначення груп крові за системою АВО є проведення гелевого тесту. Зазвичай серологічні дослідження ґрунтуються на реакції гемаглотинації і проводяться у рідинно-фазових системах. Гелева технологія передбачає розділення еритроцитів за допомогою центрифугування в гелі, при цьому неаглотиновані еритроцити (негативний результат) проходять крізь гель та осідають на дні пробірки, в той час як аглотиновані еритроцити (позитивний результат) затримуються на поверхні чи в селевому шарі. Гель може бути нейтральним або містити в собі

специфічні реагенти, наприклад антиглобуліновий реагент чи специфічні антисироватки до еритроцитарних антигенів. Гелева система являє собою пластикові картки, які містять мікропробірки заповнені гелем. За допомогою селективної технології визначають фенотип еритроцитів, скрикують та ідентифікують антитіла, проводять антиглобуліновий тест і тести на сумісність.

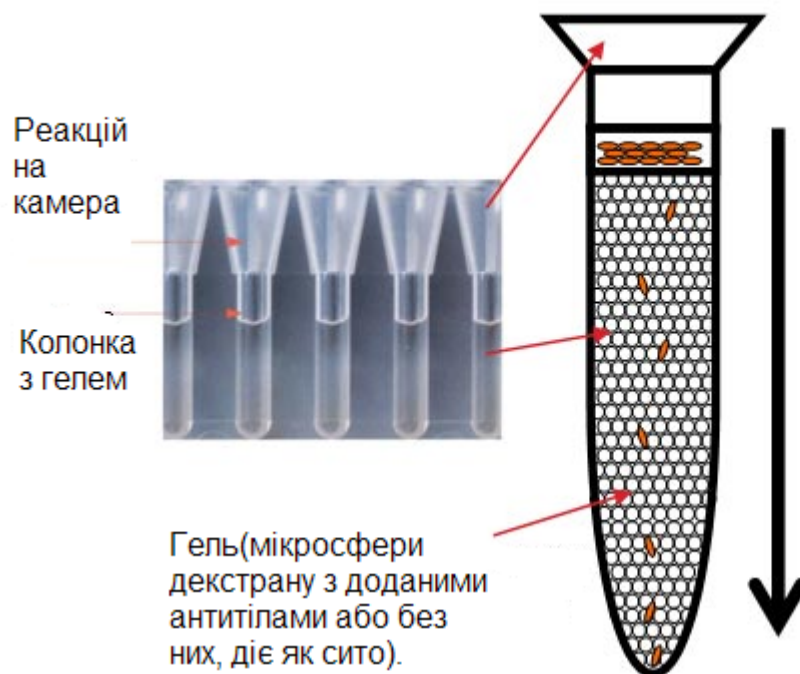


Рисунок 4.2.3 - Схематичне зображення гелевої колонки

Пластикові картки для визначення АВО-фенотипу складаються з трьох мікропробірок, дві з яких містять суміш гелю і специфічних антисироваток з моноклональними антитілами (анти-А, анти-В,); третя мікропробірка – контрольна, містить суміш гелю з буферним розчином без антитіл. Кров для дослідження відбирають з використанням антикоагулянтів. Готують 5% суспензію крові у спеціальному розчині ферменту бромеліну. Суспензію інкубують 10 хвилин при кімнатній температурі і додають по 10 мкл в мікропробітки промаркованої пластикової картки. Картку центрифугують і проводять зчитування результатів. При негативному результаті - шар еритроцитів на дні мікропробірки, аглютинація відсутня. Позитивний результат – дрібнозерниста або середньозерниста аглютинація в нижній, верхній частині чи по всій довжині мікропробірки. В контрольній пробірці – реакція завжди негативна.

Гелева технологія є більш досконалою за традиційні серологічні методики, особливо це стосується визначення та ідентифікації певних антитіл. Висока чутливість гелевих тестів дозволяє підвищити ступінь виявлення клінічно значимих антитіл, однак відносно висока вартість методу перешкоджає його широкому використанню.

Результати визначення груп крові повинні бути записаними особою, яка проводила дослідження, згідно з укладеним порядком в реєстраційний журнал, а при необхідності в документ, що засвідчує особу, з вказанням дати і підпису.

Іноді результати визначення груп крові за фенотипом еритроцитів та специфічності нормальних сироваткових гемаглютининів не співпадають з очікуваними. Стандартні реагенти анти-А та анти-В, якими визначають фенотип еритроцитів в системі АВО, мають високу провідність і активно

аглютинують еритроцити, які експресують відповідні антигени. Менш виражену реакцію вважають аномальною.

До основних причин аномальних реакцій відносяться такі:

1. Дуже слабка реакція при визначенні сироваткових гемагютинінів спостерігається, якщо:
 - при постановці реакції використовують еритроцити з невідповідними підгрупами антигенів А та В;
 - реакцію проводять із зразками сироваток літніх людей, дітей раннього віку та хворих;
 - досліджують сироватку близнюків з імунологічним химеризмом.
2. „Неочікувані” реакції при визначенні фенотипу еритроцитів в системі груп крові АВО трапляються, якщо:
 - еритроцити фенотипів A_2 , A_2B чи іншої рідкісної підгрупи типують за допомогою анти- A_1 реагенту;
 - для типування застосовують антитіла, специфічні до антигенів іншої системи груп крові.
3. Слабка чи „мішана” аглютинація досліджуваних еритроцитів під впливом анти-А або анти-В реагентів реєструється, якщо:
 - А-антиген еритроцитів належить до рідкісної підгрупи;
 - досліджувані еритроцити здатні до полі аглютинації;
 - еритроцити були тримані від близнюків з імунологічним химеризмом чи від хворого з гематологічною патологією та хворого, якому нещодавно перелили кров.

Питання для самоконтролю:

1. На якому принципі ґрунтуються методи визначення груп крові за системою АВО?
2. Основні способи визначення груп крові за системою АВО?
3. Які відомі фенотипи еритроцитів в системі АВО?
4. Що необхідно враховувати при оцінці результатів?
5. Назвіть основні причини аномальних реакцій?

Література:

1. Косяков П.Н. Изоантигены и изоантитела человека в норме и патологии. М.: Медицина, 1974. – 360 с.].
2. Доссе Ж. Иммуногематология. - М.: Медгиз, 1959. - 638 с.
3. Иммуногенетика и эволюция/ Стил Э. Дж., Линдли Р. А., Бландэн Р. В.; Кузнецова О . В. (пер. с англ.); Животовский Л. А. (ред.). - М.: Мир, 2002. - 237с
4. Бойд В. Введение в иммунохимическую специфичность. М.: из-во иностр. лит., 1963. – 186 с.
5. Ройт А.,Бростофф Дж.,Мейл Д.Иммунология / Пер.с англ.В.И.Кандрора, А.Н.Маца,Л.А.Певницкого, М.А.Серовой.-М.;Мир,2000.-581с.
6. Имуносерология (нормативные документы):/А.Г.Башлай, Н.И.Блинов, З.Ф.Васильева и др.-М.;Мир,1998.-195с.
7. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л. Антигены эритроцитов человека // Гематология и трансфузиология. - 2001. - Т.46. - №5. - С.37-45.
8. Дерюгина Е.И. Группоспецифические антигены и антитела системы АВ0 человека: Обзор // Терапевтический архив. -1989. - Т.61, №7. - С.153-156.
9. Донсков С.И. Группы крови в биологии человека – факты и предположения. // Гематология и трансфузиология, 2001, т. 46, №5. – С.32-33.
- 10.Дизик Г.М. Особливості ізосеролопчної системи АВ0(Н) як складової частини гомеостазу людини // Гематологія та переливання крові. - К.: Нора-Прінт, 2001. - Вип.30. - С.31.
- 11.Донсков С.И. Группы крови в биологии человека – факты и предположения. // Гематология и трансфузиология, 2001, т. 46, №5. – С.32-33.

12. Прокоп О., Гелер В. Группы крови человека. - М.: Медицина, 1991. - 511с
13. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. - Киев: Здоров'я, 1990. - 200 с.
14. Імуногенетичні аспекти формування, особливостей перебігу і ефективності лікування хворих на множинну мієлому / Ж.Н.Минченко, І.А. Крячок, Е.А. Дмитренко, Т.Ю. Шляхтиченко, В.Г. Бебешко // Вісник наукових досліджень. - 2005, N 4 – С. 110-115.
15. Blume G., Forman S. Hematopoietic Cell Transplantation (2 nd Edit), edit Thomas E., Blackwell K. // Science Ins., 2000, - P.537-550.
16. Минеева Н.В. Группы крови человека: СПб., 2004. - 185с.
17. Имуносерология (нормативные документы): /А.Г.Башлай, Н.И.Блинов, З.Ф.Васильева и др.-М.; Мир, 1998. - 195с.

4.3 Генетична система Rhesus (резус)

Антигени системи Rhesus (резус) відкриті К.Ландштейнером і А.Вінером у 1940 році за допомогою сироватки, отриманої від кроликів, імунізованих еритроцитами макаки резус. Система Rhesus за своєю побудо-вою складніша від інших еритроцитарних систем і налічує в своєму складі шість основних антигенів, які позначаються за Рейссом-Фішером символами - D, C, E, d, c, e; а за Ландштейнером-Вінером (г, R, R⁰, R¹, R^{1'}). В залежності від наявності або відсутності антигена D (R) люди діляться на резус – позитивних (D⁺) та резус-негативних (D⁻), відповідно у кількості 85% і 15%, що характерно для європеїдів, для інших популяцій розподіл може бути відмінним від нього. За ступінню активності гени розташовуються наступним чином: D>C>E, що пов'язано з кількістю основної речовини – родоначальника специфічних субстанцій. Цей феномен носить назву „епістазії”. Найбільша вираженість на поверхні еритроцита і найбільша антигенна сила роблять антиген D найбільш значущим при проведенні гемотрансфузій і акушерській патології. Різновидів антигену D існує декілька D^w, D^u, D^{vi} і ін., які виявляються спеціальними реагентами. Антиген D_{c1} зустрічається на еритроцитах резус-негативних осіб у 10,3%

серед представників японської популяції. Питання розповсюдженості даного антигену серед інших популяцій і географічних регіонів залишається відкритим.

Найсуттєвішою відмінністю антигенної системи резус від АВ0-системи є відсутність природних антитіл проти антигенів, яких немає в крові даного індивідуума. Антитіла можуть з'явитись в організмі D позитивної особи тільки в результаті дії специфічного агенту (при імуноконфлікті за даної системою вагітністю, несумісного переливання крові, або штучної імунізації).

Класифікація антигенів системи резус

Насьогодні існує декілька класифікацій антигенів системи резус, які склалися історично на основі різних припущень. Класифікація Вінера зоснована на припущенні, що в Rh хромосомі існує тільки одне місце, яке може бути зайняте тільки одним із восьми алелемлрфних генів. Кожний ген кодує продукцію аглютиногену, який складається із комплексу антигенів. Класифікація за Вінером є досить складною і широко не застосовується за винятком обозначення специфічності на препараті імуноглобуліну антирезус, який отримують з донорської крові і маркетують як „Rh₀(D)”.

Класифікація за Фішером –Рейсом базується на припущенні наявності в Rh хромосомі трьох генів. Дана класифікація рекомендована для широкого експертним комітетом ВОЗ. Ця номенклатура дає уяву про те, як буде реагувати даний зірець еритроцитів з моноспецифічною анти сироваткою. Наприклад, сироватка анти с реагує з еритроцитами специфічності **cde/cDE**, але не реагує з еритроцитами специфічності **CDE/CDE**, оскільки вони не мають специфічності.

Таблиця 4.3.1 - Визначення деяких антигенів еритроцитів системи Резус по різним класифікаціям

По Вінеру		По Фішеру-Рейсу	По Розенфельду
Аглютиноген	Фактори		
Rh ₀	Rh ₀ hr hr ^{''}	cDe	Rh: 1, 4, 5
Rh ₁	Rh ₀ rh hr ^{''}	CDe	Rh: 1, 2, 5
Rh _z	Rh ₀ hr rh ^{''}	cDE	Rh: 1, 3, 4
rh	hr hr ^{''}	Cde	Rh: -1, 4, 5
rh	rh hr ^{''}	Cde	Rh: -1, 2, 5
rh ^{''}	hr rh ^{''}	cdE	Rh: -1, 3, 4
Rh ₂	Rh ₀ rh rh ^{''}	CDE	Rh: 1, 2, 3
rh _y	rh rh ^{''}	CdE	Rh: -1, 2, 3

Пізніше, в 1962 році, Розенфельдом була запропонована ще одна класифікація антигенів системи резус, яка за його задумом повинна була бути вільною від теорії наслідування. Сама система по суті є опис взаємодії зразка еритроцитів з відповідною анти сироваткою. Згідно з номенклатурою антигени мають порядкові номери, які відповідні часу їх відкриття. Присутність антигену на еритроциті позначається порядковим номером антигену, а відсутність позначається знаком “-“. Наприклад, наявність антигену D позначається таким чином : **Rh1**, а відсутність антигену позначається **Rh-1**. Насьогодні розроблена сучасна номенклатура системи резус:

Таблиця 4.3.2 - Антигени еритроцитів системи Резус

ISBT № антигену	Символ Антигену	ISBT № антигену	Символ антигену	ISBT № антигену	Символ антигену
RH1	D	RH21	C ^G	RH40	Tar
RH2	C	RH22	CE	RH41	Rh41
RH3	E	RH23	D ^w	RH42	Rh42
RH4	C	RH26	c-like	RH43	Crawford
RH5	E	RH27	cE	RH44	Now
RH6	F	RH28	hr ^H	RH45	Riv
RH7	Ce	RH29	Rh29	RH46	Sec
RH8	C ^w	RH30	Go ^a	RH47	Dav
RH9	C ^x	RH31	hr ^b	RH48	JAL
RH10	V	RH32	Rh32	RH49	STEM
RH11	E ^w	RH33	Rh33	RH50	FPTT

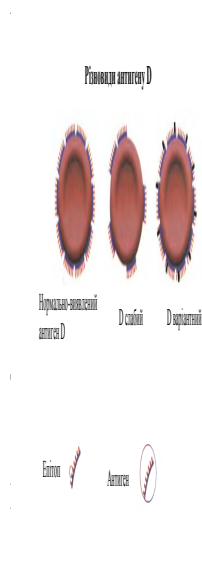
RH12	G	RH34	Hr ^b	RH51	MAR
RH17	Ht ₀	RH35	Rh35	RH52	BARC
RH18	Hr	RH36	Be ^a	RH53	JAHK
RH19	hr ^s	RH37	Evans	RH54	DAK
RH20	VS	RH39	Rh39	RH55	LOCR

Структура і біохімічна природа

Антигени системи резус мають білкову природу. Підтвердження цього факту є руйнування молекули антигену протеолітичними ферментами. Вміст білку антигену D на поверхні еритроциту складає 0,1%. Білки, як і ліпіди розподілені на мембранах еритроцитів нерівномірно, а саме антигенні ділянки поширені на мембрані випадковим чином.

Відомо, що антиген D складається зі структурних одиниць – епітопів. Насьогодні описано більш ніж 36 епітопів. Слід зазначити, що на еритроцитах різних індивідів з резус-позитивною принадністю за D-фактором можуть бути присутні як усі епітопи, так і відсутні деякі з них.

Еритроцити здорових осіб експресують всі епітопи антигену D – (повний) Антиген. Еритроцити, які експресують не всі епітопи антигену D, позначають як **D варіантний (D partial- частковий)**. Існують також поняття **D слабкий (D weak)** від **D варіантний (D partial)**, коли йдеться про знижену експресію антигену, внаслідок чого відсутність експресії деяких епітопів D антигену на еритроцитах обидвох видів антигену позначались загальним терміном **D^u** (неповний) за допомогою моноклональних антитіл є можливість визначити ці антигени і термін **D^u** в новій імуногематології більш не використовується.



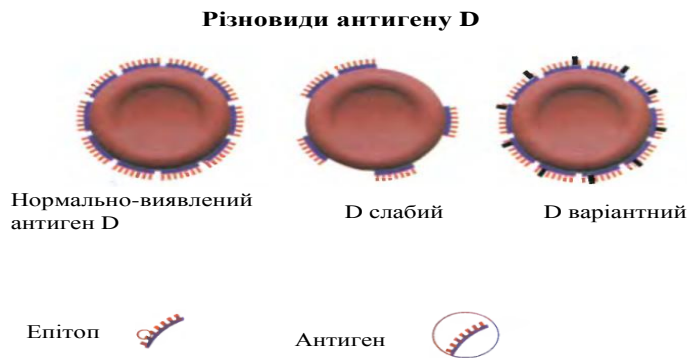


Рисунок 4.3.1 – Різновиди антигену D

D варіантний (D partial) антиген відрізняється від нормального антигену якісними змінами в структурі на рівні епітопів. Саме відсутність певних епітопів в антигенній структурі еритроциту і призводить до формування варіантних антигенів, серед яких частіше зустрічають с варіанти **DII** і **DIII**, які мають найбільше число епітопів D антигену. Всього описано 13 типів варіантних антигенів: **DII**; **DIIIa**; **DIIIb**; **DIVa**; **DIVb**; **DVa**; **DVI**; **DVII**; **DBT**; **DFR**; **RoHar**; **DHmi** ; **DHmii**.

Найменшу кількість епітопів мають наступні варіанти антигену D: **DVI**; **DBT**; **DFR**. В певних випадках у індивідів з варіантним фенотипом D виникають труднощі при ідентифікації резус-принадності у зв'язку відсутністю деяких епітопів. Слід відзначити, що в таких- випадках більш ефективним для ідентифікації антигену є застосування специфічної анти-D сироватки в порівнянні з моноклональними антитілами, оскільки сироваткові тест-системи мають широкий спектр епітопів, а моноклональні антитіла є вузько специфічними і не виявляють певні епітопи. Наприклад, еритроцити з **DVI** варіантом антигену не взаємодіють з більшістю зразків моноклональних IgM анти-D антитіл, бо не мають відповідного епітопа і повинні додатково тестуватися анти- D IgG цоліклонами. Теоретично

вважається, що особи з D- варіантними антигенами можуть продукувати антитіла до відсутніх епітопів, тому, в світовій практиці таким реципієнтам прийнято проводити гемотрансфузії резус негативним фенотипом крові.

На відміну від D- варіантного антигену, **D слабкий (D weak)** антиген характеризується кількісно зниженою експресією антигенних детермінант в 3-10 разів, що може призвести до помилкового заключення відносно резус-негативної принадності крові індивіду. Особи з антигеном **D слабким не здатні продукувати анти-D антитіла**. Особи з таким фенотипом еритроцитів вважаються резус-позитивними, незалежно від того, донори вони чи реципієнти. Відносно імуногенності **D варіантного (D partial) і D слабого (D weak)** антигенів чітких даних немає. Однак, для попередження можливої сенсibilізації організму людини до антигена **D при носійстві в фенотипі D слабого антигену кров донора вважається резус-позитивною, кров реципієнта вважається резус-негативною**.

Система резус вміщує в себе також цілий ряд інших алелей, які пов'язані зі специфічністю **Cc** і **Ee**, мають невелику поширеність, а тому і невелике трансфузійне значення. Серед них найбільш відомий **C^w**, який має структурні відмінності від антигену **C** системи резус. Доказом є продукція анти **C^w** антитіл у **C** –позитивних осіб. Для даного антигену властивий мозаїцизм – можливість синтезу одночасно з антигенами **C** і **c**. Тоді фенотип має такий вигляд **C+**, **c+**, **C^{w+}**. Такий же мозаїцизм є характерним і для інших рідких антигенів **D^w**, **E^w**, **E^t**, та **e^s** антигену. В 1958 році був відкритий антиген **G** який присутній майже на всіх еритроцитах з фенотипом **D** і **C**. Така присутність антигену **G** на еритроцитах **D**- специфічності, пояснює, чому при імунізації **D+** еритроцитами **rh**-негативних осіб їх сироватка взаємодіє з **C+** еритроцитами, що призводить до помилкового висновку відносно наявності анти-**C** антитіл. Антиген **G** є імуногенним і приблизно

30% сироваток анти- D і 100% сироваток анти DC мають додатково анти G антитіла.

Генетика системи резус

Генетичні дослідження антигенів системи резус свідчать про існування двох генів: **RHD** і **RHCE**, які відповідні за продукцію всіх антигенів даної системи. Наявність великої кількості антигенів системи резус пояснюється мутаціями в генах.

Ген **RHD** контролює продукцію антигена **D**, ген **RHCE** антигенів **C, c, E, e**. Не підтверджено існування антигена **d**, тому що не знайдено ген, який відповідає за синтез даного антигена. Незважаючи на це, в імуногенетиці (імуногематології) символ **d** застосовується для означення факту відсутності антигена **D** на еритроцитах при опису фенотипів. **Особи з резус-позитивною принадністю крові мають два гени RHD і RHCE, особи з резус- негативною принадністю крові мають один ген RHCE.**

Rh гени у осіб з резус-позитивною і резус-негативною належністю

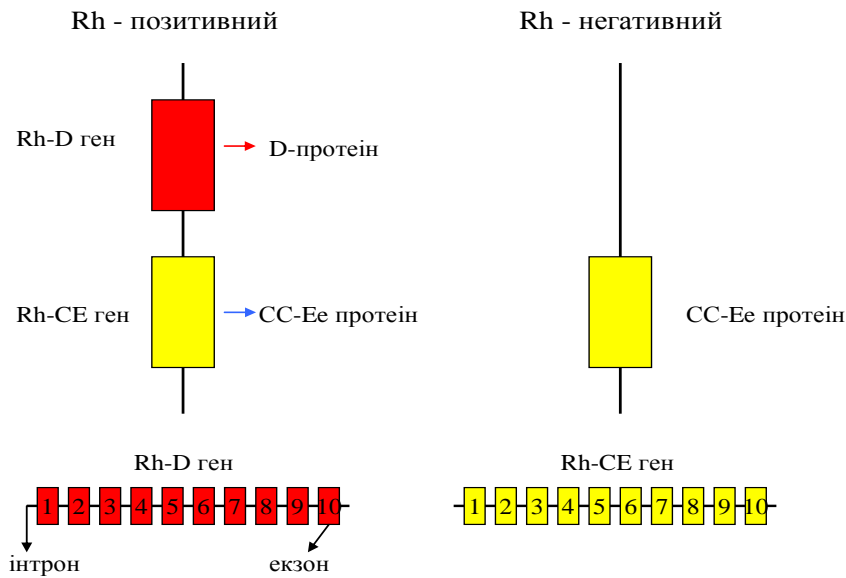
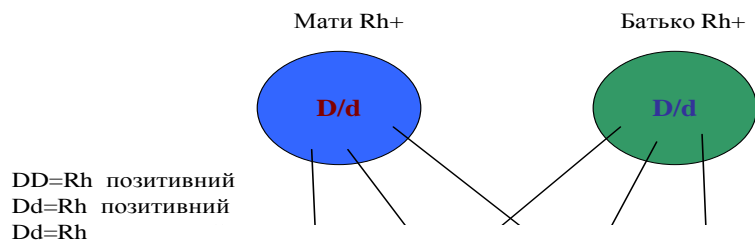


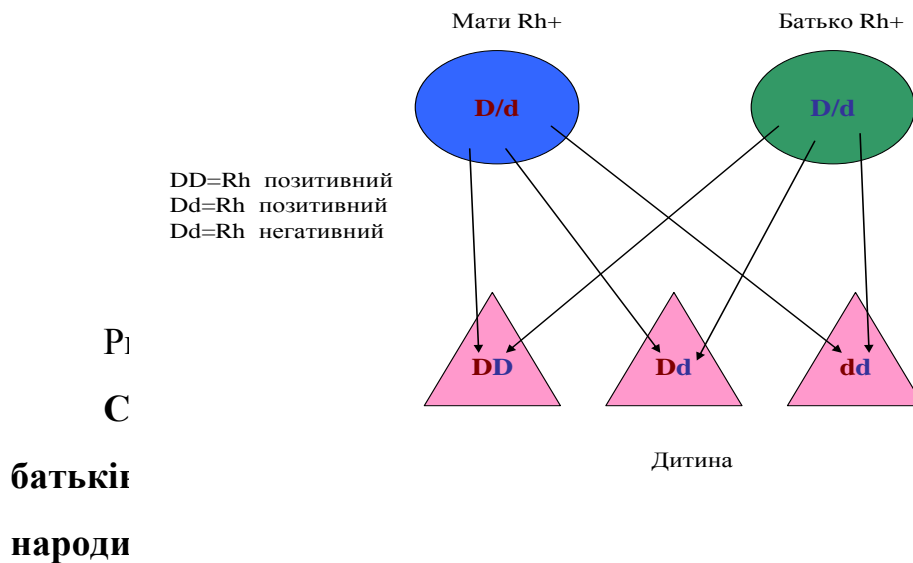
Рисунок 4.3.2 - Структура Rh генів у осіб з резус-позитивною і резус-негативною принадністю

Генотип індивіду складається із двох гаплотипів (гаплотип- комплекс генів на одній хромосомі, який наслідується разом) або генних комплексів, які передаються спадково: один від матері, інший –від батька. Кожний гаплотип складається з трьох антигенних детермінант: **D**, або відсутність **D**; **C** або **c**; **E**, або **e** в різних композиціях.

Успадкування антигену D



Успадкування антигену D



Кількість антигенних детермінант системи резус на еритроцитах людини має великий діапазон і залежить від генотипу. Для антигена D цей діапазон складає від 10000 до 200000; для антигена C - від 21500 до 56500; для антигена E – від 450 до 25000; для антигена c – 37000 до 85000; для антигена e – від 13500 до 24500. **Кількість антигенних детермінант для антигена D залежить від фенотипу антигенів еритроцитів системи резус. Зниження кількості антигенних детермінант D від 30000 до 10000 спостерігається в наступному порядку:**

DcE/DcE > DCe/DcE > Dce/Dce > DCe/DCe > DcE/dce > DCe/dce.

Чим більше антигенних детермінант на еритроцитах, тим більшу аглютинуючу активність вони мають, тим легше ідентифікуються за специфічністю.

Антитіла до антигенів системи резус.

Антитіла до антигенів системи резус являють собою виключно ізоімунні антитіла і продукуються в організмі як наслідок несумісних за специфічністю еритроцитів пар донор-реципієнт при гемотрансфузіях, або при вмуноконфліктних вагітностях при несумісності за антигенами резус в системі мати – плід. Як правило, антитіла до антигенів резус є імуноглобулінами класу G. Оскільки ізоімунні антитіла відрізняються в серологічному відношенні від природніх тим, що їх температурний оптимум дорівнює температурі тіла, анти резус антитіла являють собою теплові антитіла. За серологічною характеристикою антирезус антитіла є неповними антитілами, тобто, мають здібність викликати аглютинацію лише в певному середовищі (сироватка, плазма, альбумін, сік акації, декстран, желатин). У солевому середовищі такі антитіла фіксуються на еритроцитах, але не викликають їх аглютинації (сенсibiliзують еритроцити). Саму аглютинацію вони можуть здійснювати при умові обробки еритроцитів протеолітичними ферментами. За механізмом їх взаємодії з антигенами анти-резус антитіла є аглютинінами. Частота зустрічальності алоантитіл до антигенів системи резус залежить від імуногенності антигенів і поширеністю їх в популяції. Частіше виявляються антитіла анти D специфічності. За імуногенністю антигени системи резус розташовані слідуєчим чином: D>c>E>C>e. Є характерні особливості розподілення

антитіл анти резус відносно певних субкласів імуноглобулінів. Так, в основному антитіла представлені імуноглобулінами субкласів **IgG1 і IgG3**, які в основному і ідентифікуються при імуноконфліктних вагітностях і викликають гемолітичну хворобу новонароджених. В деяких випадках визначаються антитіла субкласів **IgG2 і IgG4**. Іноді у осіб, які не мали в анамнезу гемотрансфузій, або вагітностей визначають так звані, "натуральні" антитіла, які мають специфічність анти- E, або анти- C^w і належать до класів імуноглобулінів M і частково G. Дані антитіла можуть виявлятися також у хворих на аутоімунну гемолітичну анемію, яка обумовлена тепловими антитілами.

4.4 Визначення резус-належності крові

На еритроцитах людини розташовані п'ять основних антигенів системи резус (D, C, c, E, e), з яких найбільшу імуногенність має антиген D (Rh⁰(D)). Наявність чи відсутність цього антигену визначає резус-належність крові, особи, кров яких містить D-антиген, належать до групи резус-позитивних носіїв, резус-негативні особи не мають D-антигену. Імуногенність інших (мінорних) антигенів системи резус значно нижча і знижується в такому порядку: c>E>C>e. Визначення мінорних антигенів системи резус проводиться при індивідуальному підборі крові для багато чисельних трансфузій, у випадках, коли у сироватці крові реципієнта визначаються імунні антитіла системи резус, а також у жінок дітородного віку.

Антиген D має слабкі варіанти, об'єднанні в групу Dweak (D^u). Носіїв антигенів групи D^u біля 1% популяції. Еритроцити D^u майже не аглютинуються повними анти-резус антитілами в реакції прямої аглютинації. Для їх визначення слід використовувати неповні анти-резус антитіла в реакції аглютинації з антиглобуліновим реагентом (непряма проба Кумбса).

Більшість резус-негативних осіб мають фенотип dce, однак 2-5% осіб, які не мають на еритроцитах антигену D і резус-негативних за визначенням, мають фенотип dCe або dcE. Такі еритроцити можуть викликати імунну відповідь при переливанні їх реципієнтам з групою dce, тому рекомендується проводити тестування крові резус-негативних донорів з анти-С і анти-Е реагентами.

Резус-належність визначають в реакції аглютинації за допомогою моноклональних реагентів або ізоімунних антирезусних сироваток, призначених для виявлення Rh(D)-антигену в реакції прямої аглютинації (на площині і в пробірочному тесті; в сольовому середовищі; в присутності високомолекулярних підсилювачів; з еритроцитами, обробленими протеолітичними ферментами) або в непрямому антиглобуліновому тесті (непряма проба Кумбса).

Метод визначення залежить від класу антитіл в реагенті. Якщо в реагенті присутні повні антитіла (класу IgM), то реагент використовується для визначення резус-фактору методом прямої аглютинації в сольовому середовищі. Якщо в реагенті містяться неповні антитіла (класу IgG), то він використовується в реакції аглютинації в присутності високомолекулярних підсилювачів (альбуміна, желатини та ін.), з еритроцитами, обробленими протеолітичними ферментами, в непрямому антиглобуліновому тесті .

Існують наступні стандартні способи визначення груп крові за системою резус:

- реакція прямої аглютинації з моноклональними антитілами анти-D;
- реакція з універсальним реагентом анти-резус (D);
- реакція конглютинації з 10% розчином желатину;
- непрямий антиглобуліновий тест;

- гелевий тест.

Визначення антигенів D системи Rhesus моноклональним реагентом анти-D IgM.

Визначення D антигену еритроцитів можливо в будь-яких модифікаціях прямої реакції аглютинації: в пробірках, на площині, в мікроплаті.

Тест в пробірках

Одну краплю (50мкл) 3-5% завису еритроцитів змішують з 2 краплями (100мкл) моноклонального реагенту анти-D IgM. Пробірку струшують до повного перемішання. А потім центрифугують при 1000 обертів на хвилину 20-60 секунд. Допускається попередня (перед центрифугуванням) інкубація при кімнатній температурі або при температурі 37°C протягом 30 хвилин. Обережно струшують осад в пробірці. У разі негативного результату осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію.

Якщо результат позитивний. Осад не розбивається залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

Тест на площині

На пластинку з поверхнею, яка змочується, наносять 2 краплі (100мкл) реагенту анти-D IgM. Поруч поміщують краплю (50мкл) крові, що досліджується, та змішують скляною паличкою з реагентом.

Реакція аглютинації починає розвиватися через 30 секунд при слабкому похитуванні пластинки, чітко виражена аглютинація настає через 60 секунд.. Результати аглютинації підлягають обліку через 5 хвилин. Тому що з еритроцитами, які несуть слабкий D^u антиген, реакція відбувається повільніше.

Тест в мікроплаті

У лунку круглодонної мікроплати вносять 1 краплю (5 мкл) реагенту анти-D IgM та 1 краплю (5 мкл) 2% завису еритроцитів. Що досліджуються, центрифугують при 1000 обертів на хвилину 20-60 секунд, або попередньо інкубують 30 хвилин при температурі від 20°C до 27°C.

Контроль специфічності реагенту

До контролю специфічної реакції аглютинації (незалежно від методики дослідження) до кожної серії еритроцитів, що досліджуються, необхідно включати стандартні D-позитивні та D-негативні еритроцити. При визначенні D-антигену бажано також включати зразки із слабо вираженим D-антигеном.

У випадку негативної реакції з реагентом анти-D IgM у донорів слід перевірити зразок у реакції з використанням анти-D реагентів, що містять IgG антитіла.

Реакція з універсальним реагентом анти-резус (D).

Реакція проводиться з використанням універсального реагенту або моноклонального реагенту анти-D/IgM/IgG. Моноклональні анти-D антитіла належать до імуноглобулінів IgM та IgG, не мають антитіл іншої специфічності і тому можуть бути використані для виявлення D-антигену в еритроцитах будь-якої групи крові.

Хід виконання реакції та облік результатів проводяться за попередньою схемою визначення антигенів D системи Rhesus моноклональним реагентом анти-D IgM.

Реакція конглютинації з 10% розчином желатину

Для проведення цього тесту досліджувані еритроцити інкубують з моноклональними реагентами або стандартною ізоіммунною анти-резус сироваткою з неповними антитілами (IgG), в колоїдному середовищі –

розчині желатину. Необхідною умовою проведення тесту є постановка контроної реакції з розчином желатину без анти-резус реагенту.

Тест в пробірках.

Одну краплю (50мкл) крові або 50% завису еритроцитів змішують з 2 краплями (100мкл) 10% розчину желатину. Розчину желатину попередньо підігрівають в термостаті до розрідження при температурі 46-48°C. Додають 2 краплі (100мкл) моноклонального реагенту або стандартної ізоімунної анти-резус сироватки з неповними антитілами (IgG). Пробірку струшують до повного перемішання. А потім інкубують в водяній бані 10 хвилин при температурі 46-48°C або в термостаті в такому ж температурному режимі 30 хвилин. Після інкубації в пробірку додають 5-8 мл фізіологічного розчину і обережно струшують осад в пробірці. Визначають результат продивляючи пробірку на світло неозброєним оком або крізь лупу.

Якщо результат позитивний, аглютинати розрізняють в вигляді агрегатів різного розміру на тлі прозорої рідини – кров резус-позитивна.

У разі негативного результату в пробірці відсутні агрегати, відмічається гомогенна непрозора суспензія еритроцитів - кров резус-негативна. Результати желатинової проби є достовірними тільки у випадку, коли безпосередньо сам желатин не викликає аглютинацію досліджуваних еритроцитів, а результати контрольних зразків із стандартними еритроцитами співпадають з очікуваними. В контрольних зразках стандартні резус-позитивні еритроцити тотожної з досліджуваними еритроцитами АВО-групи або групи 0 (I), з антирезус-сироваткою повинні дати позитивний результат, а стандарті резус-негативні еритроцити тотожної групи — негативний.

Непряий антиглобуліновий тест (непряма проба Кумбса) за допомогою неповних анти-D антитіл.

Антиглобулінові тести (тести Кумбса). Імуноглобуліни класу G (IgG) до антигенів клітинної поверхні іноді проявляють властивості

моновалентних антитіл. Це обумовлюється неможливістю вищезазначених імуноглобулінів формувати перехресні зв'язки. До такого типу, наприклад, належать IgG до резус-антитіл. Зв'язування моновалентних антитіл з клітинами можна виявити за допомогою антиглобулінового реагенту - сироватки Кумбса, яку готують з крові тварин, попередньо імунізованих протеїнами крові людини. Обов'язковою умовою проведення антиглобулінового тесту є ретельне відмивання сироваткових імуноглобулінів, які не зв'язалися з еритроцитами. Саме ці імуноглобуліни можуть бути причиною хибнопозитивних результатів.

Готують 2-5% завис тричі відмитих в фізіологічному розчині досліджуваних еритроцитів. В чисту промарковану пробірку додають 1 краплю анти-D реагента і 1 краплю 2-5% завису підготовлених еритроцитів. Пробірку струшують до повного перемішання. Суміш інкубують 30-45 хвилин при температурі 37°C. Еритроцити тричі відмивають у фізіологічному розчині. Ретельно вилучають надосадову рідину. В пробірку з еритроцитами додають 1 краплю антиглобулінового реагенту і струшують до повного перемішання. А потім центрифугують при 2000 обертів на хвилину 20-30 секунд. Обережно ресуспендують осад і візуально визначають наявність аглютинації. Облік результатів та постановка контролів проводиться за схемою, наведеною для желатинового тесту.

При відсутності аглютинації кров вважається резус-негативною, при позитивній реакції - резус-позитивною; підгрупи D^u можуть викликати слабку аглютинацію навіть у такому високочутливому тесті, яким є непряма проба Кумбса. Перш ніж віднести досліджувану кров D^u до резус-позитивної, слід підтвердити результат контрольними дослідженнями антиглобулінової сироватки із стандартними резус-негативними еритроцитами.

Гелевий тест

У розділі з визначення груп крові за системою АВО детально представлена інформація щодо використання гелевої діагностичної системи.

Гелева технологія передбачає розділення еритроцитів за допомогою центрифугування в гелі, при цьому неаглютиновані еритроцити (негативний результат) проходять крізь гель та осідають на дні пробірки, в той час як аглютиновані еритроцити (позитивний результат) затримуються на поверхні чи в гелевому шарі

Аглютинація еритроцитів антитілами в ID-карті DiaMed

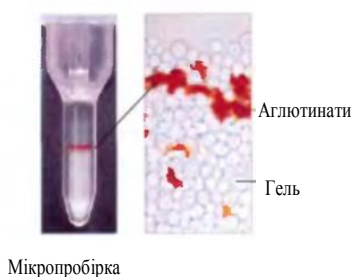


Рисунок 4.4.1 – Визначення резус-фенотипу в гелевому тесті

Пластикова картка для визначення Rh-фенотипу складається з мікропробірки D, яка містить суміш гелю і специфічних антисироваток з моноклональними антитілами анти-D (суміш IgG- та IgM-антитіл людини). Даний моноклональний анти-D реагент виявляє слабкий D в тому числі і варіант D^u. Друга мікропробірка – контрольна, містить суміш гелю з

буферним розчином без антитіл. Кров для дослідження відбирають з використанням антикоагулянтів. Готують 5% суспензію крові у спеціальному розчині ферменту бромеліну. Суспензію інкубують 10 хвилин при кімнатній температурі і додають по 10 мкл в мікропробітки промаркованої пластикової картки. Картку центрифугують і проводять зчитування результатів. При негативному результаті - шар еритроцитів на дні мікропробірки, аглютинація відсутня. Позитивний результат – дрібнозерниста або середньозерниста аглютинація в нижній, верхній частині чи по всій довжині мікропробірки. В контрольній пробірці – реакція завжди негативна.

4.5 Інші системи еритроцитарних антигенів людини

Система еритроцитів LEWIS (LE, ISBT№ 007)

Найбільш тісно пов'язаною з системою еритроцитарних антигенів АВ0(Н) вважається система антигенів Lewis (Льюїс), яка являє собою водорозчинну речовину в плазмі крові, а в деяких випадках фіксується на поверхні еритроцитів, де вперше і була знайдена в 1946-1947 рр. (А.Е.Mourant, e.a. 1977). Антигени системи **LE** синтезуються у тканинах і адсорбуються на еритроцити з плазми крові.

Присутність антигенів на еритроцитах пов'язано з секреторним статусом індивідів. Le^a антиген, експресован на еритроцитах осіб, у яких є присутнім **Le** ген, але є відсутнім **Se**-ген, тому вони не секретують групові речовини АВН у рідині організму. На цей час відомо чотири субтипи антигенів Lewis - Le^a , Le^b , Le^c та Le^x . Речовина Le^a та Le знаходяться в слині дорослих людей відповідно з частотою 90,2% та 79,8%. На практиці зустрічаються 3 фенотипи системи Lewis - Le^a ; Le^b ; Le^{ab} . При цьому треба зауважити, що частота зустрічаємості Le^{ab+} від 42% до 72% залежить від групи крові АВ0(Н). Виділення із слиною антигенів АВН залежить від

наявності тих чи інших антигенів системи Lewis. Практично усі особи з фенотипом Le^{b+} є виділителі речовини АВН і Le^{b+} , а особи Le^{a+} навпаки є невиділителі (R Grubb ,1949). Генетичне наслідування даних речовин кодується геном, який розташований на 19 хромосомі.

Антитіла до антигенів еритроцитів даної системи частіше виявляються у осіб з фенотипом еритроцитів $Le (a-b-)$, тому вони являють собою суміш антитіл двох специфічностей і різної активності. Методологічно антитіла визначаються методом прямої аглютинації при кімнатній температурі. В антиглобуліновому (АГТ) тесті краще реагують при застосуванні реагентів, які вміщують анти комплементарні антитіла.

На відміну від антитіл системи АВО, антитіла до антигенів еритроцитів Le в сироватці реципієнта нейтралізуються Le субстанцією донорської плазми, тому дуже рідко викликає імунологічну реакцію (гемоліз) при трансфузіях.

Система MNSs (ISBT №002)

Антигенна система MNSs виявлена К.Ландштейнером і П.Левіном (1927) за допомогою антитіл, отриманих від імунізації кролика. За біохімічною структурою антигени еритроцитів даної системи являють собою сіалоглікопротеїни і розрізняються між собою за послідовністю амінокислот на термінальній ділянці протеїнів. Система нараховує 43 антигени, які мають різну поширеність в популяції. Наприклад, за фенотипом найчастіше зустрічаються композиції **M+N-** (26 -28%), рідко зустрічаються фенотипи **M-N-; i S-s-;** (<1%). Антигени **Ss** тісно зв'язані з парою антигенів **MN** і не дають незалежної агрегації. Антиген **S** завжди успадковується або з **M**, або з **N** і надає ефект дози. Трансфузійно безпечний, на відміну від антигена **s**, який здатен легко визвати утворення імунних антитіл і стати причиною

посттрансфузійної реакції або ускладнення, а також акушерської патології.

Номенклатура антигенів системи **MNSs**

Антитіла

Природних антитіл проти антигенів системи **MNSs** не виявлено []. Ізоімунні антитіла належать до класу IgM. В певних випадках встановлена належність антитіл до класу IgG, але вони виявляються при температурі, характерній для повних антитіл (кімнатна, або 4⁰C). Дуже рідко ці антитіла (анти-**M** і анти-**N**) є активними при температурі 37⁰C і в таких випадках вони мають клінічне значення. Найбільше клінічне значення мають антитіла анти **S** (представлені класами **IgG** і **IgM** імуноглобулінів) і анти-**s** (представлені класом **IgG**).

Система Kell; ISBT№006

Антигенна система Kell також, як і системи резус та MNSs, незалежна від антигенів системи ABO. Ця система складається із 24 антигенів. Найбільш імуногенний середник KEL1, природних антитіл проти цих антигенів не виявлено. Відкритий антиген K¹ у 1946 році групою вчених на чолі з R.R.A.Coombs і названий за іменем особи, у якої після пологів виявили незвичні антитіла - Kelleher. Частота зустрічаємості серед європеїдів приблизно 10%. Речовина K із слиною не виділяється.

Таблиця 4.5.1 - Номенклатура антигенів системи Kell

ISBT № антигену	Символ антигену	Частота виявлення	ISBT № антигену	Символ антигену	Частота виявлення
KEL1	K (колишній Kell)	9,0	KEL16	k-like	99,8
KEL2	k (Челлано)	99,8	KEL17	Wk ^a Weeks	0,3
KEL3	Kp ^a (Pennery)	2,0	KEL18	Marshall	> 99,9
KEL4	Kp ^b (Rautenberg)	>99,9	KEL19	Sublett	> 99,9
KEL5	Ku (Total Kell)	>99,9	KEL20	Km	> 99,9
KEL6	Js ^a (Sutter)	Білі < 0,1	KEL21	Kps Levay	0,1

KEL7	Js ^b (Matthews)	Білі > 99,9	KEL22	Ikar	> 99,9
KEL10	UI ^a	Фіни 2,6	KEL23	Centauro	< 0,1
KEL11	Cote	> 99,9	KEL24	Cls	< 2,0
KEL12	Bockman	> 99,9	KEL25	VLAN	
KEL13	Sgro	> 99,9	KEL26	TOU	
KEL14	Santini	> 99,9	KEL27	RAS	

Другий антиген цієї системи к (Келлано) виявлений Р.А.Левін, А.М.Вакег у 1949 році зустрічається з частотою 98,8%. За біохімічною природою антигени Келл є глікопротеїнами з молекулярною масою 93 кД, які розташовані на поверхні еритроцитів і молекули яких завдяки дісульфідним зв'язкам забезпечують просторове розміщення антигенів цієї системи.

Еритроцити з фенотипом К⁺к⁺ мають близько 4000 антигенних детермінант антигену К; еритроцити фенотипа К⁺к⁻ мають близько 6000 антигенних детермінант К. Антигени даної системи являють собою трансфузійно і акушерсько небезпечні фактори. Вони ідентифікуються на фетальних еритроцитах вже на ранніх термінах вагітності і можуть бути причиною гемолітичної хвороби немовляти в найбільш важких формах (внутриутробна загибель, як наслідок анемії, обумовленої супресією кровотворення); імуноконфліктні посттрансфузійні реакції (внесудинний гемоліз еритроцитів) відносно анти-К; -к; -Кр^a; -Кр^b; Js^a Js^b антитіл можуть привести до летального завершення. Насьогодні визначений зв'язок між експресією антигенів **Kell** і антигеном **Kx** (система **KX** ISBT№19), а ген, який відповідає за його продукцію розташований на **X** хромосомі. Відсутність **Kx** антигена на еритроцитах може привести до зниження експресії антигенів системи **Kell**, що в свою чергу може призвести до змін морфофункціональних властивостей еритроцитів індивіду. Даний факт асоційований з м'язовою дистрофією, яка притаманна чоловікам (McLeod синдром).

Антитіла

Природних антитіл даної системи не виявлено. Ізоіммунні антитіла анти-К, як правило (95-98%) представлені імуноглобулінами класу G (IgG1) і є результатом сенсibiliзації внаслідок несумісних гемотрансфузій, або імуноконфліктних вагітностей. Але є приклади і наявності антитіл анти-IgM, що з позицій класичної імунології пояснюють широким розповсюдженням в природі мікроорганізмів, які в клітинній стінці мають структури подібні за хімічним складом до К-антигенів людини.

Система LUTYERAN (LU, ISBT№005)

LUTYERAN (Лютеран) антигенна система відкрита в 1946 році, складається з 19 ідентифікованих антигенів і утворена однією парою алельних генів **Lu^a** та **Lu^b**, які не залежать від інших еритроцитарних систем (можливо за виключенням системи **Levis**). Цей зв'язок може бути пояснений близьким розташуванням генів на одній хромосомі. Антигени даної системи локалізовані на хромосомі 19 в локусі q13.2. Частота виявлення генів **Lu^a** та **Lu^b** серед мешканців Англії дорівнює 0,039 і 0,961 відповідно. В інших популяційних групах розповсюдженість антигенів цієї системи досліджена недостатньо.

Таблиця 4.5.2 - Антигени еритроцитів системи Лютеран

ISBT № антигену	Символ Антигену	ISBT № антигену	Символ антигену
LU1	Lu ^a	LU12**	Much
LU2**	Lu ^b	LU13**	Hughes
LU3**	Lu ^{ab}	LU14*	
LU4**		LU16**	

LU5**		LU17**	
LU6**	Jank	LU18	Au ^a (Auberger)
LU7**		LU19	Au ^b
LU8**		LU20**	
LU9*	Mull	LU21**	
LU11**	Singleton		

* - антигени, що рідко зустрічаються, ** - антигени, що часто зустрічаються

Усі антигени слабкі, значних ускладнень при імуноконфліктній вагітності, або сенсibilізації при гемотрансфузійній терапії не відмічалось. Самі трансфузійні реакції пов'язані з зовнішнім судинним гемолізом. *Антитіла* до антигенів даної системи можуть продукуватися без направленої імунізації і належать до класів імуноглобулінів **IgM** і **IgG**.

Антигени системи DUFFY (FY, ISBT №008)

Антигени системи Daffy символ „Fy” (Даффі) були відкриті: Fy^a M.Cutbush, P.L.Mollison (1950); а Fy^b - G.Blumental, E.W.Ikin, A.E.Mougan, H.J Pettenkofer (1950), вони зустрічаються серед європейців з частотою 65% і 83% відповідно. Більшість осіб чорної раси не мають Fy^a і Fy^b антигенів. Представники білої раси дуже рідко мають фенотип еритроцитів Fy(a-b-), який обумовлює толерантність еритроцитів до малярії, яка викликана *Plasmodium Knowlesi* і *P.vivax*. У трансфузійній практиці особливо небезпечним є антиген Fy^a, сенсibilізація до якого може призвести при несумісній гемотрансфузії до тяжких наслідків і навіть смерті. В акушерській практиці реакцій ізосенсibilізації не описано. Антигени системи Daffy не залежать від груп крові АВ0 і статі людини. Хромосомна локалізація антигенів - хромосома 1 локуси q22 – 1q23, обидва антигени розміщені на першій хромосомі поблизу антигенів резус. Ця антигенна система цікава в антропологічному аспекті: у китайців вона зустрічається

найчастіше, а у бразильських індієців зовсім відсутня. Антигени Fy^a , Fy^b є універсальними рецепторами хемокинів, ростових факторів, цитокинів, інтерлейкинів, приймають участь у проведенні сигналів від нейрогормонів і видаляють незадіяних цитокінів з плазми крові.

Таблиця 4.5.3 - Номенклатура системи DUFFY

Антигени системи		Частота виявлення %		Фенотип	Частота виявлення %	
ISBT №	Символ антигену	Біла раса	Чорна раса		Біла раса	Чорна раса
FY1	Fy^a	67	10	$Fy(a^+b^-)$	17	9
FY 2	Fy^b	83	23	$Fy(a^+b^+)$	49	1
FY 3	Fy_3	>99,9	32	$Fy(a^-b^+)$	34	22
FY 4	Fy_4	рідко	98	$Fy(a^-b^-)$		68
FY 5	Fy_5	>99,9	32	У малазійців частота виявлення Fy^a антигену 100 %		
FY 6	Fy_6	>99,9	32			

Відомі тільки *ізоіммунні антитіла* до антигенів даної системи, які представлені субкласом **IgG1**. Деякі з них мають ефект дози, тобто має місце більш виражена серологічна реакція за наявності фенотипу еритроцитів Fy^a/Fy^a , ніж при фенотипі еритроцитів Fy^a/Fy^b . Дуже рідко дані антитіла є прямими аглютинатами. Вони не взаємодіють в ензимних тестах, тому що антигени Fy^a , Fy^b порушуються ферментами і деякі з них мають здатність активації комплементу. Пострансфузійні реакції можуть бути негайного і віддаленого типів, але можуть бути летальними для пацієнта.

Антигени системи KIDD (JK,ISBT№009)

Антигени системи Kidd (Кидд) також, як і антигени Даффі, складаються однією парою алельних генів. Позначаються символами Jk^a та

Jk^b . Представлені фенотипами: Jk^{a+b-} ; Jk^{a+b+} ; Jk^{a-b-} ; наслідування яких відбувається за аутосомальним типом, без домінування. Хромосомна локалізація гену системи Kidd -18q11-q12. Виділення із слиною немає, не залежать від груп крові АВ0(Н) і статі, природних аглютинінів не знайдено. Частота зустрічаємості серед білої раси Jk^a і Jk^b відповідно 77% та 73%. В той же час Jk^+ позитивних осіб серед китайців всього 2,5%; японців - 8-12%; індокитайців - 11%.

Таблиця 4.5.4 - Антигени еритроцитів системи JK

Антигени системи		Частота виявлення %		Фенотип	Частота виявлення %		
ISBT №	Символ антигену	Біла раса	Чорна раса		Біла раса	Чорна раса	
JK1	Jk^a	77	92	$Jk(a^+b^-)$	26,3	51,1	23,2
JK 2	Jk^b	74	49	$Jk(a^+b^+)$	50,3	40,8	50
JK 3	Jk^{ab}	>99,9	>99,9	$Jk(a^+b^+)$	23,4	8,1	26,8
				$Jk(a^-b^-) Jk:-3$	рідко	рідко	рідко

Існують ще декілька сукупних групових антигенів ,які розповсюджені понад 90%, але не мають великого трансфузійного так і акушерського значення Tj (джерей), Vel (вел) і U(y).

Антигени системи Pp (ISBT№003)

Антигени системи Pp виявлені К. Ландштейнером у співпраці з П.Левіном у 1927 році за допомогою антитіл, які утворились в кроликів при імунізації еритроцитами людини. За специфічністю система представлена одним антигеном P_1 . Інші антигени – P, P^k , Luke, які відносили до системи P, за сучасною гноменклатурою віднесені до колекції антигенів Globo. Антиген P зустрічається серед європейців у 70-78% випадків, серед африканців у 95%; частота P_2 складає 30%. Ген антигена P локалізується на 6^й хромосомі, там же де і ген системи HLA; цим фактом можливо і

пояснюється його участь в трансплантаційних реакціях. Антигени системи P мають значення як при трансфузіях так і при вагітностях.

За біохімічною структурою антиген P₁ є сфінголіпидом, як рецептор він пов'язаний з епітелієм нирок і з B19 парвовірусом. Він відіграє певну роль в патогенезі деяких форм пієлонефриту. Антитіла анти-P₁ як правило належать до класу IgM і викликають пряму аглютинацію еритроцитів у сільовому середовищі (повні антитіла) , але в деяких випадках мають і лізуючі властивості. Дуже рідко зустрічаються антитіла IgG, які визначаються спеціальними методами (антитіла Донат-Ландштейнера) і мають значення при пароксизмальній нічній гемоглобінурії. Пострансфузійні реакції можуть бути негайного і віддаленого типу.

Антигени системи DIEGO (D1, ISBT№010)

Перший антиген був відкритий в 1956 році у Венесуелі при імуногенетичному обстеженні родини, до складу якої наряду з білими американцями входили і американські індіанці (індейці). Маркер Di^a, до якого були продуковані специфічні антитіла, був визначений як маркер монголоїдів, який в інших етнічних шрупах зустрічається вкрай рідко. Так, у білих європеїдів (голландців, американців, італійців, поляків, росіян, угорців) антигени даної системи не виявлені. У 1967 році система Дієго визначена як поліморфна система, яка налічує 21 антиген і має три фенотипи: Di(a+b-); Di(a-b+); Di(a+b+). Ген Di локалізований в локусі q21 –q22. Продуктом гену є глікопротеїн BAND, який є носієм антигену Дієго. Антигени даної системи в мембрані еритроцитів здійснюють функцію транспорту аніону HCO₃⁻ всередину клітини в обмін на аніон Cl⁻, що сприяє акумуляції вуглекислоти в еритроцитах і суттєво підвищує транспорт вуглекислоти до легенів.

Антитіла до антигену **D1** –ізоімунні, високої активності, трансфузійно значимі.

Антигени системи YТ (ISBT№011)

Система Картрайт відкрита у 1956 році В.Р.Еатом з співавторами. В системі ідентифіковано два антигена: Yt^a (частота зустрічає мості серед населення Європи 99,7%) і Yt^b (частота зустрічає мості близько 8%). Не описані випадки посттрансфузійних реакцій, що пяснюється великою поширеністю в популяціях. Хромосомна локалізація гена - 7q22. Продуктом гену є ацетилхолінестераза. Насьогодні ще не визначена фізіологічна функція антигенів в еритроцитах, також не визначена і сама щільність сайтів в мембранах. Але згідно структурі антигенів, їх відносять до протеолітичних ферментів. *Антитіла до антигенів системи YТ* можна ідентифікувати лише в непрямому антиглобуліновому тесті.

Антигени системи XG (ISBT№012)

Система антигенів еритроцитів **Xg** представлена двома антигенами Xg^a і **CD99**. Клінічне значення сенсibiliзації до антигенів не вивчено.

Антигени системи SCIANNA (SC; ISBT№013)

Система антигенів представлена чотирма антигенами: Sc1; Sc2; Sc3; Rd, основу яких складає фактор Bu^a , який було вперше ідентифіковано в антиглобуліновому тесті і поширеність якого серед Європейців складає від 0,67 до 0,88%. При направленій імунізації фактором Bu^{a+} донорів з резус негативним фенотипом (ccdee) і з групою крові $A_1B;B^{ua-}$, можуть продукуватись ізоімунні антитіла, які мають низьку серологічну активність.

Клінічне значення специфічних антитіл не вивчено, оскільки вони дуже рідко продукуються. Антигени детерміновані парою алельних генів єдиного локуса з хромосомною локалізацією гена 1 p35-p32. Продукт гену SC є глікопротеїн, функція якого ще не вивчена. Вважається, що глікопротеїнам належить роль стабілізаторам мембрани.

Антигени системи DOMBROCK (DO; ISBT№014)

Система еритроцитів DO була відкрита у 1965-1968 роках, утворена антигенами DO^a(частота зустрічаємості 66%); DO^b(частота зустрічаємості 82%); Gy^a; Hy; Jo^a, серед яких трансфузійно значимими є антигени DO^a і DO^b, оскільки вони є достатньо імуногенними. Хромосомна локалізація гену DO – 12p13.2 - p12.1, продуктом гену є глікопротеїн, який за припущенням, має функцію забезпечення структури мембрани еритроцитів. Антиген Do^a спадкується за домінантним типом, аутосомально і генетично не пов'язаний з жодною відомою еритроцитарною системою.

Антигени системи COLTON (CO; ISBT№015)

Система еритроцитів CO відкрита у 1967 році, і вміщує три антигена: Co^a, Co^b, і Co3. Антиген Co^a зустрічається у 99,7% осіб. Антиген Co^b – від 6 до 11%. Усі антигени досить імуногенні і можуть викликати посттрансфузійні реакції. Антитіла анти- Co^a анамнестично пов'язані з гемотрансфузіями, або з імуноконфліктними вагітностями. Самі антитіла за формою є неповними (IgG) і активні тільки в антиглобуліновому тесті. Ген Системи Колтон локалізований на 7-й хромосомі в локусі p14, продуктом гену є поліпептид аквапорін –AQP1, який забезпечує транспорт води до еритроциту.

Антигени системи LANDSTEINER-WIENER (LW; ISBT№016)

Система утворена трьома антигенами: $Lw^a; Lw^{ab}; LW^b$, які не мають достатньої імуногенності для розвитку посттрансфузійних реакцій.

Антигени системи CHIDO-RODGERS (CH/RG; ISBT№017)

Система **CH** вміщує сім антигенів: **Ch1; Ch2; Ch3; Ch4; Ch5; Ch6; WH**. Антигени даної системи в класичному сенсі не є антигенами крові, бо являють собою субстанцію, яка адсорбована на поверхні еритроцитів з плазми. Ген системи Чідо має хромосомну локалізацію бр21.3, антигени мають близьке розміщення і знаходяться всередині локуса HLA на 6-хромосомі. Сама плазматична субстанція являє собою компонент системи C4a комплементу. Обидва антигени тісно зчеплені між собою і проявляються гаплотипово в комплексі. Характерним є суттєво підвищений вміст і щільність антигенних детермінант комплексу Чідо-Роджерс на еритроцитах хворих на аутоімунну гемолітичну анемію, що призводить до прискореного гемолізу і клінічної маніфестації захворювання. *Антитіла* не є трансфузійно значимі.

Антигени системи Hh (H; ISBT№018)

Система представлена одним антигеном – **H**. Антитіла продукуються в організмі за умов, що у індивіду даний антиген відсутній (Бомбей, деякі індивіди, носії A і B). Анти-H антитіла, як правило, представлені **IgM**, іноді **IgG**. Клінічне значення не вивчено.

Антигени системи Kx (XK; ISBT№019)

Система представлена одним антигеном **Kx**. *Антитіла* до антигену даної специфічності продукуються дуже рідко зокрема у осіб з синдромом McLeod, у яких даний антиген відсутній.

Антигени системи GEBRIGH (GE; ISBT№020)

Система відкрита у 1960 році і представлена 7 антигенами: **G2; G3; G4; Wb; Ls^a; An^a; Dh^a**. Антигени даної системи присутні практично у всіх осіб незалежно від популяції і тому не можуть мати трансфузійного значення. Хромосомна локалізація гену системи Гербих визначена як 2q14-q21. Продуктом гену є глікофоріни C і D, які відносяться до мембранних білків з високим ступенем глікозилування екстраклітинних доменів. Саме глікофоріни несуть велику кількість сіалових кислот, завдяки чому поверхня еритроциту приймає негативний заряд і відбувається електростатичне відштовхування клітин для запобігання спонтанної агрегації еритроцитів.

Антигени системи CROMER (CROM; ISBT№021)

Система еритроцитарних антигенів представлена 11 антигенами:

Cr^a; Tc^a; Tc^b; Tc^e; Dr^a; Es^a; IFC; WES^a; WES^b; UMC; GUT1 і кодується геном з хромосомною локалізацією 1 q32. Антигени даної системи несуть полі пептид DAF(decelerating factor). Даний білок перериває асоціацію компонентів C4b і C3b компонентів комплементу, після чого антиген CD59 пов'язує кінцеві компоненти C8 і C9, тим самим блокує мембраноатакуючий комплекс. Цей механізм є захисним від внутрішнесудинного гемолізу, а глікопротеїни DAF і CD59 захищають еритроцити від гемолізу особистим комплементом.

Антитіла до цих антигенів продукуються дуже рідко. Клінічне значення їх не вивчено.

Антигени системи KNOPS (KN; ISBT№022)

Система Кнопс є складною поліморфною системою, в системі визначено вісім антигенів: **Kn^a; Kn^b; McC^a; SI1; Yk^a; McC^b; SI2; SI3**, які є дуже поширеними в популяціях – від 98% антиген Кост (Cs^a) до 100% антигенів Kn^a і Kn^b.

ген Кнопс (Kp^a). **Хромосомна локалізація гену системи -1 q32.** Продукт гену є глікопротеїд, який має функцію зв'язування C3b/C4b компонентів комплементу шляхом приєднання до рецептора CR1 на мембрані еритроцита. Сумісною дією антигенів Кромер і білка DAF, антигени Кнопс захищають еритроцити від руйнування особистим комплементом. Вважається, що *антитіла* до даних антигенів не мають клінічного значення.

Антигени системи INDIAN (IN; ISBT№023)

Система відкрита у 1973 -1975 роках, представлена двома антигенами In^a (низька поширеність) і In^b (висока поширеність). В обох випадках антитіла продукуються рідко, в літературі описаний єдиний випадок посттрансфузійної реакції. Самі антигени ідентифікуються лише за умови обробки еритроцитів ферментами. Хромосомна локалізація гену 1N – 11 q13, який асоційований з білком CD44 і являю собою рецептор гіалуронової кислоти. Функцією даного глікопротеїду є прикріплення ждо міжклітинного матріксу. Глікопротеїд CD44 презентує антиген системи **INDIAN**, сам експресується в некроветворних тканинах, де приймає участь в міжклітинних взаємодіях шляхом зв'язування клітин з зовнішньклітинним матриксом. Глікопротеїн CD44 експресований не тільки на еритроцитах але і на лейкоцитах і лімфоцитах. Він є медіатором хомінга для цих клітин через зв'язки з гіалуронатами. Рецептор CD44R обмежений білком CD44. Він має молекулярну масу 130, 160, 190 kD і є негемопоетичною ізоформою екзону V9 домену, яка фізіологічно має функцію епітеліальної диференцировки (дані HLDA Workshop,Nov.,1996). Цей же рецептор є рецептором для мікроорганізмів *Haemophilus influenzae*, який викликає у людини захворювання органів дихання – мікроорганізми переносяться еритроцитами до органів ми шенів і використовують для свого росту фактори крові X (гемін, який активує пороксидазу, чим і стимулює фукції бактерій) і V

(NADH є основною частиною вітаміну В, який приймає участь у окисно-відновлювальній реакціях в клітині). При Іп-негативному фенотипі його функції приймають на себе інші епітопи, які саме до цього часу не визначено.

Антигени системи Ok (OK; ISBT№024)

Система має один антиген **Ok^a**, високої частоти зустрічальності.

В літературі представлені дані відносно сенсibiliзації і посттрансфузійної реакції до даного антигену в двох випадках (жителі Японії).

Антигени системи RAPH (RAPH; ISBT№025)

Система представлена одним антигеном **MER2**. Відносно клінічного значення даних немає.

Антигени системи JMН (ISBT№026)

Система представлена одним антигеном **JMН** високої частоти зустрічальності. Антитіла не викликають трансфузійних реакцій.

Антигени системи I (ISBT№027)

Система **I** представлена одним антигеном **I**, який має високу імуногенність. Антитіла продукуються у індивідів з фенотипом еритроцитів **I-i+**. Частіше антитіла продукуються як ауто антитіла у хворих на макроглобулінемію Вальденстрема, які мають синдром холодової аглютинації.

Антигени системи GLOB (ISBT№028)

Система представлена одним антигеном **P**. Антитіла є ізоіммунними і можуть викликати посттрансфузійні реакції.

Антигени системи GIL (ISBT№029)

Система представлена одним антигеном **GIL**. Клінічне значення не з'ясовано.

Заключення.

Підсумовуючи представлені в даному розділі дані відносно структури, функції, поліморфізму антигенів різних еритроцитарних систем і особливостей специфічного антитілогенезу ми можемо зазначити велике значення цих систем для еволюційного розвитку різних популяцій і людства взагалі в аспекті формування толерантності і адаптації до оточуючого середовища. Фізіологічна функція цих систем не обмежується тканинною індивідуальністю біологічної системи, бо визначено їх великий внесок в метаболічні процеси клітин крові на рівні геномної організації.

Доказано також, що антигенні системи еритроцитів можуть бути маркерами схильності до розвитку низки захворювань: ішемічної хвороби серця, інфарктів міокарду, артеріальної гіпертензії, пороків мітрального та аортального клапану, ревматизму, ревматоїдний артрит, гематогенний остеомієліт, судинні захворювання кінцівок, гемофілія, а також деякі злоякісні пухлини та інше .

Відмічались стійкі асоціативні зв'язки груп крові системи АВ0(Н) і інших систем, таких як Levis, MNSs та гаптоглобінів з ураженням окремих органів і систем, а саме бронхолегеневої, статево-сечової, шлунковокишкової, враження шкіри, захворювання щитоподібної залози, психічні хвороби та інше. Взаємозв'язок еритроцитарних антигенів з інтенсивністю антитілопродукції виявлено на матеріалі донорів, імунізованих стафілококовим анатоксином . Схильність осіб з групою крові А (II) до більш активної антитілопродукції анти- α -стафілолізінів знаходить своє пояснення в парціальній подібності речовини А і антигенів стафілококу. Анти-А антитіла (α -ізогемаглютиніни), поєднуючись із

комплементарними до них антигенами стафілококу, почасти блокують продукцію антистафілококових антитіл, зменшуючи антигенний стимул в організмі осіб, у яких присутні α -ізогемаглютиніни, тобто у індивідів з групами крові 0 (I) і B (III). В той же час особи з A (II) та AB (IV) групами продукують антитіла без зазначених обмежень, чим і пояснюється наявність у них антистафілококових антитіл у більш високій концентрації. Висока активність і специфічність антитіл, отриманих при направленій імунізації донорів є підґрунтям для отримання специфічних імуноглобулінів для використання в медичній практиці, оскільки саме ці препарати крові є біологічними лікувальними засобами на відміну від високотоксичних хімічних препаратів.

Таким чином, на сьогодні не викликає сумніву, що антигенний поліморфізм генетичних систем еритроцитів має важливу фізіологічну функцію – еволюційно забезпечує стабільність імунного гомеостазу людини в оточуючому середовищі. Інтенсивність антигензалежного антитілогенезу, авидність продукованих антитіл, ступінь ізосенсибілізації організму інтегрально відображають стан імунного гомеостазу при дії антигенно чужерідними агентами. Тобто імуногенетичні аспекти поліморфізму генетичних систем крові дають можливість зрозуміти ізосерологічні підходи до характеристики антигензалежних антитіл з позицій загальної імунології.

Питання для самоконтролю.

1. На якому принципі ґрунтуються методи визначення груп крові в системі Rh(D)?
2. Які відомі фенотипи еритроцитів в системі Rh(D)?
3. Що необхідно враховувати при оцінці результатів?
4. Як визначити фенотипи еритроцитів в інших системах груп крові?
5. Як проводять вибір методики та еритроцитів потрібного типу?

Використана література.

1. Переливание крови (история, биологические аспекты, факторы совместимости) / П.М. Перехрестенко, Л.И. Исакова, Г.М. Дизик и др. – К.: Здоров'я, 2008. – 224 с.
2. Жибурт Е.Б., Попова В.И., Иванова И.В., Рейзман П.В. Скрининг антиэритроцитарных антител и другие практические вопросы иммуносерологии // Трансфузиология.-2004.-№4.- С.72-80
3. Минеева Н.В. Иммунологические посттрансфузионные осложнения // Трансфузиология.-2001.-№2.-С.40-51
4. Минеева Н.В. Механизмы развития гемолитических трансфузионных осложнений // Трансфузиология.-2002.-№1.-С.25-39
5. Скудицкий А.Е. Некоторые особенности гелевых диагностических систем в иммуногематологии // Трансфузиология.-2005.-№2.-С.80-83
6. Фатихова Р.Б., Скудицкий А.Е. Гемолитическое осложнение, обусловленное анти-Фуа и анти-Јка антителами // Трансфузиология.-2004.-№3.-С.83-88

РОЗДІЛ V

Антигенний поліморфізм сироваткових систем крові

5.1 Генетичний поліморфізм сироваткових білків людини відповідно антигенному поліморфізму еритроцитарних систем крові обумовлений множинністю алельних генів, а також особливістю білків, ліпопротеїдів і ізоферментів сироватки або плазми. Сироваткові системи передаються спадково і, в основному, не пов'язані з іншими ізосерологічними системами, не пов'язані між собою, не залежать від віку і статі людини, тобто мають ознаки генетичних систем крові.

До сироваткових систем крові відносять: гаптоглобін (Hr), імуноглобулін (алотипи Gm Inv), Gc-компонент, трансферин Tf, ліпопротеїди (Ag, Lp, Ld), преальбумін, альбумін, швидкі і повільні постальбуміни, ферменти(холінестерази, фосфатази і інші.). В даному розділі ми розглянемо структури, які найбільш задіяні в імунофізіологічних процесах організму людини з позицій поліморфізму, структури, функції і фізіологічної ролі.

Система гаптоглобінів.

Гаптоглобін (Hr) (синонім серомукоїда²) – є глікопротеїном плазми крові, тобто являє собою сполучення білку (83%) і вуглеводів(17%) яке має здатність специфічно зв'язувати гемоглобін. **Hr** синтезується у печінці і складає від 1,2 до 1,4% загального протеїну крові. В гаптоглобінах вміщується близько 5% ацетилнейрамінової кислоти. Визначено три спадкових фенотипи гаптоглобіну: **Hr 1-1, Hr 2-1, Hr 2-2**. Всі три фенотипові форми являють собою мономери з вельми варіабельною молекулярною масою - гаптоглобін типу **Hr1** має молекулярну масу 85 000, за електрофоретичним посуванням утворює швидко мігруючу зону і принадний особам з фенотипом **Hr 1-1**. Гаптоглобін типу **Hr2** має молекулярну масу 169 000, являє собою більш повільно мігруючий

компонент і приналежить особам з фенотипом **Hr 2-2**. Особи з фенотипом **Hr 2-1** мають білкову фракцію, яка вміщує обидва компоненти і за електрофоретичною рухомістю посідає середнє місце. Успадкування даного білку відбувається за кодомінантним типом. Генотип **Hr¹ Hr¹** визначає фенотип **Hr 1-1**; генотип **Hr² Hr²** - фенотип **Hr 2-2**; генотип **Hr¹ Hr²** – фенотип **Hr 2-1**. Незмінність типів гаптоглобіну впродовж індивідуального життя людини склало основу використання даної системи в судово-медичній практиці. У новонароджених гаптоглобін не визначається і конкретний фенотип визначається тільки після шести місяців після народження. Гаптоглобін має певне значення для антропологічних досліджень, оскільки за фенотипами має відмінну поширеність у різних етнічних групах, але, в цілому, для панміктичної популяції переважним є фенотип **Hr 2-1**, що пов'язано з еволюційно селективним відбором індивідів придатних для життєдіяльності в даному екологічному середовищі. В різних етнічних популяціях за фенотипами гаптоглобін має різну частоту стрічання. Так, наприклад, у жителів Індії тип **Hr 1-1** зустрічається в 1,8%, у жителів Нігерії – у 53,6%. Тип **Hr 2-2** у населення Індії зустрічається в 81,7%, а у жителів Нігерії порівнянно рідко – в 2-7%. Успадкування антигенної специфічності відбувається за кодомінантним типом, відповідно законам успадкування інших генетичних систем крові.

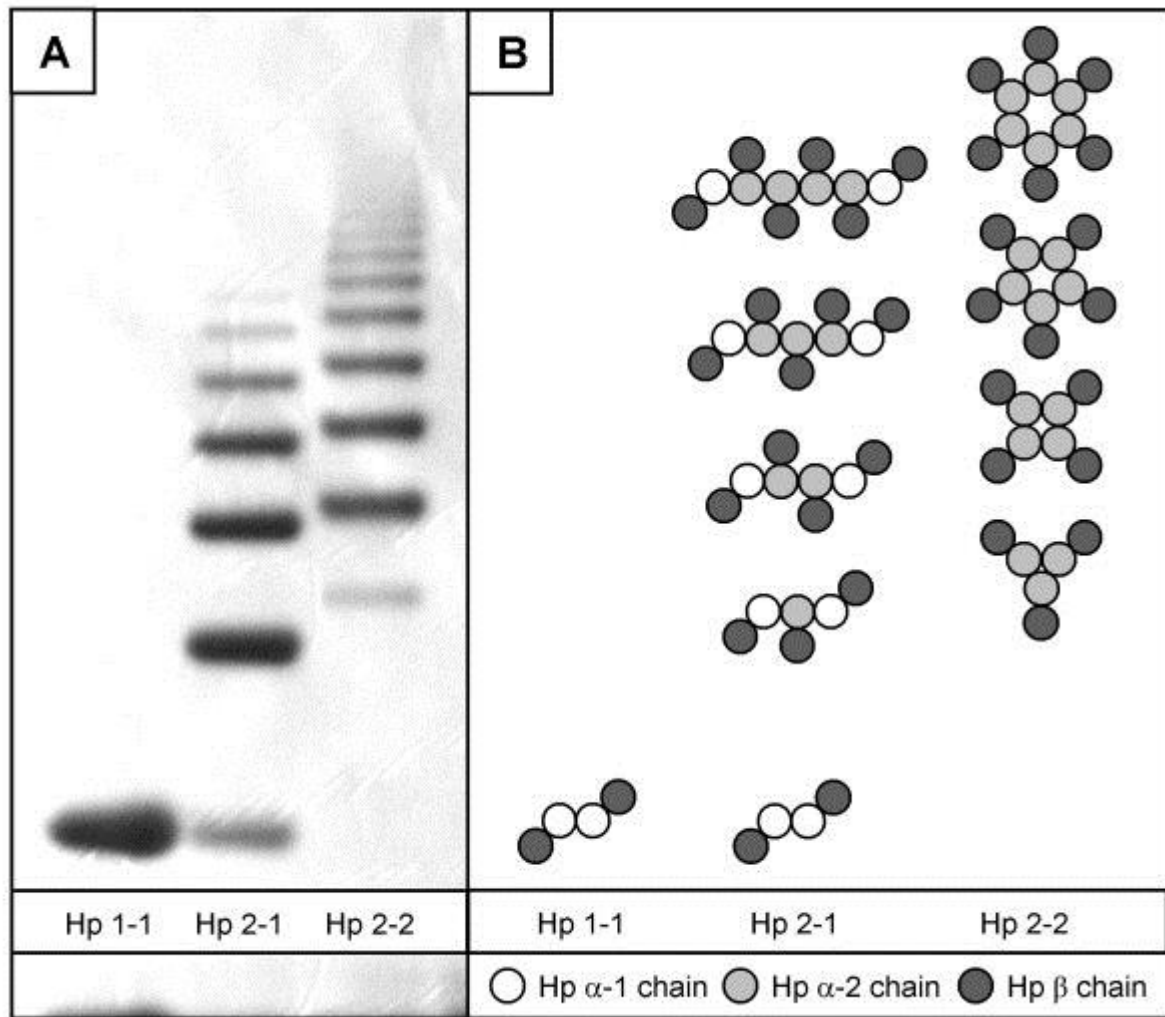


Рисунок 5.1.1 - Оцінка фенотипу гаптоглобіну методом електрофорезу. А: генетично детерміновані варіанти гаптоглобіну - Hp 1-1, Hp 2-1, та Hp 2-2 в 3 – 8% градієнтному поліакриламідному гелі. В: Схема будови трьох фенотипів гаптоглобіну Hp 1-1, Hp 2-1, и Hp 2-2 (Gast J., 2008).

Сімейним аналізом встановлено, що діти не можуть мати такий тип гаптоглобіну, який був відсутній у їх батьків. Гени даної системи розміщені на короткому плечі хромосоми 5 і частково – на дистальній половині довгого плеча і на дистальному кінці хромосоми 18. З позицій фізіологічної функції, одним із найважливіших властивостей Hp є здібність зв'язувати гемоглобін в плазмі з утворюванням комплексу **Hp-Hb**. Відомо, що при фізіологічній загибелі еритроцитів частина звільненого гемоглобіну розчинюється в плазмі крові в кількості 0,01-0,03 г/л. Комплекс з гаптоглобіном попереджає загублення гемоглобіну з організму, тому що

комплекс Нр-Нв є важкодисперсним і не може пройти скрізь ниркові клубочки. Гемоглобінурія з'являється у випадках, коли рівень гемоглобіну в плазмі перевищує здібність гаптоглобіну поєднуватись з гемоглобіном. Це спостерігається при гемотрансфузійних ускладненнях у випадку коли має місце гострий лізис еритроцитів. Гострий лізис навіть до 1% циркулюючих еритроцитів вже супроводжується гемоглобінурією. При фізіологічних умовах комплекс Нр-Нв попадає в тканини системи мононуклеарних фагоцитів, де весь комплекс порушується. При цьому з Нв звільнюється молекулярне залізо, яке в кров'яному руслі пов'язується з трансферином і транспортується до місця утворення еритроцитів - кісткового мозку. Таким чином, Нр приймає участь в проміжному обміні заліза, яке входить в склад гемоглобіну, і має здатність утримувати його в організмі людини. Крім того, комплекс Нр-Нв має високу пероксидазну активність, тим самим здійснює уповільнення процесів перекисного окислення ліпідів. Гаптоглобін відноситься до білків гострої фази. Підвищення його рівню у крові відбувається внаслідок стимуляції інтерлейкінами клітин печінки. Треба зазначити, що зміни рівню гаптоглобіну в крові мають не настільки закономірний характер, як інші білки гострої фази. Це обумовлено тим, що при наявності гемолізу *in vivo*, що доволі часто супроводжує гострофазові процеси, гаптоглобін селективно зв'язується з вільним гемоглобіном плазми, що призводить до зниження його рівню в крові. Саме тому сумарним результатом може бути підвищення, зниження або зберігання нормального рівню білку.

Підвищення рівню гаптоглобіну в крові, як правило, спостерігається при: гострих запальних процесах, пухлинах, нефротичному синдромі, ревмокардитах, інфарктах міокарду, колагенозах, поліартритах, лімфогранулематозі, або при лікуванні кортикостероїдами.

Зниження рівню гаптоглобіну має місце при усіх видах гемолізу *in vivo* – аутоімунному, ізоімунному, механічному (штучні серцеві клапани, бактеріальний ендокардит, травми); при гострих і хронічних захворюваннях печінки; також може відбуватись при неефективному еритропоезі (дефіцит фолієвої кислоти, гемоглобінопатії); дефектах мембрани еритроцитів або метаболізму (дефіцит глюкозо-6-фосфатдегідрогенази). Достатньо велика кількість дослідницьких робіт присвячена вивченню асоціацій захворювань з певним типом гаптоглобіну. Так, встановлено, що для хворих на гострі і хронічні лімфобластні лейкемії в порівнянні зі здоровими особами і опозитною групою хворих на мієлоїдні лейкемії характерним є носійство фенотипу Нр 1-1 і мало поширеним є фенотип Нр 2-2.() Ризик захворіти даною нозологічною формою лейкемії за даними цих авторів у три рази вищий ніж для носіїв іншого фенотипу.

Групоспецифічний компонент Gc

Застосування методу імуноелектрофорезу дозволило виділити за електрофоретичною рухомістю серед α_2 глобулінів білки, які відрізнялися від гаптоглобінів. Ці білки були названі Gc (групоспецифічний-компонент) і виділені в окрему генетично детерміновану систему. Було визначено, що існує два Gc компонента, які відрізняються за електрофоретичною рухомістю: компонент Gc1 відноситься до швидко мігруючої фракції в гелі, клімпонент Gc2 – до повільно мігруючої фракції. Ці компоненти можуть бути присутніми окремо або разом і в залежності від того розрізняють три фенотипи даних білків: Gc1-1; Gc2-2; Gc2-1. Кожній людині притаманна лише одна з трьох композицій специфічностей. Gc складається з 96% білку, 2% гексози, 2% гексоза міну; при нагріванні до 56⁰C специфічна активність білку втрачається.

Системи Gm і Inv

Ізоантигени систем Gm і Inv визначають специфіку імуноглобулінів сироватки крові. Антитіла кожної людини поза їх специфічної направленості і від різниці в їх активних групах мають загальну біохімічну структуру молекул гамма-глобулінів. Формування цих структур – антигенних детермінант – визначається генетичними особливостями імунокомпетентних клітин, які синтезують імуноглобуліни. Антигенні детермінанти системи Gm локалізовані в молекулах важких ланцюгів імуноглобуліну класу G, а антигенні детермінанти системи Inv локалізовані в легких ланцюгах молекул імуноглобулінів усіх класів: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE.

Ізоантигени системи Gm. Відкриття даних антигенів (Grabb 1956) базувалося на відомій вже на той час здібності резус-позитивних еритроцитів, які були сенсibilізовані неповними анти-резус антитілами, аглютинувати в присутності нормальної сироватки або плазми крові людини. Було встановлено, що при додаванні в реакцію замість нормальної сироватки сироватку хворих на ревмоартрит, реакція аглютинації значно підсилюється, тому що ці сироватки ведуть себе подібно гетерогенним анти-імуноглобуліновим сироваткам, які використовують в непрямій пробі Кумбса - вони також поєднуються з γ -глобулінами неповних антитіл- анти-резус, які фіксовані на поверхні еритроцитів і сприяють їх аглютинації.

Далі було встановлено, таке підсилення реакції може втрачатися при додаванні в реакцію нормальної сироватки людини. Було зроблено висновок, що в одних осіб сироватка крові має речовини, які здатні інгібувати або затримувати реакцію аглютинації, а у інших осіб такі речовини відсутні. На основі цього нормальні сироватки крові людини були класифіковані як ті що **вміщують інгібітори** і ті, що **не вміщують інгібітори**. Даний інгібітор був позначений як **Gm**. Особи які мають цей інгібітор були віднесені до **Gm(a+)** а особи, які не мали цей компонент – до групи **Gm(a-)**. Наявність

або відсутність антигену Gm не залежить від інших генетичних систем крові, не залежить від статі і віку. В подальшому був виявлений певний поліморфізм антигенів даної системи, які відрізнялися за специфічністю: **Gm(r), Gm(D), Gm(e), Gm(P), Gm(f), Gm(c), Gm(S), Gm(t)**. Для даної системи встановлено існування нормальних та ізоімуних антитіл. Нормальні антитіла частіше визначаються у дітей. Ізоімуні антитіла виявляються при антигенній стимуляції і при вакцинації осіб, а також внаслідок гемотрансфузій. Антитіла до факторів **Gm** подібні груповим ізогемаглютинінам α і β за фізико-хімічними властивостями і мають константу седиментації 19S.

Ізоантигени системи Inv.

Ізоантигени системи **Inv** були відкриті у 1960 році при дослідженні антитіл, які викликали аглютинацію еритроцитів сенсibiliзованих неповними антитілами анти-резус. Новий антиген був позначений як **Inv –In фактор-інгібітор**, **v-** перша буква прізвища людини, у якої були визначені антитіла анти- **Inv**. Сироватка анти-**Inv** відрізнялася від сироваток анти-**Gm** тим, що вона відкривала нову антигенну детермінанту, яка локалізована в легких ланцюгах імуноглобулінів, тобто антиген даної системи не є ідентичним антигенам системи **Gm**, які також визначаються в імуноглобулінах. Ідентифіковані наступні фенотипи антигенів системи **Inv**: **Inv(1+a-b-), Inv(1+a+b-), Inv(1+a-b+), Inv(1+a-b+), Inv(1-a+b-) Inv(1-a-b+), Inv(1- a- b-)**. Поширеність антигенів даної системи серед різних народів неоднакова. Наприклад, у європейців частота зустрічаємості антигену **Inv(a+)** в два рази нижче ніж у японців, китайців і африканців. У європейській популяції (чехи, поляки, шведи, німці) даний антиген визначався в діапазоні 8,8 – 15,5% випадків. У японців і китайців частота зустрічає мості **Inv(a+)** складає 47,5 – 55,82%.

Система трансферину.

Трансфери Tf (синоніми-сидерофілін, металосеромукоїд) є білком плазми крові (глікопротеїн), відноситься до β_1 -глобулінів з електрофоретичною рухомістю RT-1,0 і має здатність сполучатись із залізом, утворюючи зворотні комплекси. Сам комплекс трансферин/залізо має померанчевий колір. В цьому комплексі залізо знаходиться в трьохвалентній формі. Концентрація трансферину в сироватці крові складає близько 200–400 мг% (23–45 мкмоль/л). В нормі, тільки $\frac{1}{3}$ трансферину є насиченою залізом. Трансферин виконує важливу фізіологічну функцію – переводить залізо плазми в дийонізовану форму і доставляє його в кістковий мозок, де воно може використовуватись знову. Не менш важлива фізіологічна функція трансферину заснована на здібності подавляти розмноження вірусів в організмі людини. Синтез трансферину здійснюється в печинці і залежить від її функціонального стану, від потреби в залізі і резервів заліза в організмі. При зниженні концентрації заліза синтез трансферину зростає. Трансферин приймає участь у транспортуванні заліза від місця його всмоктування (тонка кишка) до основних місць його використання або зберігання (кістковий мозок, печінка, селезінка). Він запобігає накопиченню токсичних іонів заліза в крові. При руйнуванні еритроцитів в селезінці, печинці і кістковому мозку трансферин транспортує визволене з гему залізо в кістковий мозок, де частина заліза депонується, вмикаючись до складу феритину і гемосидерину. Одна молекула трансферину зв'язує два іона трьохвалентного заліза, а 1 г трансферину – близько 1,25 мг залізу. В нормі відсоток насичення трансферину залізом складає близько 30%. Надмір заліза, який супроводжується значним підвищенням відсотку насичення трансферину залізом, може стати причиною патології печінки та селезінки.

В 1957 році Smithies відкрив поліморфізм трансферинів. В ці ж роки було відкрито три основних різновиди трансферину. Трансферин С –

зустрічається майже в усіх популяціях, але за поширеністю значно відрізняється. Наприклад, у поляків фенотип СС зустрічається у 96,83%; у білих американців -2,0% . У австралійців і африканців зустрічається трансферин D, а у канадців був визначено носійство трансферину В. Насьогодні встановлено 19 типів трансферинів, які відрізняються один від одного за величиною заряду білкової молекули, її амінокислотному складу і числу молекул сіалових кислот, зв'язаних з білком. Оскільки за фенотиповою характеристикою різні трансферини у різних народів розрізняються за поширеністю, цей факт використовується в антропології для рішення питань походження конкретних народів. Сукупність і взаємодія алельних варіантів трансферину, також як і в інших поліморфних генетичних системах виграють вирішальну роль в формуванні генотипу в конкретних умовах середовища.

В медичній практиці визначення рівню трансферина має значення при діагностиці залізодефіцитних анемії. Вміст трансферину у жінок на 10% вищий, ніж у чоловіків. Концентрація даного білка знижується з віком. При запаленнях трансферин виявляється як негативний білок гострої фази.

Система альбумінів

Альбумін є протеїном, який кількісно представлений найбільше в порівнянні з іншими фракціями крові –до 50%. Електрофоретично цей білок є найбільш рухомим. На електрофереграмі за електрофоретичною рухомістю ідентифікують : пре альбуміни (Rt 2,47), альбуміни (Rt 1,85) і постальбуміни (Rt 1,86-1,09). **Система альбумінів є поліморфною і фенотипові ознаки спадкуються за кодомінантним типом як і інші генетичні системи крові людини.** Пре альбуміни мають п'ять фенотипів, специфічність яких обумовлена трьома домінантними генми: Pr^F, Pr^M, Pr^S . Серед альбумінів спостерігається достатньо високий поліморфізм. Альбуміни специфічності A1^s A1^t як і інші є генетично детермінованими і

спадкуються як домінуючі алелі. В зоні пост альбумінів визначені два основних компоненти Pa^1 Pa^2 композиції яких складають три фенотипи: Pa 1-1; Pa 2-1 і Pa 2-2. В панмікційній популяції переважно зустрічається фенотип Pa 2-1.

Альбумін синтезується в печинці в кількості 10 - 35g на добу у дорослої людини. Організм людини вміщує 310 - 330 g альбуміна, з якого 110 – 130 знаходиться внутрішньосудинно і 200 g – зовнішньосудинно. За добу 10 – 12 g альбуміну піддається катаболізму, причому значна його частина розпадається у шлунково-кишковому тракті. Утворені амінокислоти разом з амінокислотами їжі, переходять через стінки кишечника, поступають до печинці і використовуються для синтезу нового альбуміну. За 24 години альбумін із судин проходить через стінки кишечника двічі і таким чином відбувається безперервний зв'язок між двома депо. Альбумін проявляє сильний афінитет до іонів, зокрема до аніонів. Його молекула дуже легко піддається зворотнім конформаційним змінам, що обумовлено його фізіологічною функцією. Він транспортує необхідні для організму іони до місця їх використання, або шкідливі речовини – до місця їх елімінації. Як, наприклад, білірубін, гормони, лікарські препарати. Альбумін слугує акцептором жирних кислот при обміні жирів і, таким чином, значно знижує концентрацію вільних жирних кислот у плазмі крові (порядку 10000 разів). Особливо важлива роль альбуміну як регулятора об'єма плазми і рівноваги тканинних рідин. Приблизно на 75% загальне колоїдно-осмотичний тиск плазми регулює альбуміном. Окрім того, даний білок виконує роль депо для білків і є джерелом амінокислот.

Сироваткові системи ліпопротеїдів (Ag, Lp, Ld)

Всі системи є поліморфними, спадкуються за кодомінантним типом.

Система Ag була ідентифікована як преципітин β -ліпопротеїду низької щільності у осіб, які перенесли багато гемотрансфузій. За специфічністю

визначають насупні антигени: $Ag^a Ag^x Ag^b Ag^y$. Наявність природних антитіл у людини не спостерігається, але можуть продукувати сь при імуноконфліктних вагітностях. Фенотипові сполучення ліпопротеїдів даної системи поширені неоднаково в різних популяціях. Наприклад: група Ag (x-y+) в популяції шведів зустрічається в 64,2%, а у японців – тільки в 7,5%. **Система Lp** складається з антигенів специфічності $Lp^a Lp^x$, які відрізняються не тільки за серологічним фенотипом, але і за термостабільністю. До цієї ж системи відносять „австралійський антиген”, який має два фенотипи $Ld(a+)$, $Ld(a-)$. Дану систему в часи, коли ще не були розроблені молекулярно-генетичні підходи ідентифікації людини за генотипом, часто використовували в судовій медицині для встановлення батьківства.

5.2 Групи ізоферментів.

Відкриття ізоферментів відносять до однієї з найважливіших подій в біохімії, генетиці і імунології. Воно дозволило вирішувати кардинально проблеми в галузі ензимології, імуногенетики і еволюційної біології. Відомо, що у людини існує кілька форм ферментів, які чинять однакову каталітичну дію. Вони розрізняються за фізико-хімічними властивостями: рухомістю в електричному полі, оптимумом рН, відношенням до інгібіторів, і термічній дії, адсорбційними властивостями, здібністю утворювати комплекси з аналогами коферментів, а також імуноспецифічністю. (Петрунь). **За біохімічною номенклатурою термін „множинні форми ферменту” використовують для об означення усіх ферментів, які здійснюють однакову дію і притаманні певному виду. Термін „ізофермент” використовують як робочий варіант для ферментів з однаковими каталітичними властивостями, але з різною електрофоретичною рухомістю.** Існування ізоферментів найчастіше обумовлено існуванням гетеро полімерів із двох або трьох одиниць. Синтез окремих поліпептидів

закодований в окремих генах (один ген – один поліпептидний ланцюг). Якщо фермент складається із різних поліпептидів, то для кінцевої його структури потребується більш одного гена. Так, з двох видів субодиниць утворені ЛФ, КК, АДГ, ЛДГ. **По суті причиною такої множинності може бути: генетично незалежні білки (МДГ з мітохондрій і цитоплазми – АсТ); гетерополімери з двох або більше поліпептидних ланцюгів (ЛДГ, КК, АДГ); генетичні варіанти (ГБФ, АДА еритроцитів); білки, які поєднані з іншими групами (фосфорилаза а і б та глікогенсинтетаза); білки, які походять з одного поліпептидного ланцюга (родина хімотрипсинів); конформаційно різні форми (дезокситімідіназа).**

Для певних ізоферментів отримані незаперечні докази різного амінокислотного складу їх субодиниць. В деяких випадках визначається більша кількість ізоферментів, ніж можна було очікувати, виходячи із кількості субодиниць в молекулі. Причиною такого явища може бути існування субодиниць в кількох конформаційних формах. Була запропонована теорія відносно якої кількість ізоферментів залежить від міжсубодиничних зв'язків, симетрії, або асиметрії мономерів (с9) Можливі п'ять варіантів розміщення в молекулі чотирьох мономерів: тетраедричне, циклічне, *стремяподібне*, трикутне і лінійне. Найбільшу кількість контактів забезпечує тетраедрична структура. Складний антигенний поліморфізм ізоферментів склав підґрунтя для вивчення їх імунологічному реагуванні організму людини. Історично визначали декілька типів імунологічної специфічності ферментів: *тканинна, органелярна, групова, видова*, які безумовно, неможна розглядати окремо від імуногенності і імуногенетичної детермінованості. **Вважається, що висока імуногенність ферментів і їх ізоферментів в гетероситемі обумовлена видоспецифічними антигенними детермінантами.**

Однією із причин генетично обумовлених відмінностей у первинній структурі є наявність генетичних варіантів. З цим фактом пов'язане

існування ізоферментів Г6Ф людини – першого ферменту пентодного циклу. Так, відомо близько 20 варіантів Г6Ф еритроцитів людини. Порівняння первинної структури нормального типу В з варіантами типу А показало, що відбувається заміна лише однієї амінокислоти. Виявлені варіанти ЛДГ, які пов'язані з генетичними змінами її Н- і М-субодиниць. Описаний навіть випадок відсутності Н-субодиниць ЛДГ у хворого діабетом. У його дітей (5 осіб) встановлено вкрай низька активність даного ферменту. Були також визначені розчинні варіанти АСТ в лейкоцитах монголоїдів (9).

Важливою характеристикою каталітичних властивостей ферментів слугує константа Міхаеліса (K_M). Однак, співставлення K_M часто ускладнюється тим, що використовують препарати різного ступеню чистоти і різні умови активності. Цікавими є результати досліджень ізоферментів ЛДГ, оскільки вони отримані в кришталевому вигляді із різни тканин організму людини і тварин. Порівняння K_M останніх показало, що для анодних компонентів дана величина є нижчою, тобто їх спорідненість до субстрату є вищою, ніж у катодних форм. Наприклад, ЛДГ₁ курча має у 300 разів більшу спорідненість до пірувату, ніж ЛДГ₅. Цитоплазматичний і мітохондріальний ферменти МДГ значно відрізняються за K_M . Обидва ферменти уповільнюються надлишком субстрату, але мітохондріальна форма особлива сприйнятлива до оксалатцетату на відміну від цитоплазматичної форми, яка найбільш чутлива до надлишку малату.

Ізоферменти розрізняють за ступенем гальмування різними інгібіторами. Наприклад, щавлева кислота в концентрації $3 \cdot 10^{-4}$ моль в реакції ЛДГ з піровиноградною кислотою у 2,5 разів сильніше гальмувати активність ЛДГ₁ ніж ЛДГ₃. Інгібітором ЛДГ є сульфід. ЛДГ₁ більш чутлива до гальмування сульфідом ніж ЛДГ₅. Так, 1 М мочевины при рН 7,5 інактивує ЛДГ₅ на 70%, а ЛДГ₁ – лише на 15%. L-триптофан гальмує активність лужної фосфатази : плаценти – на 77,7%; кишок – на 59,5 %; печінки на 26,1%; кісток – на 17,8% (12).

Ізоферменти розрізняють по відношенню до металів, коферментів та їх аналогів. Деякі ферменти виявляють активність тільки в присутності певних іонів. Так, один з ферментів глутамінази виявляє активність тільки в присутності фосфату (13). Іно Mg^{2+} по-різному впливають на В і С форми фосфопротеїнофосфатази з ретикулоцитів кролика.(13).

Ізоферменти неоднаково реагують на температурні впливи. Серед ізоферментів ЛДГ найбільш термолабільними є повільно мігруючі компоненти ЛДГ₄₋₆.

Деякі ферменти мають різні оптимуми рН: КФ селезінки – 4,5 – 5,8. Оптимальний рН кислої і нейтральної β -глюкозидази також розрізняються.(13)

Питання біосинтезу ізоферментів ще остаточно не визначені. Представлені дані дають підставу вважати, що вони змінюються в залежності від метаболізму при різних станах організму. **Внутрішнє клітинний синтез ізоферментів порушується при недостатці білків, які поступають до організму, при недостатці або відсутності коферментів, наявності інгібіторів, або активаторів, зміни температури, реакції середовища та інше.**

Важливе значення в біосинтезі ізоферментів мають фактори клітинної і центральної регуляції. Наприклад, глибинні порушення регуляторних механізмів клітини спостерігаються при пухлинних процесах. Пухлинна тканина вміщує білки та ізоферменти, які притаманні ембріональній тканині. При порівнянні ізоферментного складу АлД регенеруючої печінки і швидкопрогресуючої гепатоми, в яких порівняльною є швидкість ділення клітини, було встановлено, що при регенерації печінки у *зірковчатих* ретикулоендотеліоцитах і ендотеліальних клітинах підвищувався синтез АлД А і з'являлась АлД С. АлД В виявлялась в гепатоцитах нормальної і регенеруючої печінки. Ці спостереження дали

змогу визначити, що механізми синтезу ізоферментів при пухлинах і регенерації відмінні.

Був вивчений ізоферментний спектр лейцинамінотрансферази нормальних і трансформованих клітин при змінах **температурного режиму**. Для трансформації клітини нирки пацюка використовували мутант вірусу саркоми. При підвищенні температури до 40 -41°C визначався нормальний тип ізоферментного спектру з перевагою ізоферменту I. При зниженні температури до 36 -37°C проявлявся ізофермент III, який переважає при менш диференційованих станах клітин.(14).

Дослідниками (14) встановлено, що порушення ліпідного обміну при експериментальному холестериновому атеросклерозі призводить до змін арілестерази і ХЕ. На першій стадії відбувається їх адаптивна активація, на другій – виснаження індуктивного синтезу ферментів на тлі подальшого поступлення ліпідів. При цьому з'являються додаткові електрофоретичні фракції. Підвищення вмісту ЛДГ1 і ЛДГ2 в ізоферментному спектрі ЛДГ і зменшення повільно мігруючих фракцій спостерігалось при опроміненні тварин протонами і γ -проміннями. Швидкість зростання і ступінь змін співвідношення ізоферментів залежать від дози опромінення, рівню енергії і типу опромінення. Найбільш швидкі і глибокі зміни викликає γ -опромінення і тотальне рентгенопромінення.

Наявність ізоферментів, які каналізують одну і ту ж реакцію, свідчить про їх важливе біологічне значення. В живій клітині, яка являє собою складно організовану систему, хімічні компоненти мають властивість взаємодіяти один з одним та змінювати властивості окремих з них вступати в різні реакції. Слід зазначити, що серед хімічних реакцій, які відбуваються в організмі, є такі, що являють собою загальний етап різноманітних метаболічних шляхів. Ще у 1968 році, М.Ф.Гулий (15) встановив, що з різноманітних і багато чисельних механізмів регуляції активності ферментів широко розповсюджено гальмування ферменту продуктами реакції

„репресією” або за принципом зворотного зв’язку – „ретроінгібування”. Здійснення такої регуляції за наявності одного ферменту призвело би до виключення кількох метаболічних шляхів, якщо даний фермент каталізує реакцію, яка є загальною ланкою кількох метаболічних процесів. Це, в свою чергу, призвело би до порушень обміну речовин. Але це не відбувається завдяки наявності на важливих „ключових” етапах ізоферментів, які каналізують одну і ту ж реакцію, але не чутливі до контролю кінцевими продуктами за принципом зворотного зв’язку, або є чутливими до інших кінцевих продуктів. Наприклад, регуляція обміну аспартата - рис. (15-16). Перетворення аспартату у розгалуженому ланцюгу реакцій веде до утворення 3 амінокислот: **лізину, метіоніну, треоніну**. Перший загальний етап на шляху утворення вказаних амінокислот є фосфорилування аспартату , який каналізується аспартаткіназою. У *E.coli* існує три ізофермента аспартаткінази, кожний з яких незалежно підпадає під контроль ретроінгібування, вибірково гальмується лізином, метіоніном, треоніном.

Вихід загальних проміжних продуктів також знаходиться під вторинним контролем на загальних етапах даного шляху. Так, існує дві гомосеринових дегідрогенази, диференційований контроль яких здійснює метіонін і треонін.



Рисунок 5.2.1 - Регуляція біосинтезу лізіну, треоніну і метіоніну *E.coli* ізоферментами аспартаткінази на загальних етапах розгалуженого ланцюга реакцій.

Ілюстрація свідчить, що перший загальний етап біосинтезу 3 вказаних амінокислот каналізуються трьома ізоферментами, відновлення семі альдегіду аспартата -двома, оскільки цей процес є першим загальним етапом утворення лише двох кінцевих продуктів. Функціональна перевага множинних форм ферменту в регуляції обміну аспартата можна проілюструвати таким чином: якщо організм знаходиться в умовах продукції надлишку лізіну, гальмується чутлива до нього аспартаткіназа, яка у *E.coli* складає 45% від загальної аспартаткіназної активності і саме це вимикає усі етапи синтезу лізіну. Оскільки всі інші аспартаткінази є нечутливими до гальмування лізином, вони продовжують утворення аспартилфосфат зі швидкістю, яка складає 55% від нормальної. Цього є достатнім для

МДГ₂ більш чутлива до змін, ніж МДГ₁. Обидва фермента однаково зв'язують НАД • Н₂, утворюючи менш стійке з'єднання в процесі зростання рН. Цим пояснюється гальмування в мітохондріях відновлення оксалоацетат, а в надосадовій фракції – окислення малату. Вважається, що ці процеси виконують важливу роль в енергообміні метаболічних реакцій в мітохондріях. На рисунку ___ представлена схема біологічної ролі цитоплазматичної та мітохондріальної МДГ. В мітохондріях проходить окислення малату, утворений оксалоацетат потрапляє в цитоплазмц, де відновлюється до малату розчинною формою МДГ. Малат надходить до мітохондрії і цикл замикається.

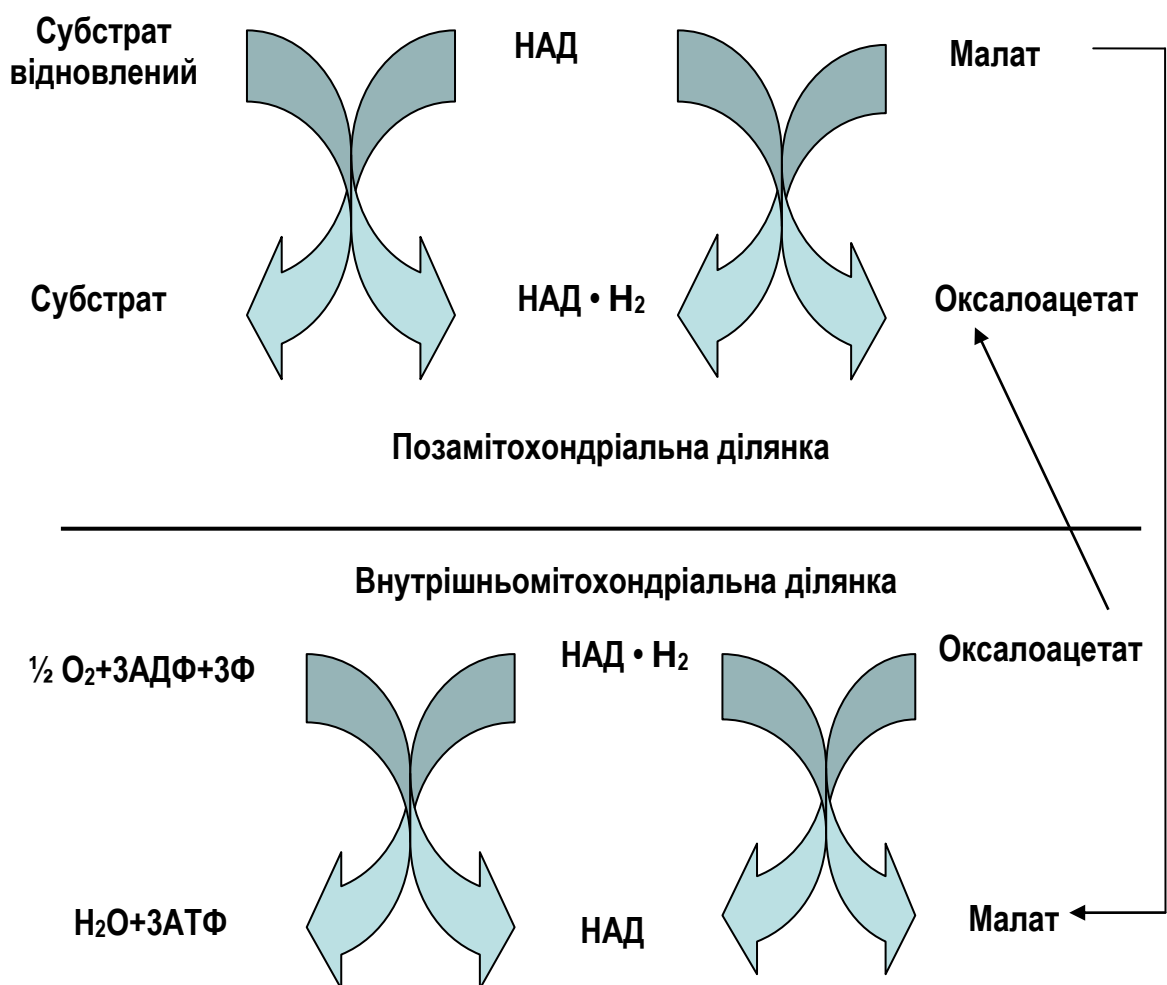


Рисунок 5.2.3 - Функції мітохондріальної та цитоплазматичної МДГ.

Треба відзначити роль ізоферментів МДГ, яка обіймає більш повне використання енергії біологічного окислення і передачі разом з малатом електронів в мітохондрії з наступною участю в синтезі АТФ. Розподіл цитоплазматичного і мітохондріального ізоферментів в різних тканинах неоднаковий. У жировій тканині, мозковій речовині наднирників, печінці вміщується цитоплазматичний ізофермент. Екстрамітохондріальне положення МДГ (НАДФ+) у печінці і жировій тканині відповідає основному місцю ліпогенезу і співвідноситься з концепцією про те, що даний ізофермент забезпечує НАДФН для синтезу жирних кислот. Мозок, серце, коркова речовина, наднирників і нирка вміщують цитоплазматичний і мітохондріальний ізоферменти, що передбачає іншу функціональну роль. Для гідроксилування стероїдів в мітохондріях коркової речовини наднирників необхідно НАДФН. Генерування НАДФН для даної системи пов'язано з активністю мітохондріальної МДГ(НАДФ+). Базуючись на існуванні 2 ізоферментів Симпсон і Естабрус розписують „шунт малату”, коли мітохондріальний фермент діє у напрямку прямої реакції, а цитоплазматичний – зворотної і утворює малат з пірувату і CO_2 . Це підтверджується виміром співвідношення $U_{\text{макс}}$ Прямої реакції і $U_{\text{макс}}$ зворотної, яке для мітохондріального ферменту дорівнює 50, а для цитоплазматичного - 25.

Різні ізоферменти можуть знаходитись в загальній частині клітини, але зв'язуватись з певними субклітинними структурами. Деякі ізоферменти, які вміщені в певних субклітинних утвореннях, електрофоретично можуть визначатися в різних фракціях.

З наявністю органної специфічності пов'язані потенціальні аутоімунні процеси і виникнення аутосенсibiliзації. При органної алотрансплантації, або трансплантації гемопоетичних клітин в процесах формування імунологічного відторгнення на проміжних стадіях в аллосистемі великий внесок належить саме ферментам і їх ізоформам.

Взаємозв'язок між ізоферментним спектром імунокомпетентних клітин і антитілоутворенням розглядають з позицій того, що лімфоїдна тканина являє собою сукупність імунокомпетентних клітин, які мають мінімальні генетичні відмінності внаслідок мутацій. Також слід враховувати, що антигенні і фізико-хімічні відмінності ферментів може бути обумовлено генетичним поліморфізмом останніх. Встановлено, що імуноглобуліни різних класів мають різну ензиматичну активність (). Так, у людини визначені ізоферменти ЛДГ, які представлені імуноглобуліном А, а деякі імуноглобуліни G являють собою ЛФ. Якщо фермент виступає в якості маркера імуноглобуліну, то така ідентифікація є допоміжною у визначенні клону імунокомпетентних клітин. Ізоферментні зміни у лімфоцитах відбуваються в процесі їх трансформації в лімфобласти і макрофаги.

Генетика ізоферментів

Генетика ізоферментів почала вивчатися з позицій генетичного поліморфізму систем крові в сукупності з біохімічними підходами ідентифікації множинних форм одного і того ж алелю. Такі електрофоретичні дослідження дозволили ідентифікувати серії алелей ізоферментів і принцип кодомінантного успадкування. Завдяки такому підходу було встановлено явище біохімічного поліморфізму. Наприклад, лиш е для одного ферменту Г6Ф встановлено 30 різних специфічностей, які спадкуються за кодомінантним принципом і мають різне представництво в різних популяціях.

Розрізняють ізоферменти, які спадкуються зчеплено зі статтю і ізоферменти, які визначаються аутосомними генами і мають мономерну структуру.

Ізоферменти, які успадковуються зчеплено зі статтю.

Ще в 1962-64 роках методами сімейного і популяційного аналізу показано, що структурні гени, які детермінують різні варіанти Г6Ф у людини

локалізовані на X хромосомі (Porter 1964 с.28). Локус Г6Ф знаходиться на довгому плечі X-хромосоми між локусами Г6Ф^A – гемофілія і Г6Ф^E-дальтонізм (Pearson?1975). Незважаючи на різницю в кількості X-хромосом в клітинних чоловіків (одна X-хромосома) і жінок (дві X-хромосоми), середня активність Г6Ф у них є однаковою. Такий же середній рівень даного ферменту спостерігається і у осіб з аномальним числом X-хромосом, наприклад, у чоловіків з синдромом Кляйнфельтера (XXY), або у жінок при три- тетра- і пентасомії (XXX, XXXX, XXXXX). Для пояснення цього явища була запропонована гіпотеза, згідно якої в будь-якої клітині жіночого організму активно функціонує лише одна з X-хромосом, яка може бути успадкована від батька, або від матері. Друга X-хромосома є неактивною. Дослідження жінок, які є гетерозиготами за генами, які визначають ізофермент Г6Ф підтвердили цю гіпотезу. В експериментах в культуральних дослідженнях тканин, отриманих від гетерозиготних жінок з генотипом Г6Ф^A і Г6Ф^B, виявлено, що деякі клітини вміщують лише один із ферментів: або фермент А, або фермент В і обидва ферменти разом не визначались в жодному з клонів клітин. Цей факт свідчить про те, що в жіночому організмі існує дві різні популяції клітин, одна з них синтезує фермент А, інша – фермент В. Генетичним аналізом встановлено, що Г6Ф є детермінованим багатьма алелями, які розміщені в парі X-хромосом. Ізофермент Г6Ф^A відрізняється від спорідненого ізоферменту, який детермінований алелем Г6Ф^B, тим, що в первинній структурі першого аспарагін є заміщеним аспаратом (). Ізофермент, який детермінований алелем Г6Ф^B є незмінним, навпроти, алель ний йому ген Г6Ф^A визначає цілу низку захворювань, які існують в різних формах. Різні форми недостатності еритроцитарної обумовлюють захворювання фавізмом - чутливістю хворих до синтетичних протималарійних препаратів, виникненню гемолітичної анемії, яка пов'язана з чутливістю до ліків, анемії новонароджених, хронічної несфероцитарної гемолітичної анемії. Спадкова недостатність Г6Ф супроводжується

порушенням розумової відсталістю, порушенням моторних функцій, кусанням губів і пальців та інше. При захворюванні утворюється надлишок пуринів.

Ізоферменти, які визначаються аутосомними генами і мають мономерну структуру. До цієї групи ферментів відносяться аденілаткіназа (АК), аденозіндезаміназа (АДА), глюкоуронідаза (β -Гл, α -Гл), галактокіназа (ГлК), манозофосфат-ізомераза (МФІ), пепсиноген (Пс), пептидаза А,В,С,Д,Е, (Пд.), уридінккіназа (УК), α -Л-фукозидаза (α -Фу) і інші. Синтез даної групи ізоферментів контролюється однією, або подвійною парою генів. В більшості випадків проявляється успадкування за типом кодомування, рідше – повне домінування, або рецесивність. Проста мономерна структура ферментів детермінується однією або декількома парами генів, які контролюють синтез одного поліпептидного ланцюга. Ці ланцюги не утворюють гібридних молекул, що є характерним для ферментів, які мають четвертичну структуру. АК еритроцитів людини синтезується під контролем двох генів АК¹ і АК². У гетерозигот присутні обидва варіанти АК, що обумовлено кодомінантним типом їх успадкування. АК різних тканин організму, в тому числі і еритроцитів, при електрофорезі ідентифікується у вигляді 4-6 фракцій, які визначаються одним і тим же аутосомним локусом АК (с.29). АДА присутня у вигляді двох ізоферментів АДА-1 і АДА-2, які контролюються генами АДА¹ і АДА² (с.30). Недостатність активності АДА призводить до формування тяжких форм імунної недостатності. β -Гл3 кодується двома локусами, які розміщені на хромосомах 3 і 22. Гетерозиготні носії мутантної форми β -Гл3 можуть бути визначені за концентрацією в сечі і волоссях. Мутантна форма даного ферменту спадкуються як рецесивна ознака. У хворих з синдромом Гольдберга поряд з ГМ₁-гангліозидозом відзначена недостатність і за β -Гл3. Мутації генів β -Гл3 знижують синтез і активність ферменту, що призводить до накопичення в організмі глікозамінгліканів,

глікопротеїнів, що в свою чергу, обумовлює ураження внутрішніх органів, остеохондродистрофію. Недостатність активності ГЛК у людини спадкується за аутосомно-рецесивним типом (сю30). При гібридизації соматичних клітин „людина х миша х” було визначено, що структурний ген ГЛК людини локалізований в хромосомі 17. Спостерігається зниження активності цього ферменту при близькоспоріднених браках, може проявлятися як ювенильна катаракта. У гетерозигот по генам ГЛК еритроцитів відмічена розумова відсталість. МФІ людини контролюються генами, які за даними різних авторів локалізовані на 7 і 15 хромосомах. Гени Пс локалізовані на 6 парі хромосом. Електрофоретичний аналіз виявив 2 гетерогенні зони, які представлені 5 фракціями. Фракція 5 – визначає аутосомний ген Пс^а, а відсутність її – алельний ген Пс^б. Ген Пс^а є домінантним. Підвищення рівню сироваткового ПС пов'язано з групою крові О і іншими генетичними маркерами у хворих на виразку дванадцятипалої кишки. Методом гібридизації соматичних клітин визначено, що гени Пд А, Пд В, Пд С, Пд Д, і Пд Е є локалізованими відповідно в хромосомах 18, 12, 1, 19, і 4. Ген Пд А може слугувати біохімічним індикатором делеції 18-хромосоми людини. Виявлено три варіанти УК, які мають неоднакову електрофоретичну активність але представлені однією фракцією. Вони представлені генами УК¹, УК², УК³, які утворюють одну серію множинних алелей, локалізовані на 1-й парі хромосом. В різних тканинах людини визначено 6 електрофоретичних фракцій α -Л-фукозидази. Гетерогенність її обумовлена різною кількістю залишків сілової кислоти. Фермент спадкується рецесивно. Електрофоретичні варіанти ферменту знаходяться під контролем 2 аутосомних генів α -фу¹ і α -фу². У гетерозигот гібридних ферментів не визначено, тобто гетерозиготність виникає за рахунок однієї білкової мутації.

Ізоферменти, які мають складну четвертичну структуру і визначаються однією парою аутосомних генів.

Ізоферменти з четвертичною структурою у гетерозигот утворюють гетеро полімери. **Це гібридні ферменти.** Кількість їх залежить від складності четвертинної структури. Синтез цілого ряду таких ферментів знаходиться під контролем однієї пари генів. До таких ферментів відносяться ГлФТ; ЛГЛ; ГлР; ГФІ; Ка; КФ; По А і Д; ПНФ; 3-ФГМ; ФГД; ЦД; ЩФ плаценти і інші. Встановлено, що спадкова недостатність по Глет у людини супроводжується галактоземією, яка проявляється вже в перші тижні після народження. Надлишкове накопичення галактози викликає важкі розлади у функції печінки, диспепсію і може призвести до коми. Частота зустрічає мості – 1 випадок на 1000 новонароджених. Недостатність за ГлФТ пов'язана з рецесивною мутацією в 2-й або в 3-й парі хромосом. (33Sun77) В аналогічних експериментах при каріотипуванні субклона, який втратив активність ГлФТ, встановлена транс локація короткого плеча 2-ї хромосоми людини на довге плече хромосоми 4 китайського хом'ячка. Це дозволило віднести ГлФТ до центромерного району хромосоми 2 людини. Вважається, що домінантний ген детермінує високу активність ГлФТ, а рецесивний – низьку.

Два ізоферменти ЛГЛ виявлені в еритроцитах людини. Сімейний і популяційний аналіз дозволив визначити, що синтез ферменту контролюється двома кодомінантними аутосомними генами генами ЛГЛ¹ і ЛГЛ². У гетерозигот визначено з фракції ферменту, що підтверджує гіпотезу про димерну четвертичну структуру ЛГЛ.

ГлР виявлено у вигляді 1 – 2 фракцій при електрофорезі гемоліз ата еритроцитів людини. Ці фракції контролюються 2 кодомінантними аутосомними генами, які локалізовані на 8 парі хромосом. Активність ГлР підвищена у осіб з дефіцитом Г6Ф.

ГФІ визначена у людини у вигляді 8 фенотипових варіантів котрі, як показав сімейний аналіз, контролюються серією множинних аутосомних алелей. За даними Ritter (1974) локус ГФІ є зчепленим з локусом груп крові системи АВО і локалізований на 19 парі хромосом.

Знижений рівень активності **Ка** у людини визначається мутацією в структурному гені. Встановлено 4 зони, які мають активність КФ – А; В; С; Д. Зона С є специфічною для плаценти, зони А, В, Д – для нирок; зони В і Д – для печінки, серця, скелетних м'язів. Компонент А вміщує сіалову кислоту. Ген еритроцитарної **КФ** розміщений на хромосомі 2.

З-ФГМ м'язів людини має низьку електрофоретичну рухомість і зазначена як тип М. У мозку, печінці, нирках та еритроцитах визначені швидкі фракції ферменту, тип – В. Вважають, що контроль синтез ферментів М і В здійснюють два неалельних гена. Частковий сімейний аналіз свідчить про можливість аутосомного генетичного контролю синтезу ФГМ еритроцитів людини.

ФГД – виявлена в еритроцитах людини у вигляді електрофоретичних фракцій А, В, С, Д і Е. За допомогою сімейного аналізу встановлено, що синтез цього ферменту здійснюється під контролем цілої серії множинних аутосомних алелей **ФГД^а** **ФГД^в** **ФГД^с** **ФГД^е**, які представлені на 1-й парі хромосом.

Ізоферменти, які контролюються кількома парами неалельних генів

До даних ферментів належать ферменти, які мають мономерну структуру (α -Ам, ДФ, Гу, КА, ФГК, ФМ), і ферменти, які мають четвертичну структуру (АДГ, ФДА, ЛДГ, ФПГ – мають гібридні молекули і АСТ, АлТ, ИДГ, МДГ-НАД,-залежна, МДГ-НАД незалежна, ПОД – не утворюють гібридних молекул).

α -Ам існує у двох формах АМ- слинної залози (АМ-1) і АМ підшлункової залози (АМ-2). Кожна з них при електрофорезі має 5 – 6 фракцій. Структуру двох форм визначають дві пари неалельних аутосомних генів **АМ¹** **АМ²**, які спадкуються зчеплено. Вони локалізовані на 1-й парі хромосом людини.

ДФ (НАДФ - залежна) є ферментом еритроцитів людини і має дві форми – швидко-мігруюча і повільно-мігруюча. Структурні гени ДФ розташовані на одній з аутосомних пар хромосом.

У різних тканин людини визначені у вигляді 7 електрофоретичних фракцій: А, В, С, Д, Е, Ф, Г. В еритроцитах відсутніми є фракції С і Г, у скелетних м'язів – С, Д, і Г; печінка має фракції С,Е,Ф; селезінка – С і Е. Фракції мають різну молекулярну масу: у А, В, Д компонентів вона складає 31 000 у останніх – 25 000. На основі цього вважається, що дані компоненти є продуктами різних генів.

КА існує у вигляді двох форм, які мають відмінності за амінокислотним складом і імунологічним властивостям. Мінливість двох форм вказує на існування двох неалельних генів КА В і КА С, які контролюють їх синтез. Із тканин тварин виділено 7 ізоферментів КА, які відносять до типу В і С. Активність КА С з еритроцитів людини у 4 рази вище ніж активність КА В. Популяційні дослідження дозволили визначити нові електрофоретичні варіанти, зокрема для локусу КА – КА В-9 і КА С-4 який було відкрито у Індії.

ФГК людини визначено на електрофореграмі у вигляді двох форм ФГК А і ФГК В. Перша – виявляється в еритроцитах, печінці, нирках і інших органах, друга – в тканині *семенников*. Структурний ген ФГК А локалізовано в Х-хромосомі; ФГК В – в аутосомі. Цитогенетичний аналіз транс локацій довгого плеча Х-хромосоми на аутосому 14, дав підставу для заключення відносно локалізації структурного гену ФГК^а на довгому плечі Х-хромосоми.

ФГМ еритроцитів і різних тканин складається з 7 – 9 компонентів (А, А, В, С, Д, Е, Ф, Г, И, Й). Існує декілька фенотипів ферменту. Фермент ФГМ-1 має зони А і С; ФГМ -2 має зони В і Д. ФГМ 2-1 має зони А, В, С, Д.

Ізоферменти четвертинної структури, які мають гібридні форми.

АДГ печінки людини виявлена у 6 варіантах, які утворені комбінаціями із трьох одиниць: А, В, В¹. Оскільки форма В¹ може переходити

у форму В, то постулюється існування двох неалельних генів АДГ¹ АДГ², які контролюють синтез даних ферментів.

АлД існує в тканинах у вигляді ізоферментів А, В, і С, які складаються з субодиниць α , β і с, які здатні утворювати між собою гібридні сполучення або серії гібридних ізоферментів. Існує погляд, що структуру цих субодиниць визначають три неалельних гени. Всі АлД людини є тетраметрами.

ЛДГ є тетраметром, який складається з 5 ізоферментів, які, в свою чергу, утворені із сполучень полі пептидів двох типів субодиниць – А (або М) і В (або Н). Ці два види субодиниць об'єднуються по 4 в різних комбінаціях і утворюють 5 ізоферментів: ЛДГ; ЛДГ 1; А₀В₄; ЛДГ-2; - А₁В₃; ЛДГ3 –А₂В₂; ЛДГ-4 А₃В₁; ЛДГ-5 - А₄В₀. Співвідношення цих ізоферментів у тканинах дорослої людини є результатом послідовних змін активності генів, які контролюють синтез даних ферментів. Вибіркова активність різних генів ЛДГ визначена хімічним складом цитоплазми, на який впливають гени, які регулюють синтез субодиниць. Тому спектр ізоферментів ЛДГ в кожний даний момент є обумовленим рівновагою між процесами синтезу і розпаду. Оскільки співвідношення в процесах клітинної диференціровки змінюється, повинно відбуватися видалення ізоферментів, в яких клітина не має вже потреби.

ФПГ утворює три ізоферменти. За імунохімічними властивостями ферменти 1 і 3 відрізняються. Ізофермент 2 є гібридним і складається з ферментів 1 і 3. Синтез ферменту кодується двома неалельними генами.

Ізоферменти четвертинної структури, які не утворюють гібридні форми.

АСТ знаходиться в клітинах у двох формах – мітохондріальної (m-АСТ) і розчинної (s-АСТ). Першу форму контролює аутосомний ген АСТ-1, який локалізований на 10-й парі хромосом людини, другу - АСТ-2.

МДГ-НАД-залежна виявляється в мітохондріях (m-МДГ) і цитоплазмі (розчинна-s-МДГ). Дані форми ферменту мають різні властивості і кожна з них складається із двох субодиниць. Згідно структурним і функціональним відмінностям визначена локалізація одного структурного гену ферменту на 2-й хромосомі (МДГ-1), іншого – на 7-й хромосомі людини (МДГ-2).

МДГ-НАДФ-залежна виявляється в мітохондріях (m-форма) і цитоплазмі (розчинна-s форма). Дані форми ферменту також мають різні властивості і кожна з них складається із двох субодиниць. Генетичний контроль цих ферментів здійснюється незалежно.

ПОД існує в двох формах – мітохондріальної (m-форма) і розчинної (розчинна-s форма). Синтез їх здійснюється під контролем двох незалежних аутосомних генів, які локалізовані в 21-й парі хромосом (локус ПОД-1) і в 6-й парі хромосом (локус ПОД-2). Генетичні дані співвідносяться з біохімічними s-ПОД є за четвертичною структурою є димером; m-ПОД є тетрамером.

Таким чином, за містом розположення усі гени ізоферментів можуть бути розділені на дві групи: до першої відносяться гени, які представлені у статевих хромосомах, до другої групи, - які локалізовані в аутосомах. За характером успадкування гени ізоферментів можна розглядати як домінантні, рецесивні і кодомінантні. Все це дозволяє мати уяву про хромосомну локалізацію алелей, які відповідають за синтез цих ферментів, побудувати хромосомні карти ізоферментів і зробити математичні розрахунки відносно можливої дії цих генів в різних популяціях людей. Це особливо є важливим у випадках, коли споріднена популяція вміщує гени, які асоційовані з захворюваннями. На основі знань про дію генів, які асоційовані з успадкуванням захворювань, зокрема таких, які пов'язані з недостатністю ферментів, поширене медико-генетичне консультування населення. Це

дозволить в майбутньому уникнути цілої низки захворювань, які раніше вважались невиліковними.

Специфічність і роль ізоферментів в ауто- і алогенних імунних процесах *Антигенний поліморфізм ізоферментів*

Складну антигенну структуру ізоферментів можна розглядати з позицій можливості їх участі в імунологічних процесах, зокрема при багатьох патологічних станах. Існують різні типи імунологічної специфічності ферментів: індивідуальна, органна (тканинна), органелярна, групова і видова. Виражена імуногенність ферментів і їх ізоферментів в гетеро системі обумовлена видоспецифічними антигенними детермінантами. З наявністю органної специфічності ферментів пов'язана їх потенціальна аутоімуногенність і ауто-імуноантитілопродукція. Проміжний стан між вкрай протилежними ступенями імуногенності мають ферменти і їх ізоферменти в ало системі, зокрема при трансплантації тканин і органів. Визначення активності ізоферментів при трансплантації має велике значення з точки зору вивчення можливого впливу специфічних антитіл на ензиматичну активність в процесі патогенезу.

Число антигенних різновидів ферментів часто не відповідає кількості їх біохімічних різновидів. Цілий ряд ферментів, які представлені молекулами ідентичними в антигенному відношенні, має біохімічні із форми. Наприклад, ідентичні за своїми імунологічними властивостями мінорний і головний компоненти РНА *семенних пухирків бика*. Сіменна рідина людини складається з двох електрофоретичних фракцій Пс, які є ідентичними в імунологічному відношенні. У тих випадках, коли фермент складається з молекул з різною імунологічною специфічністю можна говорити про імунологічні ізоформи ферменту. Так, Пс шлунка людини можна розглядати як два імуноізофермента. Деякі ізоферменти можуть не мати ферментативної активності і лишаються інтактними у антигенному відношенні. Причиною даного факту можуть бути мутації, які вразили тільки

каталітичний центр, наприклад Pc в пухлинах людини. Відповідно основним законам імуногенетики, а саме відповідно до інших генетичних еритроцитарних систем, антигенна специфічність і антигенна вразливість обумовлені антигенним центром білкової молекули – антигенною детермінантою. Каталітичний центр молекули може приймати участь у визначенні антигенної специфічності лише як гаптен. Деякі ферменти не мають антигенної детермінанти у каталітичному центрі (40). Антигенний і каталітичний центри є не тільки функціональними поняттями, але і структурними частинами молекули ферментів, які роз'єднані у просторі.

Антигенна спільність ізоферментів може вказувати на їх фізико-хімічну подібність, які обумовлені полімеризацією ідентичних білкових субодиниць, або відношення типу фермент – профермент. Так був встановлений зв'язок між трипсіногеном і трипсином, хімотрипсіногенами I і II і хімотрипсином (41 Geokas). В деяких випадках антигенна подібність розглядається як слідство того, що один з ферментів є попередником іншого.

Дослідження антигенної подібності ферментів різних видів живих організмів також дозволяє визначити філогенетичну спорідненість між видами і може мати значення для підбору менш імуногенних ферментів для людини при лікуванні багатьох хвороб, а також для використанні їх в якості тест-систем для диференційної діагностики. Прикладом може слугувати вивчення видової антигенної специфічності **Ka** еритроцитів ссавців, коли було встановлена відповідність видової антигенної специфічності: 1-а людина, макака-резус, 2-а кінь, віслук, гвінейська свинка, 3-я вівця, коза, 4-а собака. Аналогічні дані отримані у відношенні АСТ еритроцитів людини і різних макак, але не інших видів ссавців.

Ступінь антигенної гомології ізоферментів різних видів неоднакова для різних ферментів і, можливо, залежить від того, на якому ступені філогенезу виник фермент. Так, вивчення антигенної гомології

ізоферментів флавін вміщуючої оксидази L-амінокислот ссавців дозволило встановити, що даний фермент в ході еволюції утворений недавно.

Виникнення при патології нових, не властивих для певної тканини і організму людини на даному етапі онтогенезу ізоферментів, як і інших білкових молекул з незвичайною антигенною конфігурацією молекул, може складати один з механізмів розвитку аутоімунних процесів. Наприклад, при малігнізації відбувається синтез ізоферментів, які не є ідентичними вихідної тканини. Часто змінені ізоферменти бувають близькими в антигенному відношенні до ферментів неспоріднених тканин, наприклад, КК у гематомах пацюків і людини.

Антигенна дивергенція ферментів в пухлинах може наближувати їх до гетерогенних ферментів. Так, анти-сироватка проти дигідрофолатредуктази, яка була виділена з лімфоми мишей, преципітувала і змінювала активність даного ферменту, в рівній мірі, з лімфом і епітеліальних пухлин, але була неактивною по відношенню до ферменту нормальної печінки мишей.

Імуногенність ендо- і екзогенних ізоферментів.

Серед антигенних детермінант для імуногенності ізоферментів важливе значення мають органо- (тканинно) специфічні структури – детермінанти, які дають характеристику структурній і функціональній диференціації клітин і тканин. Оскільки вони є маркерами, які з'явилися у філо- онтогенезі диференціації тканин, органоспецифічні детермінанти в майбутньому виконують активну функцію у життєдіяльності організму. Їх роль полягає в зберіганні і підтримці напрямку і рівня тканинної диференціації при оновленні клітин і при регенеративних процесах в тканинах. Підвищено надходження органоспецифічних ізоферментів в кров має діагностичне значення, оскільки вказує на локалізацію ураження тканин. Необхідність в органоспецифічних детермінантах виникла в ферментах, які мають загальні функції для різних тканин. Причому, в одних випадках носієм

такої детермінанти може бути окремий молекулярний різновид серед кількох ферментів, в інших – всі ізоферменти, або молекули ферменту, які не мають статусу ізоформ. Наприклад, у хворого з метастазуючою пухлиною легень у сироватці крові і пухлинній тканині були визначені ізоферменти, фізико-хімічно ідентичні ЛФ, яка синтезується у плаценті і декретується в кров вагітних жінок. Даний фермент (Реган-фермент) можна виявити у хворих з різними злоякісними новоутвореннями. Прикладом органоспецифічного ізоферменту може також бути Х-ізоформа ЛДГ сперматозоонів. Більшість ферментів, на відміну від вищезазначених не вміщує ізоімуноферментів для вираження специфічності тканин, але у деяких з них є одна органоспецифічна антигенна детермінанта.

Вивчення ферментів за допомогою гетеро- і алоімунізації дозволило отримати опосередковані докази їх аутоімунногенності, оскільки були виявлені органоспецифічні антитіла, які однаково реагують з вихідним імуногеном і аналогічним аутогенним ферментом, тобто за специфічністю до вихідного білку ці антитіла є аутоантитілами. Потенціальна аутоімуність органоспецифічних ізоферментів значно вища ніж неорганоспецифічних. Ферменти, які не мають вираженої органної специфічності також можуть викликати синтез ауто антитіл, однак для цього потрібна більш „контрастна” ало- або гетеро система, наприклад, алотрансплантація.

Ізоферменти і імунна поліпотентність лімфоїдних популяцій.

Лімфоїдна тканина є специфічною тканиною яка забезпечує усі проявлення імунітету (аутоімунні процеси, трансплантаційний імунітет, отримання гетеро імунних тест-сироваток). Для розпізнавання імунокомпетентними клітинами антигенних детермінант, зокрема ізоферментів, важливою є їх специфічність відносно антигенних детермінант аналогічних ферментів в імунокомпетентних клітинах і органах, тобто їх відносна органна специфічність. Наприклад, ізоферменти людські N-ацетил β-D-глюкозамінідази селезінки людини не мають тканинних антигенних

відмінностей від ізоферментів в нирках і мозку. У пацюків НАД-глікогідролаза селезінки ідентична в антигенному відношенні аналогічному ферменту печінки і мозку. Ці данні свідчать про низьку органну специфічність ферментів і білків.

Ізоферментні зміни відбуваються в лімфоцитах і в процесі альтернативної трансформації їх в лімфобласти і макрофаги. Базофілія цитоплазми, яка є характерною для цих клітин, віддзеркалює ступінь накопичення ізоферментів КФ і кислих дезоксирібонуклеаз. (51) Нестимульовані мононуклеари хворих до алотрансплантації нирок трансформуються в перехідні базофільні клітини, макрофаги і бласти у співвідношенні 70:1, 9: 0,2, а після трансплантації нирки – у співвідношенні 20: 20: 0,3. В обох випадках співвідношення трансформованих лімфоцитів змінюється після стимуляції фітогемаглютиніном з властивостями β -нейрамінідази.

Таким чином, вивчення ізоімуноферментів з позицій імуногенетики має певне значення для визначення загальних властивостей і генетичних зв'язків між ферментами, а також визначення нових форм ферментів у філогенезі і при патологічних станах. Вивчення імунологічних різновидів ізоферментів проводиться у гетеросистемах, які найбільш вразливі до індивідуальних антигенних відмінностей молекул ферментів, як і білків взагалі, завдяки їх видової специфічності. Вразливість системи тим вище, чим більше віддалені в філогенезі система яку іспитують (фермент) від системи, яка саме іспитує (імунізований організм).

Питання для самоконтролю.

1. Чим є обумовлений генетичний поліморфізм сироваткових білків людини. Чи відповідає він антигенному поліморфізму еритроцитарних систем крові.
2. За яким типом відбувається успадкування антигенної специфічності ізоферментів у співставленні із законами успадкування інших генетичних систем крові.
3. Які фізіологічні функції виконують гаптоглобіни, трансферини, альбуміни і ліпопротеїди.
4. За якими фізико-хімічними властивостями розрізняються ферменти, які мають однакову каталітичну дію.
5. Назвіть типи імунологічної специфічності ферментів.
6. За яких умов може порушуватись внутрішньклітинний синтез ізоферментів.
7. Назвіть ізоферменти, які спадкуються зчеплено зі статтю і ізоферменти, які визначаються аутосомними генами і мають мономерну структуру.
8. Назвіть ізоферменти, які мають складну четвертичну структуру і визначаються однією парою аутосомних генів.
9. Назвіть ізоферменти четвертичної структури, які мають гібридні форми і які не утворюють гібридні форми.
10. Назвіть типи імунологічної специфічності ферментів.
11. Охарактеризуйте, чим обумовлена виражена імуногенність ферментів і їх ізоферментів в гетеросистемі
12. Чи відповідає число антигенних різновидів ферментів числу їх біохімічних різновидів.
13. Назвіть можливі механізми виникнення аутоімунних процесів з позицій ізоферментних порушень в організмі людини.

Література

1. Burtis C., Ashwood E., Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 2006. Elsevir Inc, 2412 p.
2. Тельнов В.И. Оценка распределения генотипов гаптоглобина у людей, подвергшихся хроническому профессиональному облучению в значительных дозах // Генетика. - Т. 30. - № 9. - С. 1274 – 1277.
3. Раутиан Г.С., Мироненко В.Р., Калабушкин Б.А. Изучение распределения генотипов гаптоглобина в популяциях человека. // Генетика.-Т.24.-№12.-1988.-С.2226-2232.
4. Распределение фенотипов гаптоглобина среди населения Украины / Никольченко А.Ю., Омельченко Е.И., Гулевский А.К. и др. // Цитология и генетика . - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 62 – 69.

5. Gast *et al.* *BMC Cancer* 2008 **8**:389 doi:10.1186/1471-2407-8-389.
6. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. В 2-х томах 2009: БИНОМ. ЛЗ, Мир.
7. Хрисанфова Е.Н. Конституция и биохимическая индивидуальность человека. - М.: Изд-во МГУ, 1990. – 315с.
8. Ткачук В.А. Клиническая биохимия. - М.: Медицина, 2004. – 512 с.

РОЗДІЛ VI

Головний комплекс гістосумісності людини(МНС)

6.1 Загальна характеристика

Головний комплекс гістосумісності – це група генів і кодуємих ними антигенів клітинної поверхні, основною біологічною функцією яких є здійснення генетичного контролю імунної відповіді на рівні розпізнавання чужерідного по відношенню до тканинних антигенів даної біологічної системи і підтримання імунного гомеостазу. Дана сукупність генів ГКГ представлена у всіх хребетних (МНС – Major Histocompatibility Complex). У людини головний комплекс гістосумісності позначається як HLA – Human leukocyte Antigens, оскільки антигени вперше були визначені саме на лейкоцитах. Перший лейкоцитарний антиген було ідентифіковано Ж.Доссе у 1952 році і подальші дослідження дозволили вченому висловити припущення відносно того, що саме лейкоцитарні антигени є фактором, який дозволяє відрізнити особисті тканини від тканин організму іншої людини. Пізніше перший ідентифікований антиген даної системи був позначений як HL-A2. Після перших публікацій Ж.Доссе значне коло вчених в галузі генетики, імунології і гематології присвятили свої дослідження новому науковому напрямку, який в той час отримав назву імуногематологія. Так, голандським дослідником van Rood для визначення специфічності сироваток багатонароджуваних жінок кожний взірець сироватки досліджено було з клітинами 100 донорів. Групування сироваток аналогічної специфічності дозволила виділити першу систему лейкоцитарних антигенів – групу 4 (4a, 4b). Припущення van Rood відносно двохалельного поліморфізму даної системи отримало подальший розвиток. Пізніше було доведено, що саме ці алелі філогенетично є структурами з яких виникли усі антигенні детермінанти сублокусу HLA-B шляхом еволюційних мутацій.

Міжнародні кооперативні дослідження розпочалися з 1964 року, коли Р.Тerasaki і Mc Clelland запропонували уніфікований лімфоцитотоксичний тест для ідентифікації серотипів молекул HLA. Незважаючи на досить короткий шлях розвитку знань відносно структури, функції і геномної організації системи HLA, на сьогодні дана система є найбільш вивченою і систематизованою не тільки у людини, але і у тварин. При врученні Ж.Доссе Нобелівської премії, вчений зазначив, що вивчення цієї системи є яскравим прикладом світового гуманітарного співробітництва, оскільки в даному випадку не потрібно було навіть патентувати дослідницькі результати. Були створені спеціальні міжнародні програми по дослідженню системи HLA з обов'язковим обговоренням на робочих нарадах. За даною програмою дослідниками різних країн використовуються єдині сертифіковані методи досліджень і тест-реагенти. До цієї програми залучені Американська, Британська, Французька спільноти гістосумісності і імуногенетики, а також Європейська федерація імуногенетиків. Як наслідок цієї співпраці ідентифікована і систематизована все зростаюча кількість HLA алелей (в 1991р. -150; в1998 -472; в2005 році -1900 алелей). Таким чином, система HLA є високо поліморфною системою.

Генетичний поліморфізм системи HLA	
■ HLA-A: 506	HLA-DRA: 2
■ HLA-B: 872	HLA-DRB1: 525
■ HLA-C: 274	HLA-DQA1: 25
	HLA-DQB1: 66
	HLA-DPA1: 15
	HLA-DPB1: 114

Рисунок 6.1.1 – Генетичний поліморфізм системи HLA. На рисунку наведені кількісний склад специфічностей в межах кожного локусу.

В межах кожного локусу визначена велика кількість різних специфічностей генів (рис. 6.1.1), які відрізняються між собою за амінокислотною послідовністю. Номенклатуру генів системи HLA і кодованих ними антигенів затверджується комітетом ВОЗ. Позначання HLA антигенів складається з позначення всієї системи, локусу, до якого відноситься антиген, номеру антигену. Якщо генетична позиція антигену ще недостатньо визначена і антиген ще не має офіційної номенклатури ВОЗ, то перед його порядковим номером ставиться символ w (наприклад Cw5). В межах системи можуть відбуватися перехресні генетичні реакції, які призводять до можливості реагування імунних сироваток певної специфічності не тільки з антигенами тотожної специфічності, але і іншими детермінантами той же самої алельної серії. Такі перехрест-реагуючі поєднані в Cross-reactive groups (CREG- крег). Насьогодні є декілька гіпотез, які пояснюють існування даного факту: специфічність HLA має походження від загального родоначального пула public- специфічності, наприклад Bw6; існування крегів пов'язано з розщепленням складних антигенів на більш вузькі специфічності – спліти, що стало можливим ідентифікувати з моменту використання моноклональних антитіл. В таких випадках попереднє позначення специфічності вказують у скобках, наприклад, HLA-A23(9). Найбільш прогресивною моделлю даного явища вважається модель комплекс-комплекс, яка передбачає, що не тільки трансплантаційний антиген є комплексним, але і сама імунна сироватка вміщує антитіла, які вступають в реагування як з специфічними детермінантами, так і схожими за структурою детермінантами. В середині 80-х років, з розвитком ДНК-технологій (перш за все полімеразно-ланцюгової реакції – ПЛР) стала можливою ідентифікація кількох варіантів алельних генів, що з одного боку розширило можливості визначення генофенотипових ознак особи, з іншого боку, були визначені

антигенні специфічності які не мають серологічного еквіваленту. З'явилися певні розбіжності при трактовці результатів фенотипування у співставленні з генотипуванням. Наприклад (рис.), серотип HLA-A2 має більш ніж 25 алелей.

Система HLA: фенотип і генотип

HLA-ФЕНОТИП	HLA-ГЕНОТИП	
HLA-A 2	HLA-A*0201	HLA-A*0208
	HLA-A*0202	HLA-A*0209
	HLA-A*0203	HLA-A*0210
	HLA-A*0204	HLA-A*0212
	HLA-A*0205	HLA-A*0213
	HLA-A*0206	HLA-A*0214
	HLA-A*0207	HLA-A*0215

Рисунок 6.1.2 - Порівняння фенотипу(серотипу) і генотипу HLA-A2 за номенклатурою

Деякі інші серотипи, також мають більшу кількість алелей за специфічністю. Даний факт дає підставу говорити про алельні і антигенні типи HLA. Тому надалі ВОЗ було запропоновано змінити серологічну структуру номенклатури системи HLA : спочатку буквами позначають ідентифікований ген, а потім цифрами вказують номер алелю. Ген, який кодує антиген HLA-A2, позначають як HLA-A*0202. Знак(*) вказує, що для фенотипування використовувався молекулярно-генетичний метод. Цифри, які позначені за першими двома цифрами, вказують на специфічний алельний номер. Оскільки навіть методи молекулярно-генетичного

типуювання мають різну ступінь розкриття специфічності – від групи генів до безпосереднього алеля.

В залежності від чутливості методу гістотипування один і той же фенотип може мати різні цифрові позначення.

Наприклад, специфічність за серологічним гістотипуванням HLA-A28 (серотип) відповідає специфічності алельних генів (low resolution) HLA-A*68; - (high resolution) HLA-A*6801; (рис.)

Запис результатів HLA-типуювання:	
Фенотип	
HLA A 2, 28; B 27,35; (w4,6); Cw 2,4; DR15,17; DRw 51,52; DQ1,2	
Генотип (low resolution)	
HLA A*02, 68; B* 27, 35; C* 02, 04; DRB1*03, 15; DRB3*; DRB5* DQA1*01,02; DQB1*01,02	
Генотип (high resolution)	
HLA A*0201, 6801; B*2704, 3507; C* 0201; 0402; DRB1*0301, 1502; DQA1*0101, 0201; DQB1*0101, 0202	
Гаплотип	
1. A*0201; B*2704; C* 0201; DRB1*0301; DQA1*0101; DQB1*0101	
2. A* 6801; B*3507; C*0402; DRB1*1502; DQA1*0201; DQB1*0202	

Рисунок 6.1.3 - Порівняльна характеристика специфічності імуногенетичних маркерів системи HLA за сучасною номенклатурою в залежності від методів ідентифікації

За хімічною структурою антигени HLA являють собою глікопротеїди, які знаходяться на поверхні клітин і кодовані групою щільно зчеплених генів 6-й хромосоми. Антигени даної системи не тільки відіграють важливу роль в регуляції імунної відповіді, але і являють собою сильні антигени.

Генний комплекс має 3500 тис. пар нуклеотидів ДНК. Подібно іншим видам тварин, для людини є характерним наявність всіх основних класів МНС, зокрема – HLA-I і HLA-II, HLA-III, які відрізняються за генетичною і структурною організацією розподілу в тканинах і функціями.

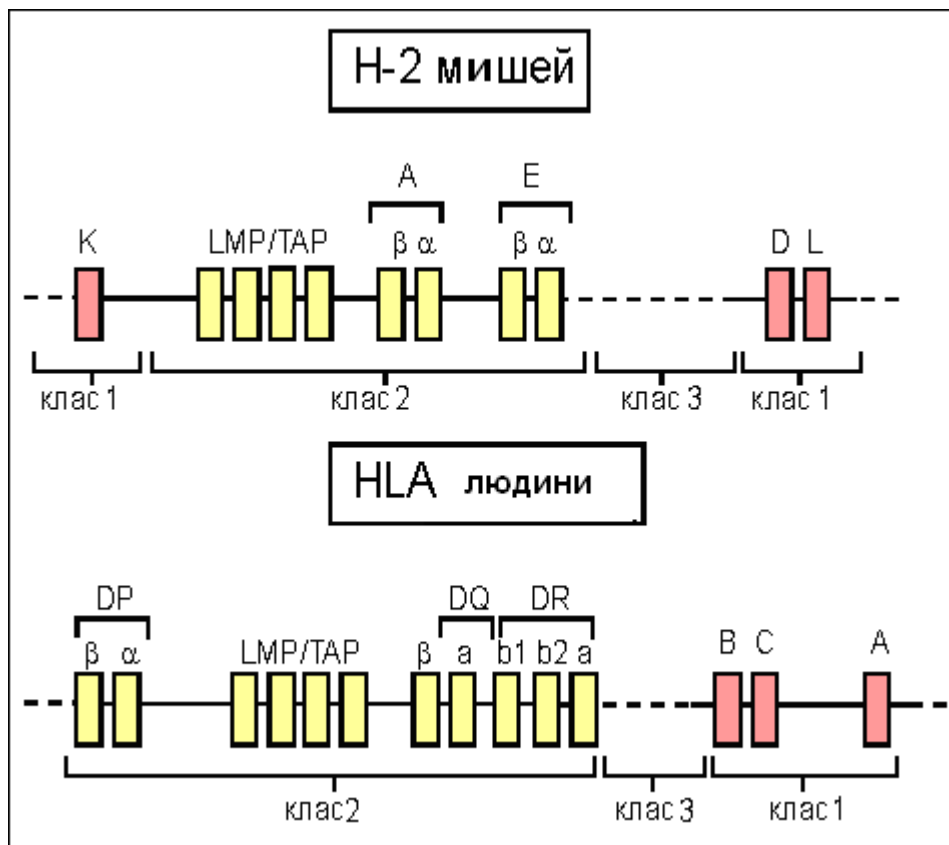


Рисунок 6.1.4 - Геномна організація головного комплексу гістосумісності у мишей і людини.

Слід зазначити, що на тому ж кінці хромосоми розміщені і гени, які кодують еритроцитарні системи груп крові P, Chido Rogers, малікензим (ME-1), фосфоглюкомутаза-3 (PGM3), супероксидісмутаза (SOD-2), пепсиноген5 (PG5), гліоксалазу (GLO), пропердин-фактор, компоненти комплементу(C2,C4,C8) і інші.

Насьогодні визначені і вивчені три класи антигенів гістосумісності:

Антигени (HLA) класу I - необхідні для розпізнавання трансформованих клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами. Антигени I класу експресовані на поверхні усіх адровміщуючих клітин і тромбоцитів.

Антигени (HLA) класу II – забезпечують взаємодію між Т-лімфоцитами і макрофагами. Антигени II класу присутні на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і на дендритних клітинах.

Комплекс МНС класу III, розміщені в межах групи генів МНС, або тісно зчеплені з нею, контролюють деякі компоненти комплементу: C4 і C2, а також фактор В, який в більшості представлений у плазмі крові а не на поверхні клітин.

6.2 Молекулярна структура антигенів МНС

Методами рентгеноструктурного аналізу з'ясована структура HLA молекул I II класів і просторова організація молекул МНС (рис. 6.2.1.).



Рисунок 6.2.1 - Структурна організація молекул I та II класів системи HLA

Молекули головного комплексу гістосумісності I класу являють собою гетеродімери, які складаються з двох поліпептидних ланцюгів: важкого – альфа-поліпептидного (46кD) і легкого β -поліпептидного ланцюга (12кD). Важкий ланцюг вміщує близько 340 амінокислотних залишків і складається з внутрішньоклітинної частини, яка утворює три домени: альфа1-, альфа2- і альфа3, трансмембранного сегменту і цитоплазматичного *хвістового домену*. Кожний зовнішньоклітинний домен вміщує 90 амінокислотних залишків, які можна відділити від клітинної поверхні шляхом обробки папаїном. Два зовнішні домена (α_1, α_2) містять сахаридні ланцюги і характеризуються поліморфністю, що складає саме відмінності між молекулами MHC I класу, які походять від різних осіб і кодовані різними алелями. Третій зовнішньоклітинний домен (α_3) як і два інших теж утворює петлю і знаходиться ближче до клітинної мембрани і подібно до β_2m , з яким він зв'язаний, нагадує будову ділянки тяжких ланцюгів антитіл. Він не має поліморфності. Тяжкий ланцюг кодується 8 екзонами. Перший екзон кодує сигнальну послідовність, що усувається ще в плазматичній сітці. Другий,

третій і четвертий екзони кодують домени від $\alpha 1$ до $\alpha 3$, а екзони з п'ятого по восьмий – внутрішнемембранні і внутрішньоклітинні відрізки. У клітинній мембрані молекули МНС I класу можуть утворювати тетраметри (α і 4 $\beta 2m$), що сприяє полегшенню хрестоподібному зв'язуванню ТСР-рецепторів, які розпізнають презентовані через них антигени. Легкий β -ланцюг являє собою $\beta 2$ -мікроглобулін, який складається з зовнішньоклітинного домену, який вміщує 100 амінокислотних залишків, є продуктом гена, який локалізовано на 15 хромосомі, і приймає участь в реалізації функції молекул I класу. $\beta 2$ -мікроглобулін не має трансмембранної ділянки і утримується на мембрані за рахунок нековалентного зв'язку з альфа3-доменом. Він легко видаляється з клітини і його визначення в крові і сечі використовується для діагностики певних захворювань. Встановлено, що у молекул I класу домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$ збудовані з однієї меліси α і чотирьох стрічок β . Разом вони утворюють рівчак, дно якого становить структура гофрованого аркуша, який складається з восьми протибіжних стрічок β , а його краї утворені обома гелісами α . Цей рівчак міститься на $\beta 2$ мікроглобуліні і домені $\alpha 3$, які знаходяться між ним і клітинною мембраною. Власне цей рівчак є місцем є місцем локалізації Т-пептидів (антигенів), презентованих Т-лімфоцитами. Рівчак вміщує шість заглиблень, які називають кишнями. У ці кишні входять бокові ланцюги амінокислот антигену, презентованого молекулою МНС. Амінокислоти, чий бокові ланцюги входять в ці кишні називають якірними. Конкретна молекула МНС потребує зв'язати в кишнях свого рівчака 2 – 3 якірні амінокислоти даного антигену, для ефективності його зв'язування і презентації Т-лімфоциту. Домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$, які утворюють даний рівчак, мають властивість розпізнаватись не тільки аутогенними Т лімфоцитами, але і чужорідними (галогенними) цитотоксичними Т-лімфоцитами, наприклад, у випадках відторгнення трансплантату

Молекули МНС II другого класу також складаються з двох ланцюгів α і β , які з'єднані між собою не ковалентними зв'язками. Ці ланцюги мають

подібну будову. Ланцюг α має масу близько 33 *kDa*, а ланцюг β близько 29 *kDa*. Зовнішньо клітинна частина (N-кінцева) в обох ланцюгах збудована з двох доменів. Короткий внутрішньо мембранний відрізок містить 23, а зовнішньо мембранний – 8 – 15 амінокислот. Зовнішні домени ($\alpha 1$ і $\beta 1$) утворюють ривчак, подібний до того, який утворюють домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$ важкого ланцюга молекул МНС I класу. Його дно теж утворюють вісім протибіжних стрічок β , а краї утворені двома гелісами α . Ривчак вміщує шість кишень. У ці кишені також входять бічні ланцюги амінокислот антигенів, презентованих молекулою МНС II. Поліморфність молекул МНС II класу обумовлюється переважно доменами $\alpha 1$ і $\beta 1$. Домени $\alpha 2$ і $\beta 2$ подібні до доменів стабільних ділянок тяжких ланцюгів імуноглобулінів. Молекули МНС II мають схильність до утворення димерів. До складу такого димеру входять два ланцюги α і два ланцюги β .

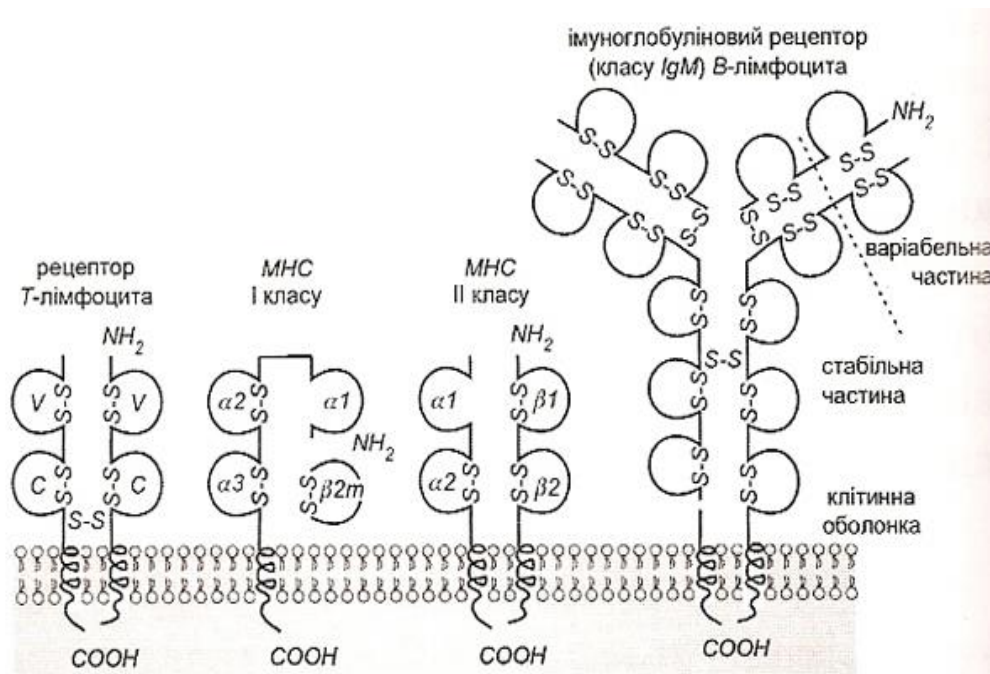


Рисунок 6.2.2 - Схематична структура молекул головного комплексу гістосумісності.

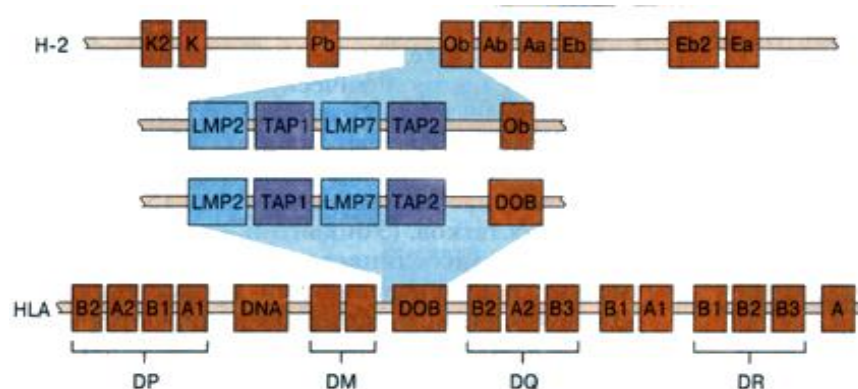
6.3 Структура генів і синтез молекул МНС

Головний комплекс гістосумісності як у мишей, так і у людини, містить в собі три групи генів:

- *гени, які контролюють молекули I класу* (H-2K, H-2D і H-2L у мишей і HLA-A, HLA-B, HLA-C у людини);
- *гени, які контролюють молекули II класу* (альфа- і бета-ланцюги молекул A і E у мишей і DP, DQ, DR у людини); до цієї ж групи генів відносяться LMP і TAP. Вони контролюють відповідні білки, які приймають участь в процесі утворення комплексу антигенного пептиду з молекулами МНС; Крім того, до регіону HLA-D відносяться гени [HLA-LMP](#) і [HLA-TAP](#). Низкомолекулярні белки, які контролюються даними генами, приймають участь в підготовці чужеродного антигену до [презентації](#) Т-клетинам.

Рис.

ГЕНИ МНС, ПРОДУКТИ ЯКИХ ПРИЙМАЮТЬ УЧАСТЬ В ПРОЦЕСІНГУ ТА ПРЕЗЕНТАЦІЇ АНТИГЕНІВ



Гени транспортних білків (TAP) та компонентів протеазом (LMP) росташованих у мишей в комплексі H-2, у людини - в комплексі HLA.

Рисунок 6.3.1 – Гени МНС, продукти яких приймають участь в процесінгу та презентації антигенів

- *гени III класу є відповідальними за синтез одного з компонентів системи комплементу, фактора некроза пухлин-альфа і -бета, ферментів, які приймають участь в синтезі гормонів.*

Успадкування генетичної варіабельності ознак на рівні специфічності системи HLA відбувається за кодомінантним типом.

Молекулярна організація областей генів I класу ГКГ

Гени I класу (миші і людини) складають мультигенні родини середнього розміру. Аналіз 9×10^5 космідних клонів, які представляють геномну бібліотеку лімфобластоїдної лінії людини LCL 721, виявив по меншій мірі 17 генів I класу. В геномі мишей лінії BALB/c виявлено 36 генів I класу. Як показує аналіз гібридизації по Саузерену, кількість генів I класу може варіювати у популяції.

Відомо 2 види генів I класу. Перший вид - так звані класичні гени I класу - який кодує трансплантаційні АГ. До них відносяться гени К, D, L локусів H-2 областей миші (17 хромосома) і А, В, С локусів HLA області людини (6 хромосома). Продукти цих генів експресовані на поверхні всіх ядровміщуючих клітин організму, причому гетерозиготи мають подвійний набір АГ. Трансплантаційні АГ мають великий, немає аналогії, поліморфізм. В лабораторних мишей знайдено по меншій мірі 56 алелей для локусу H-2K і 45 алелей для локусу H-2D. По попереднім оцінкам, в популяції диких мишей для цих локусів є не менше 100-200 алелей. Встановлено існування 20, 50 і 8 алелей для генів HLA-A, -B, -C, відповідно. Будь-яка дана комбінація на одній хромосомі визначає унікальний H-2- або HLA-гаплотип; теоретично можливе число гаплотипів дуже велике. Поліморфізм АГ гістосумісності визначає біологічну індивідуальність особини, і напевно, безпосередньо зв'язані з функціями цих молекул.

Другий вид генів I класу більш багаточисельний, ніж перший вид, і значно менш вивчений. В миші ці гени знаходяться на 17 хромосомі в області Qa-T1a, розташованій дистально до H-2 області. У людини частина цих, так званих неklasичних генів I класу, розташована на 6 хромосомі дистально до A-локусу, а частина – на інших хромосомах. Ряд неklasичних генів I класу кодують АГ, які характеризуються обмеженим поліморфізмом, обмеженим розподіленням в тканинах і невідомою функцією. Qa- і T1a-АГ миші виявлені тільки на гемопоетичних клітинах, причому деякі з них з'являються тільки на певних стадіях розвитку. Внаслідок мутації, яка торкається екзону 5(кодує трансмембранну частину молекули) деякі з цих АГ декретуються. У людини T1a-подібні АГ виявлені на деяких популяціях Т-лімфоцитів, Т-лейкемічних клітин і клітин островків Лангерганса. На відміну від ГКГ мишей, де виявлена висока гомологія в послідовностях між Qa-, T1a- і H-2 генами, між класичними і неklasичними генами I класу людини виявлено дуже значну різницю в нуклеотидній послідовності.

Для більшості неklasичних АГ I класу людини і миші в наш час невідомі ані типи клітин, ані стадії диференціювання, на яких може проходити їх експресія. Конститутивна експресія цих генів в трансформованих L-клітинах, можливо, дозволить провести виділення і дати характеристику цих генів і встановити їх біологічні функції.

Ряд генів ГКГ I класу, як класичні, так і не класичні являються псевдогенами. Ці гени мають високу гомологію по нуклеотидній послідовності з функціональними генами I класу, що свідчить про їх загальне еволюційне походження, однак, із-за накопичення мутацій вони стали дефектні по експресії. Перші 2 гени I класу HLA, для деяких була встановлена повна нуклеотидна послідовність, являються псевдогенами. Клон LN-11A має багато завчасних термінуючи кодонів і мутацію, яка викликає зсув рамки зчитування в порівнянні з послідовностями, які відповідають функціональним ексонам відомих функціональних генів. Клон

pHLA 12,4, напевно, також не може кодувати класичний АГ I класу із-за мутацій, яка викликає заміну цистеїну в положенні 164 на фенілаланін, що виключає можливість утворення структурно важливого дисульфідного зв'язку всередині другого позаклітинного домену.

Таблиця 6.3.1 - Гени HLA

Назва гена	Властивості
1	2
HLA-A	кодує ланцюг α I класу
HLA-B	кодує ланцюг α I класу
HLA-C	кодує ланцюг α I класу
HLA-E	
HLA-F	
HLA-G	
HLA-H	псевдоген
HLA-J	псевдоген
HLA-K	псевдоген
HLA-L	псевдоген
HLA-DRA	кодує ланцюг α DR
HLA-DRB1	кодує ланцюг β 1 DR
HLA-DRB2	псевдоген
HLA-DRB3	кодує ланцюг β 3 DR
HLA-DRB4	кодує ланцюг β 4 DR
HLA-DRB5	кодує ланцюг β 5 DR
HLA-DRB6	псевдоген
HLA-DRB7	псевдоген
HLA-DRB8	псевдоген
HLA-DRB9	псевдоген
HLA-DQA1	кодує ланцюг α DQ
HLA-DQB1	кодує ланцюг β DQ
HLA-DQA1	експресія невідома
HLA-DQB2	експресія невідома
HLA-DQB3	експресія невідома
HLA-DOB1	кодує ланцюг β DO
HLA-DMA	кодує ланцюг α DM
HLA-DMB	кодує ланцюг β DM
HLA-DNA	кодує ланцюг α DN

HLA-DPA1	кодує ланцюг α DP
HLA-DPB1	кодує ланцюг β DP
HLA-DPA2	псевдоген
HLA-DPB2	псевдоген
TAP1	кодує білок, який транспортує пептиди до цитоплазматичної сітки
TAP2	кодує білок, який транспортує пептиди до цитоплазматичної сітки
LMP2	кодує білок, подібний до протеаз
LMP7	кодує білок, подібний до протеаз

Регіон системи HLA, що охоплює гени молекул МНС I класу, містить гени тяжких ланцюгів, HLA - A, B, C. Натомість, ділянка D, що містить гени для молекул МНС II класу, має більш складну структуру (рис. С.112). У цій ділянці знаходяться гени як для α –ланцюгів, так і для β -ланцюгів молекул МНС II класу. Два близько розташовані гени кодують ланцюг α *HLA-DP* і два гени кодують ланцюг β *HLA-DP*, але – *DPA2* і *DPB2* є псевдо генами, тобто вони не підлягають транскрипції. У випадку **HLA-DQ**, хоча гени **DQA2** і **DQB2** не виглядають як псевдогени, але і досі не виявлено їх продуктів. З решти двох генів DQ, обидві є поліморфними. Оскільки у молекул МНС II класу ланцюг α кодований в одній хромосомі, може зв'язуватись з ланцюгом β , кодованим як в одній так і в другій хромосомі і навпаки, то в гетерозиготи щодо генів HLA-DQ можуть зустрічатися чотири різні молекули HLA-DQ.

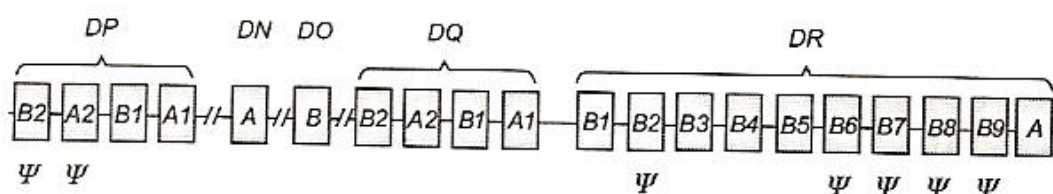


Рисунок 6.3.2 - Схема району D системи HLA. Літерою Ψ позначено псевдо гени (недіючі гени).

Відносно генів *HLA-DR* ситуація є складнішою, оскільки в хромосомі може бути дев'ять генів, які кодують ланцюг β від *DRB1* до *DRB9*. Ген *DRB2* і гени від *DRB6* до *DRB69* є псевдо генами. Нетиповим вважається той факт, що кількість генів *DRB* є різною і із них гаплотипів. Це призводить до того, що змінюється кількість варіантів молекул *HLA-DR* у однієї особи. За певних умов можуть з'явитись нетипові молекули МНС II класу шляхом зв'язування ланцюгів *-DR* α з *-DR* β . У ділянці *D* знаходяться також гени для вказаних білків, які транспортують пептиди, які потім зв'язуються з молекулами МНС I класу. Встановлено, що поліморфність генів МНС, які кодують молекули II класу стосуються також і промоторів, що може привести до формування алельних відмінностей рівня тканинної експресії цих молекул.

Для ідентифікації генів I класу були широко використані системи трансфекції – експресії генів. Гени I класу трансфікували за допомогою Са-фосфатної преципітації в присутності маркера-гена тимідинкінази в мішені, Ltk^- клітини, які дефектні по ендогенній тимідинкіназній активності. Клітини, в яких з'явилися tk^+ -фенотипи піддаються селекції за допомогою середовища ГАТ. Експресію трансфікованих генів знаходили за допомогою АТ, які розпізнають АГ-клітинні поверхні. В наш час за допомогою цього підходу вдалося ідентифікувати і структурно охарактеризувати ряд генів I класу людини (*HLA-A₃*, *-A₂*, *-A₂₄*, *-B₇*, *-B₂₇*, *-B_{w58}*, *-C_{w3}*) і миші (*H-2K*, *D*, *L*, *Tla*, *Qa=23*).

Особливістю молекулярної організації генів I класу миші на хромосомах являється їх розташування у вигляді кластерів близько розташованих генів, які виявляються при клонуванні в космідах. Шляхом аналізу 250000 космідних клітин (клонів), які представляють повну геномну бібліотеку мишей лінії BALB/c за допомогою проб кДНК, специфічних для 5'- і 3'-кінцевих ділянок генів I класу, виділено 64 космідних клони з вставними ДНК 32-46 т.п.о. Аналіз рестрикційних карт ДНК-вставок в цих

клонах дозволив виявити 13 кластерів з розмірами від 35 до 191 т.п. основ, які включають від 1 до 7 генів I класу. В загальній складності ці кластери включають 36 генів I класу і покривають ділянку ДНК протяжністю 837 т.п.н., що відповідає значній частині хромосоми, яка займає області H-2 і Tla, причому до 80% було карбовано в області Tla. Метод “проходження по хромосомі”, який використовується в цьому аналізі, дозволив скласти попередньо карту локалізації генів I класу миші на 17 хромосомі (рис. 6.3.3).



Рисунок 6.3.3 - Схема генетичної карти головної системи гістосумісності миші

На відміну від миші у людини всі неklasичні гени I класу розташовані на одній хромосомі, крім того, ці гени розташовані на значному віддаленні один від одного, і при клонуванні в космідах лише в деяких випадках один клон містить більш одного гена. Із-за цього в наш час вдалося скласти приблизну карту локалізації лише класичних генів I класу: центроміра - HLA – B - HLA – C - HLA – A – тіломіра с відстанню B-C і C-A 0,1 сМ і 0,7 сМ відповідно. При цьому локус A включає 4 гени, один з них функціональний, на ділянці протяжністю 60 т.п.о., локус B – 2 гени (1-функціональний) на ділянці 40 т.п.о., локус C – мінімум 2 гени (1-функціональний). Більшість неklasичних генів I класу розташовані в напрямленні до тіломіри від A-локусу.

Точна локалізація цих генів буде зроблена, напевне, а найближчий час з використанням методу гель-електрофорезу в пульсуючому полі.

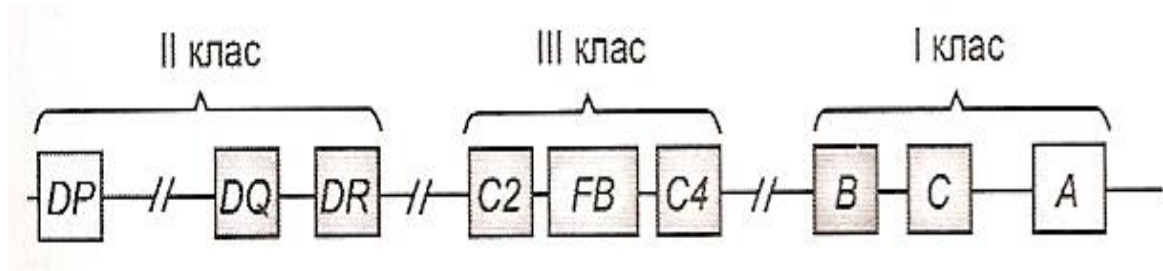


Рисунок 6.3.4 - Схема генетичної карти HLA системи гістосумісності людини

Структура генів I класу

В наш час встановлена структура наступних функціональних генів I класу миші: K^{β} , K^d , K^kL^d , $Qa(27,5)$, D^b , D^d і людини HLA- A_3 , $-A_2$, $-A_{24}$, $-B_7$, $-B_{27}$, $-B_{w58}$, $-C_{w3}$. Всі вивчені гени I класу мають близькі розміри (біля 5 тис. п.о.) і подібну екзон-інтронну організацію, яка в точності відповідає доменам трансплантаційних АГ. Внаслідок надзвичайно високої структурної гомології між неалельними генами I класу можливо описати загальну організацію генів I класу (мал.2). Додатково до екзону E_1 , який кодує сигнальний гідрофобний пептид розміром 20-24 залишки, є також 7 екзонів, з яких чотири – E_2 - E_5 – відповідають позаклітинним доменам α_1 , α_2 і α_3 і трансмембранній гідрофобній ділянці. Останні три екзони E_6 - E_8 кодують цитоплазматичну частину АГ I класу і 3'- нетранслюючу область (біля 420 п.о.) і трохи відрізняються у різних генів I класу.

Екзони E_6 - E_8 кодують цитоплазматичні сегменти всіх вивчених АГ гістосумісності миші, а також АГ HLA- A_3 , $-A_2$, $-A_{24}$, $-B_7$, $-B_{27}$, $-B_{w58}$, $-C_{w3}$. В генах B-локусу (HLA- B_7 , $-B_{27}$, $-B_{w58}$) цитоплазматична частина кодується

тільки двома екзонами E_6 і E_7 і екзон E_8 не використовується із-за наявності додаткового термінуючого кодона в інтроні 7. В двох охарактеризованих псевдогенах людини екзон E_8 містить тільки 3'-нетранслюючу послідовність, однак в гені рHLA-12, 4 частина цитоплазматичного кодона (перші 7 АК залишків) кодується п'ятим трансмембранним екзоном (іншими словами, в цьому гені відсутній інтрон між 5 і 6 екзонами).

Екзони і інтрони різних генів I класу по розміру практично однакові, за виключенням інтрона між екзонами E_3 і E_4 , який відрізняється по довжині у генів різних локусів. 3'-нетранслююча область складається з двох ділянок – високогомологічної послідовності довжиною 310 п.о. і повністю негомологічної послідовності розміром 110 п.о., які вміщують один або два сигнали поліаденілювання AATAAA. Елементи промотора відрізняються у різних генів I класу миші в якості компонентів промотора для РНК-полімерази II використовують послідовності TATAAA і CCAAT, розташовані на відстанях 30 і 50 п.о. від 5'-ділянки ініціації транскрипції (-30 і -50). В генах I класу людини використовують послідовності TCTAAA замість TATAAA і послідовність CCAAT, розташовані на таких же відстанях. Лише ген C_{w3} має повністю іншу структуру промотора: послідовність TCTGAA на ділянці -30 і послідовність CCAAT на відстані 118 (замість -50).

Наявність декількох екзонів, що кодують цитоплазматичну частину АГ гістосумісності, вказує на можливість альтернативних способів сплайсингу мРНК АГ I класу, аналогічних сплайсингу мРНК C_{μ} -генів імуноглобулінів. Ця ситуація добре вивчена у випадку генів I класу миші. Порівняння 3'-кінцевих послідовностей кДНК, які відповідають С-кінцевим ділянкам молекул Н-2L^d (клони рН-21 і рН-211), Н-2K^b (клон рН-202), Н-2D^b (клон рН-2^d-1) і гена 27,5 припускає можливість, по крайній мірі, трьох способів сплайсингу мРНК (рис.6.3.6):

- 1). з вилученням інтрона 7, що приводить до включення цитоплазматичний доменів всіх трьох екзонів (pH-21, pH-2^d-1);
- 2). з збереженням інтрона 7 (pH-211). В цьому випадку екзон 8 не експресується, так як інтрон 7 вміщує термінуючий кодон;
- 3). з використанням акцепторного сайту, який знаходиться в інтроні 7 на відстані 27 нуклеотидів від акцепторного сайту, який використовується в гені H-2L^d. Це приводить до збільшення розміру екзона 8 за рахунок його подовження з 5'-кінця, як це має місце в генах H-2K (pH-202).

Аналіз послідовностей кДНК, які представляють транскрипти I класу із T-лейкемічних клітинних ліній, виявив наявність транскриптів, що нагадують послідовності HLA-A₂₄, але відрізняються делецією послідовності, відповідному екзону 5. Оскільки даний екзон кодує трансмембранний сегмент, його делеція корелює з наявністю значної кількості розчинного АГ A₂₄, який продукується даною клітинною лінією. З бібліотеки кДНК мишей лінії SWR/1 (галотип q) виділені клони кДНК в яких відсутній екзон 5. Відповідні мРНК також могли б кодувати розчинні форми трансплантаційних АГ. Можливо, що сплайсинг приводить до утворення таких мРНК, проходить таким же чином, як і у імуноглобулінових мРНК, коли одному і тому ж гену відповідають 2 різні з С-кінцевої частини поліпептидних ланцюги – секретуєма і мембранна форми H-ланцюга.

Допускається, що С-кінцева гетерогенність молекул трансплантаційних АГ і кодування цитоплазматичного домену трьома екзонами зв'язані зі структурним і функціональним підрозділом цієї частини молекул, необхідними для здійснення різних ефекторних функцій. На користь цього припущення свідчать також дані про специфічне фосфорилування різних ділянок цитоплазматичного домену АГ I класу.

Поліморфізм генів I класу

Як вже відмічалось, висока ступінь поліморфізму являється рисою, за якою відрізняються класичні АГ I класу. Для кожного локусу H-2 і HLA ідентифіковано багато алелей, і всі ці алелі проявляються в популяції з високою частотою. Аналіз АК послідовності, отриманої прямим секвенуванням білків або через нуклеотидну послідовність, дозволив виявити варіабельність АК послідовності для декількох серологічно визначених алелей K і D локусів H-2 комплексу і A, B, C локусів HLA-комплексу. Аналіз показує, що різниця між алелями менша, ніж між продуктами різних локусів. Так, порівняння повних послідовностей трьох алелей A-локусу (A_3 , A_2 , A_{24}), трьох алелей B-локусу (B_7 , B_{27} , B_{w58}) і одного алеля C-локусу (C_{w3}) виявляє наступні розходження в послідовностях: A/A (7-8,8; середнє 8,2%); B/B (8,9-11,5; середнє 9,7%); A/B (13,8-18,5; середнє 16%); A/C (17,3-19,6; середнє 18,6%); B/C (14,3-15,8; середнє 15,2%). Порівняння всіх послідовностей АГ I класу виявляє високу варіабельність в перших двох позаклітинних – α_1 і α_2 – а також в трансмембранному і цитоплазматичному доменах. Якщо порівнювати тільки алелі, то варіабельність спостерігається переважно в α_1 і α_2 доменах. За допомогою дослідів по трансфекції рекомбінантних генів показано, що етапи які розрізняються алло-антитілами, локалізовані переважно в цих двох доменах. В середині α_1 і α_2 доменів є ділянки підвищеної варіабельності: між АК залишками 62-80, 91-99, 153-160, 193-198, а також високо консервативні ділянки 13-62, 117-143. Розташування цих гіперваріабельних і консервативних ділянок приблизно однакове у антигенів I класу різних видів тварин. За допомогою синтетичних пептидів показано, що гіперваріабельні ділянки вміщують алло-антигенні детермінанти.

В доповнення серологічного поліморфізму існує поліморфізм, який не виявляється антитілами, однак визначаються цитотоксичними Т-лімфоцитами або за допомогою біохімічних методів. Такий поліморфізм описаний для антигенів HLA- A_2 , - B_{27} , H-2K^b. Встановлено, варіантні K^b-

молекули вміщують амінокислотні заміни у вказаних вище гіперваріабельних ділянках α_1 і α_2 доменів.

Як слідує з вищенаведеного, аналіз АК послідовності підтвердив, що алелі, які серологічно визначені, являються генетичними алелями. Цей висновок підтверджується також аналізом нуклеотидної послідовності, що примикає до генів I класу. Так, різниця нуклеотидної послідовності між генами, які кодують серологічні алелі А-, В-локусів, лежить в діапазоні 3-5%, в той час, як різниця між генами, які належать різним локусам, складає 12-18%. Крім того, рестриктні корти фланкіруючих ділянок генів, які кодують серологічні алелі, також виявляють високу ступінь гомології, що характерно для істинних алелей. Різниця в нуклеотидній послідовності між генами В- і С-локусів (12,2% між B_7 і C_{w3}) менша, ніж між генами А- і В-, А- і С-локусів (17,3% між A_3 і B_7 ; 16,5% між A_3 і C_{w3}). Це знаходиться у відповідності з генетичною спорідненістю В- і С-генів, що може відображати близьке еволюційне взаємовідношення. Порівняння гомології послідовностей між екзонами і інтронами різних генів I класу HLA показує, що різниця в послідовності між інтронами лише на декілька процентів переважає різницю між екзонами, як між алелями, так і в випадку генів різних локусів. Наприклад, у випадку алелей А-локуса різниця між екзонами складає 3,2%, а між інтронами – 4,9%; при порівнянні генів, які належать трьом локусам (A_3 , B_7 , C_{w3}) різниця між екзонами складає 13,3%, а між інтронами – 15,4%. Різниця між інтронами Н-2-генів обумовлена нуклеотидними замінами і делеціями розміром від 1 до 20 п.о. Якщо приймати до уваги тільки нуклеотидні заміни, то гомологія інтронів >90%. Як вже відмічалось, перші 310 п.о. 3'- нетранслюючих ділянок також високогомологічні (96-98% гомології). Таким чином, висока консервативність некодуючих послідовностей характерна для генів I класу. Висловлено припущення, що гомологія послідовностей інтронів служить основою гомологічних

рекомбінацій між неалельними членами мультигенної родини, що забезпечують генерацію поліморфізму всередину родини генів ГКГ.

Існування великої мультигенної родини, яка проявляє високу ступінь гомології послідовності між неалельними членами родини, і в той же час надзвичайно високий поліморфізм, по крайній мірі в ряді локусів, представляється не перший погляд парадоксальним. Цю трудність можливо подолати, допустивши існування генетичного механізму, що включає одночасний обмін блоками нуклеотидних послідовностей, в доповнення до дії механізму випадкових точкових мутацій, який буде вести до неалельного розходження послідовностей. В такому випадку, якщо обмінювана послідовність буде або розміром рівною або перевищувати розмір гена, це буде приводити до підвищення гомології між різними локусами. Якщо ж одинична обмінювана структура по розмірам менша гена, це приведе до утворення мозаїчних генів, що приведе до поліморфізму.

Можливі слідуючи генетичні механізми, які включають обміни блоків нуклеотидів в родині генів I класу. ГКГ: нерівний кросинговер, гомологічні рекомбінації і міжгенна конверсія. Механізм нерівного кросинговеру зміг брати участь в обміні послідовностями в еволюції генів I класу. Міжгенні обміни цього типу можуть викликати збільшення або зменшення кількості генів. Є прямі молекулярні докази різниці кількості генів I класу в різних гаплотипах мишей, а також попередні дані про популяційну різницю кількості генів I класу. Взаємозв'язок, що спостерігається, між гомологією послідовності неалельних генів і їх хромосомним оточенням знаходиться у відповідності з участю механізму нерівного кросинговеру. Такі міжгенні обміни послідовностей можуть відповідати за гомологію послідовностей між неалельними генами. Є докази участі гомологічної рекомбінації в еволюції гена A_{w69} . Аналіз нуклеотидної послідовності показує, що гомологічна рекомбінація між генами A_2 і A_{w68} в положенні між другим екзоном і другим

інтроном веде до утворення *in vivo* гібридного гена (A_{w68}), який нагадує A_{w68} на 5'- кінці і A_2 на 3'- кінці.

Детальний аналіз замін нуклеотидів в послідовностях генів I класу ГКГ показує, що ці заміни розподілені нерівномірно, а кластиризуються в певних ділянках E_2 і E_3 екзонів, співпадаючих, як правило, з декількома ділянками гіперваріабельності АК послідовності. В генах I класу HLA найбільш суттєвою такою ділянкою являється ділянка, яка кодує АК залишки 76-83. В цій області послідовність A_{24} унікально відрізняється від других послідовностей A-локуса, маючи 8 замін, які на 21 основу (4 в першому положенні і 4 в другому положенні кодона), які ведуть до 7 замін АК залишків в області 76-83. В точності ця послідовність є в алелях B-локуса B_{w58} і B_{w27k} і в псевдогені $pHLA$ 12,4. Інші випадки кластеризації нуклеотидних різниць між алельними генами A- і B-локусів включає області 2-го і початку 4-го екзонів, кодуючи відповідно, АК залишки 62-74 і 276-286. Ці дані вказують на наявність міжгенної конверсії, яка веде до поліморфізму шляхом переносу блоків послідовностей. Свідчення на користь цього механізму було отримане також при вивченні генів I класу *mt* 1 – мутантів миші. Мутація *mt* 1 приводить до заміни послідовності $Arg^{155} - Leu^{156}$ (ACA-CTC) на $Tyr^{155} - Tyr^{156}$ (TAT-TAC), тобто потребують одночасну заміну п'яти основ підряд. Послідовність $Tyr^{155} - Tyr^{156}$ знайдена в тому ж положенні в молекулі H-2L^d. АК заміни у багатьох інших *mt*-мутантів – це також кластеризовані заміщення, які потребують багатьох замін основ, причому ці кластеризовані заміни можуть бути знайдені в тих же положеннях в інших молекулах I класу. Відомо, що тільки гени, гомологічні один одному можуть обмінюватися ДНК за допомогою механізму конверсії. Так як родина генів I класу ГКГ вміщує 20-40 генів, володіючих високим ступенем гомології як в кодуючих, так і в некодуючих областях, ймовірність участі механізму конверсії генів дуже значна. Джерелом нової інформації можуть служити неалельні гени I класу, включаючи псевдогени. Той факт, що кластеризовані

заміни основ в генах I класу спостерігаються тільки в екзонах, припускає участь мРНК в процесі генетичного обміну.

Слід відмітити, що консервативність АК послідовності α_3 домену згоджується з особливостями мутацій в E_4 -екзоні. Порівняння частоти мутацій в кожному із трьох положень кодонів показує, що в 4 екзоні мутації проходять переважно в третьому положенні: 51,7% замін в E_4 -екзоні при порівнянні алелей А-локусу і 77,4% замін в E_4 -екзоні при порівнянні всіх алелей. В інших екзонах заміни розподілені рівномірно. Оскільки заміна в третьому положенні в $\frac{3}{4}$ випадків веде до консервації АК залишка, заміна в 3 положенні в E_4 -екзоні згоджується з консервативністю амінокислотної послідовності в α_3 -доміні, який бере участь у взаємодії з неполіморфним легким ланцюгом і являється результатом дії механізму негативної селекції.

Молекулярна організація I- і D-областей ГКГ миші і людини

Гени, що кодують антигени II класу (Ia-антигени), розміщені в I-області H-2комплексу і D-області комплексу HLA. На відміну від генів I класу, гени, що кодують обидві субодиниці антигенів II класу (α і β), входять до складу ГКГ та відносяться до II класу).

На основі рекомбінаційного аналізу конгенних ліній мишей I-область ділиться в наш час на два локуси – I-Ф і I-Е, які кодують добре вивчені високо поліморфні антигени II класу і скорочено позначаються як А- і Е-молекули. Ці молекули знайдені на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і дендритних клітин лімфоїдних органів. В останній час отримані прямі докази того, що Ia-антигени виконують свою функцію шляхом прямого зв'язування антигену і утворення на поверхні клітин молекулярного комплексу, котрий потім розпізнається Т-клітинами за допомогою відповідного рецептора.

Аналіз по Саузерну геномних ДНК миші за допомогою проб к днк, показав, що гени II класу утворюють невелику, в порівнянні з генами I класу, родину. В геномі мишей BALB/c відкриті тільки два гена α -ланцюгів і шість

генів β -ланцюгів. Для визначення розміщення генів в I-області був використаний метод “проходження по хромосомі” (9). За допомогою цього методу були виділені 19 космідних клонів, які перекриваються.

На рис.15 представлена структура досліджуваної ділянки її співставлення з генетичною картою I-області. Всього наділянці знайдено 8 генів: $A_{\beta 3}$, $A_{\beta 2}$, A_{β} , A_{α} , $E_{\beta 1}$, $E_{\beta 2}$, $E_{\beta 3}$, E_{α} . Приблизно в середині клонованої області знаходиться ген E_{α} , який був картирований в субрайоні I-E. Аналіз первинної структури гена $A_{\beta 2}$ показав, що кодуючи їм амінокислотна послідовність дуже близька послідовності домену β_2 . В даний час невідомо чи є ці гени, а також ген $E_{\beta 3}$ функціональними.

В результаті “проходження по хромосомі” між генами $E_{\beta 1}$ і E_{α} не були знайдені послідовності, які відповідають локусам I-B і I-J, котрі раніш постулювались в I-області на основі серологічних даних. Єдина не досліджувана ділянка ДНК, яка могла б містити відповідні гени, знаходиться на 3'-кінці гена $E_{\beta 1}$. Однак, приймаючи до уваги розміри цієї ділянки (3,4 т.п.о.), таке припущення маловірогідне. Можливо, гени I-J знаходяться поза I-областю, а їх експресія знаходиться під контролем регуляторного елемента, який кодується в цьому ж ферменті.

HLA-D область як мінімум в три рази перебільшує розмір I-область і побудована складніше: вона містить чотири локуси – DP, DZ/DO, DQ і DR, причому кожен локус містить як мінімум 1 α - і 1 β -ген. Ця карта не являється заключною, і подальші дослідження можуть внести зміни до її складу. Крім того, знайдені розходження в D-області в популяції. Встановлено, що DR-локус відповідає E-локусу, DQ – A-локусу. DP-локус не має аналогів в H-2 комплексі. Продукти DZ/DO-локуса в даний час не ідентифіковані.

Найбільш вивченим локусом є HLA-DP, що займає 100 т.п.о. і містить дві пари α/β -генів, α - і β -гени організовані в орієнтації голова до голови, причому відстань між промоторами двох експресуємих генів $DP_{\alpha 1}$ і $DP_{\beta 1}$ складає всього 2 т.п.о. (8”). Ці гени були секвеновані і детально вивчені. $DP_{\beta 1}$

ген має типову структуру генів II класу. Існують данні про різні способи сплайсингу цих генів в різних гаплотипах, які ведуть до різних цитоплазматичних доменів. Функція цитоплазматичних доменів невідома. Два інших гени $DR_{\alpha 2}$ і $DR_{\beta 2}$ – мабуть, являються псевдо генами .

Дуже мало конкретної інформації існує про область DZ/DO. До цих пір, за даними гель-електрофорезу в пульсуючому полі, локалізовані два гени - DZ_{α} і DO_{β} . Цей метод також показав, що DZ_{α} -ген зчеплений з DP-областю, а DO_{β} - DX-DQ. Додатковим доказом того, що DO_{β} -ген локалізований між DP і DQ є те, що мишиний ген II класу I-A $_{\beta 2}$, з котрим він найбільш гомологічний, локалізован між I-A $_{\beta 3}$ і I-A $_{\beta 1}$. Встановлено також, що відстань між генами досягає декількох т.п.о. Це означає, що ці два гени не являються парою α/β . Дійсно, показано, що ці два гени експресуються незалежно один від одного.

Область DQ, як і DP, містить дві пари α/β -генів. Існує припущення, що вони розміщені в послідовності: центромера DX-DQ, DQ_{α} - і DQ_{β} -гени відповідають послідовностям мряк, які експресуються, однак до сих пір відсутні докази експресії другої пари - DX_{α} і DX_{β} .

DR-область була досліджена рядом груп (89, 80, 95). В більшості галотипів мається два експресованих DR_{β} -гени і декілька псевдо генів і тільки DRI має один експресуємий ген (81). Один DR_{β} -ген відповідає серологічно визначеному DR-типу (DRI-14), а інший – типам DR_{w52} і $w53$. Охарактеризовані два псевдо гени, один з яких складається з окремого β_1 екзона, який трохи відрізняється від DR_{β} , однак ідентифікується як DR_{β} по фланкуючій послідовності. Ці псевдогени можуть виступати в якості донорів при конверсії генів і, таким чином, не є повністю нефункціональними.

Структура генів II класу

В даний час повністю або частково встановлена структура наступних генів II класу миші: A^d_a (97), A^k_a (98), A^d_{β} (99,100), A^k_{β} (99), A^b_{β} (78, 99), E^d_a (101), E^k_a (102), E^d_{β} (103), - і людини DP_a (104, 105), DZ_a (105), DQ_a (92, 93,

104, 105), DQ_{β} (90,91), DR_a (106), DR_{β} (80, 81, 84, 107-109). Як і в випадку генів I класу, екзон-інтронна організація генів II класу повністю відповідає доменній організації білків.

Аналіз нуклеотидної послідовності α - і β -генів підтверджує відповідність генів DR і DQ локусів людини генам E та A локусів миші.

Як вже було відмічено, α -гени значно розрізняються по ступеню поліморфізму. Відносно механізмів генерації поліморфізму, то в даний час існує багато даних про існування обміну генетичною інформацією між алелями одного або різних локусів II класу за допомогою гомологічного кросингверу або конверсії генів (112-115). Вважається, що основним механізмом генерації поліморфізму DR алелей вважається міжгена конверсія.

Запропонована схема еволюції α - і β -генів, згідно якої первісна дуплікація або дуплікації привели до утворення як мінімум 4 α -генів, які в результаті дивергенції привели до 4 локусів DP, DZ/DO, DQ і DR. Дуплікації, що пройшли пізніше привели до розділу $DPa1/a2$ і DXa/DQa . Приблизно в той же час йшла і дуплікація β -генів, у вигляді пар α/β , як припускається для DXa/β і DQa/β . Наступні дуплікації β -генів привели до різних β -генів. Порівняння карт D-області і I-області показує, що вони подібні, з урахуванням делеції у миші області $DPa-DZa$.

Відносно генів, які кодують молекули МНС III класу людини, відомо, що вони є теж поліморфними. Деякі алелі генів однакові у людини, шимпанзе і горіли.

Дисбаланс алель них зв'язків HLA (linkage disequilibrium).

Це явище на сьогодні є нез'ясованим. Якщо алель x гена A поширений в гаплотипах даної популяції з частотою 10%, а алель B – з частотою 20%, то легко підрахувати, що приблизно в 2% гаплотипів будуть присутні обидва

олелі. Однак комбінації певних алелей у більшості випадків є не випадковим. **Різниця між очікуваною і реальною комбінацією даних алелей і називають дисбалансом зв'язків.**

Таке не випадкове поєднання алелів двох різних генів може бути додатнім, або від'ємним. Це явище може стосуватися не тільки двох, але і багатьох алелів цих сусідніх генів. Інколи це явище називають „розщепленим гаплотипом”. Прикладом може бути комбінація алелів, що кодують молекули *HLA-A1*; *-B8*; *-DR3*. Цей гаплотип представлений найчастіше у кавказькій популяції. Він часто співпадає з делецією генів *C4A* та *21 OXA* і алелем s- фактора *B*.

Частота появи алеля *HLA*A0101* важкого ланцюга *HLA-A1* становить близько 16%., а алеля *HLA*B0801* важкого ланцюга *HLA-B8* – близько 9%.

Припускають, що у випадку дуже близько розташованих генів дисбаланс з'єднання може виникати з того, що алелі ще не „перемішалися” в популяції, якщо вони пізно з'явилися у розвитку виду. Але в багатьох випадках немає підстави для такого ствердження.

Слід зазначити, що особи з молекулами специфічності **HLA-A1, -8, -DR3**, які кодовані генами з сильним додатнім дисбалансом, частіше від інших страждають аутоімунними захворюваннями. **Цей факт підтверджує що продукти МНС класу II мають вирішальне значення в патогенезі аутоімунних захворювань.** В зв'язку з цим, проводяться наполегливі спроби зв'язати аутоімунні хвороби з генами імунореактивності, які контролюють відповідь на відповідний аутоантиген або на будь-який можливий етіологічний агент. Можливо цей факт розглядати з позицій феномену генетичної рестрикції, коли в результаті спільності окремих епітопів антигенів **HLA** -комплексу з одного боку і деяких вірусів і мікробів з іншого (феномен мімікрії) не розвивається імунна відповідь на ці збудники. В інших випадках, навпаки, в основі патології може бути трансформація окремих епітопів **HLA** при її взаємодії з антигенами збудників, в результаті

чого відбувається імунна відповідь проти особистих HLA антигенів, що призводить до розвитку аутоімунних процесів. Дані механізми не є єдиними для асоціацій між алелями MHC і захворюваннями людини. Так, гени MHC класу II виконують функцію генів імунної відповіді: їх продукти мають різну властивість зв'язування того чи іншого антигену, що і визначає характер імунної відповіді на антиген – від патологічно високого до повної відсутності.

6.4 Сучасні методи типування системи HLA

HLA-діагностика або тканинне типування – це дослідження головного комплексу гістосумісності людини на рівні специфічності антигенних структур або алельних генів. В попередніх розділах ми докладно розглянули сучасні уявлення відносно молекулярної структури і геномної організації ГКГС, а також головної фізіологічної функції системи HLA – генетичної регуляції імунної відповіді. Тому, в галузі прикладної імуногенетики, ідентифікація ізольованих специфічностей має велике значення для багатьох клінічних дисциплін, зокрема для трансплантології, трансфузіології і гематології, для диференційної діагностики ризику реалізації генетичної схильності до патологічного процесу на рівні різних нозологічних форм захворювання, для акушерства і гінекології в аспекті репродуктивної функції організму.

Тобто, за допомогою HLA-діагностики можливо вирішувати різноманітні завдання - біологічна ідентифікація (HLA-тип успадковується разом з генами батьків), визначення спадковості до розвитку певних захворювань, асоційованих з генами головного комплексу гістосумісності (хвороба Бехтерева, цукровий діабет, циліакія, розсіяний склероз та інші), а також діагностика деяких форм безпліддя, пов'язаних з особливостями HLA-антигенів подружжя. HLA- діагностика застосовується з метою підбору

донорів для пересадки органів та тканин - при цьому проводиться порівняння результатів HLA-типуювання тканин донора і реципієнта.

HLA-типуювання передбачає ідентифікацію специфічності антигенів і аналіз поліморфізму HLA-системи. Виділяють дві різні за принципом групи методів типуювання. Серологічний, клітинний та біохімічний методи характеризують продукти головного комплексу гістосумісності (ГКГ) — молекули, експресовані на мембрані клітини. Методи другої групи — молекулярно-біологічні — визначають алелі HLA безпосередньо з геномної ДНК. У клінічній практиці HLA-типуювання найбільш розповсюджені серологічний та молекулярно-біологічні методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR-polymerase chain reaction).

Серологічні методи.

Відомо, що ГКГ охоплює багато генів, які відрізняються найбільшою поліморфністю з дотепер відкритих. Знання будови і функції молекул МНС є умовою розуміння перебігу імунної відповіді. Молекули ГКГ є глікопротеїнами. Розрізняють молекули головного комплексу гістосумісності I, II і III класів, відмінні як за будовою, так і за функцією. Молекули ГКГ I класу присутні на поверхні всіх ядерних клітин. Натомість молекули ГКГ II класу присутні переважно на В-лімфоцитах, макрофагах, дендритних клітинах, клітинах Лангерганса, клітинах епітелію тімусу та на активованих Т-лімфоцитах.

Для ідентифікації молекул (антигенів) HLA застосовують в основному серологічні і цитологічні методи. Серологічні методи полягають у виявленні молекул HLA на клітинах (переважно лімфоцитах) із застосуванням сироваток, що взяті в осіб, які не мають даних алелів HLA. Ці сироватки беруть у :

- жінок, які багато разів народжували;
- осіб, яким часто переливали кров;

- деяких реципієнтів алогенних трансплантатів;
- спеціально сенсibilізованих осіб.

Тепер для ідентифікації цих антигенів застосовують також моноклональні АТ.

Значним кроком у розвитку технології HLA-типування була заміна аглютинації лейкоцитів лімфцитотоксичним тестом з використанням кролячого комплекменту. Серологічні методи засновані на ідентифікації молекул ГКГ, експресованих на мембрані (а саме — їх епітопів), за допомогою специфічних антитіл. На практиці серологічне HLA-типування проводять на вилучених клітинних популяціях. Оскільки основними носіями антигенів ГКГ є лімфоцити, суспензію Т-лімфоцитів використовують для визначення антигенів I класу, а суспензію В-лімфоцитів - для визначення антигенів II класу.

З метою вилучення необхідних клітинних популяцій з периферичної крові людини використовують або центрифугування в градієнті щільності ($\rho=1,077$), або імуномагнітну сепарацію. Вважається, що перший спосіб в деяких випадках може привести до хибнопозитивних результатів. Другий спосіб є більш специфічним - при цьому більше 95% клітин залишаються

ЖИТТЄЗДАТНИМИ.

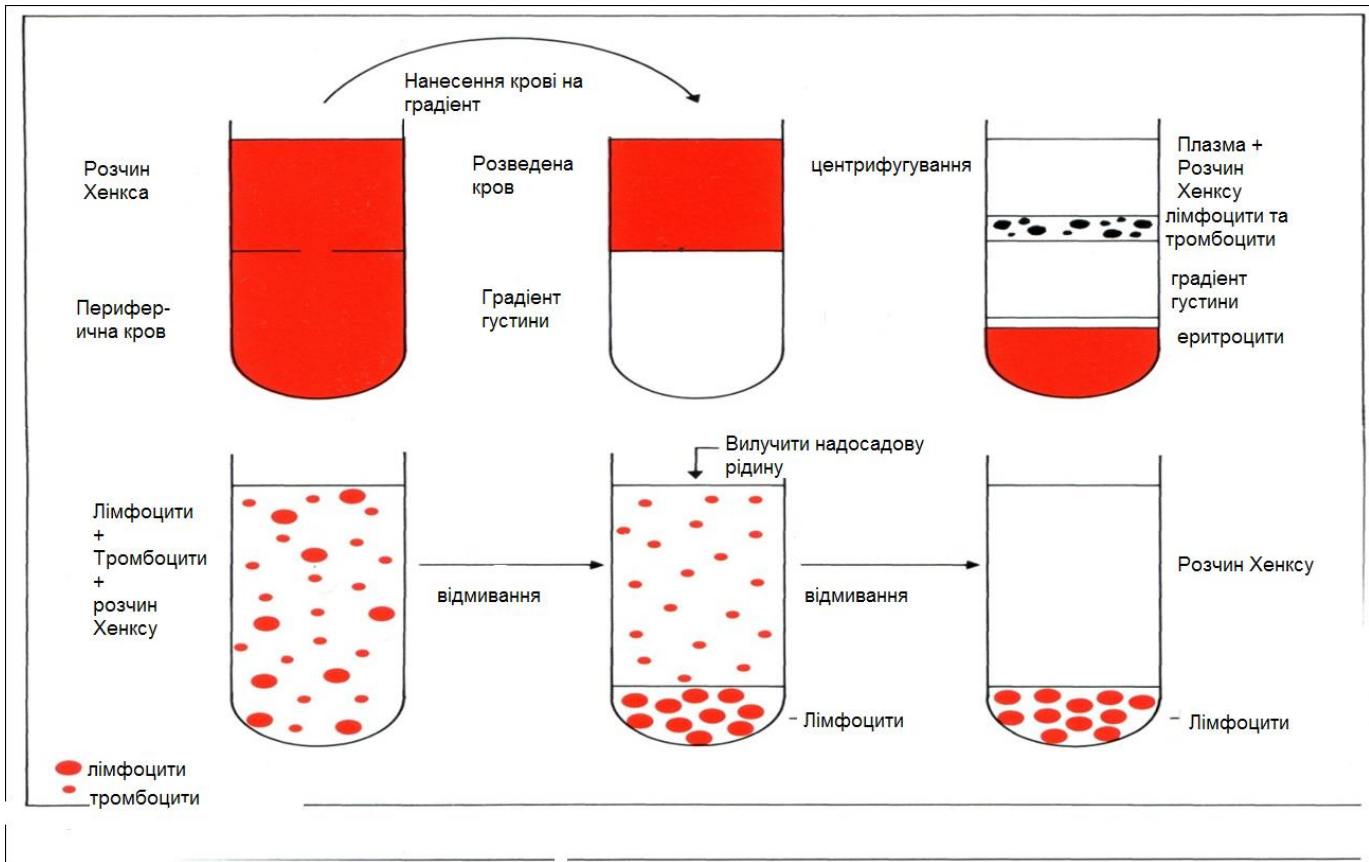


Рисунок 6.4.1 - Схема вилучення клітинних популяцій з периферичної крові людини за допомогою градієнта щільності.

Серологічні типи молекул HLA визначають у тесті комплементзалежного лізису лімфоцитів (КЛЛ), де живі клітини інкубують з панеллю сироваток, які містять специфічні антитіла до різних алельних варіантів антигенів HLA I або II класів антитілами, у присутності комплементу. В разі наявності відповідного серотипу (а саме — відповідної послідовності амінокислот в α -ланцюгах антигензв'язуючого регіону та відповідної її конформації) специфічне приєднання антитіл до зв'язаних з клітинною мембраною молекул HLA спричиняє локалізоване пошкодження оболонки лімфоциту.

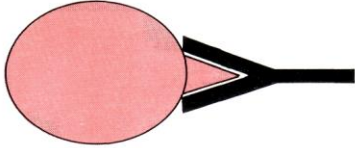
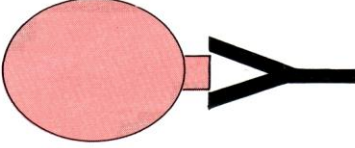
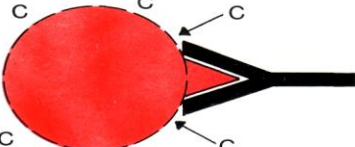
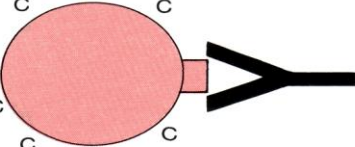


Етапи проведення КЛЛ тесту	Позитивна реакція	Негативна реакція
HLA-антисироватка (АТ) + суспензія лімфоцитів (АГ) (АТ-АГ реакція)		
Комплемент-залежний лізис клітин		
Еозин (фарбування клітин) + фіксація формаліном		

Рисунок 6.4.2 - Етапи проведення тесту комплементзалежного лізису лімфоцитів.

Молекули ГКГ II класу (HLA-DR, -DQ і -DP) ідентифікують у змішаній культурі лімфоцитів, оскільки вони стимулюють проліферацію лімфоцитів, які не мають антигенів, кодованих конкретними алелями. Таку проліферацію в основному стимулюють молекули HLA-DR.

Оцінюють КЛЛ-тест за допомогою флуоресцентної мікроскопії: позитивна реакція – червона флуоресценція, негативна реакція - зелена флуоресценція. При фазово-контрастній мікроскопії позитивну реакцію визначають за фарбуванням ядер загиблих клітин. Результат HLA- типування виводять з урахуванням специфічності прореагувавших сироваток та перехресно реагуючих груп антигенів, інтенсивності реакції цитотоксичності за стандартною 8-бальною шкалою.

Серологічне HLA-типування — це надійний і добре відтворюваний метод. Недоліком його є те, що він залежить від експресії молекули HLA на

мембрані клітини. Це стає на заваді типуванню при слабкій або зовсім відсутній експресії, наприклад при лікуванні кортикостероїдами. У пацієнтів з онкогематологічними захворюваннями, успадкованими дефектами диференціювання та визрівання клітин та хворих після терапії цитостатиками та/чи імунодепресантами відмічено зниження кількості, а то й повна відсутність клітин, необхідних для проведення КЛЛ. Ще одна проблема серологічного типування полягає в тому, що для багатьох алелів, визначених молекулярно-біологічними методами, не існує специфічних алоантитіл. Наприклад, з більш як 100 описаних HLA-DRB1 алелів тільки 18 визначаються серологічно, тобто мають відповідні серотипи.

2. Молекулярно-біологічні методи

Молекулярно-біологічні методи, або типування HLA з геномної ДНК чи РНК, створено завдяки виділенню генів I та II класу HLA на основі детального вивчення їхньої структури та визначенням послідовностей нуклеотидів алелей цього регіону. Сучасні молекулярні методи HLA-типування використовують стандартизовані специфічні зразки, які реагують не з антигенами на поверхні лейкоцитів, а з безпосередньо з ДНК і прямо вказують на те, які алелі присутні в пробі. Молекулярні методи не потребують живих лімфоцитів, будь-яка ядромістка клітина організму може слугувати матеріалом для аналізу.

Підґрунтям молекулярно-генетичного HLA-типування є метод ПЛР. На першому етапі використання методу слід вилучити геномну ДНК з цільної крові, лейкоцитарної суспензії, тканин. За другим етапом зразок ДНК копіюють - ампліфікують в пробірці з використанням праймерів (коротких одноланцюгових ДНК), специфічних до певного HLA-локусу. Кінці кожного з пари праймерів повинні бути абсолютно комплементарними унікальній

послідовності, тотожній конкретному алелю, у противному разі ампліфікація буде неможливою.

Після проведення ПЛР, в ході багатократного копіювання, виходить велика кількість фрагментів ДНК, яку можливо оцінити візуально. Для цього реакційні суміші піддають електролізу або гібридизації, та визначають, чи відбулась специфічна ампліфікація за допомогою програмного забезпечення або спеціальних таблиць. Результат HLA-типування надається у формі детального звіту на генному та алельному рівнях.

На початку для типування HLA з геномної ДНК використовували складні методи, що потребували багато часу й коштів, наприклад метод визначення поліморфізму фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз.

Метод визначення поліморфізму довжини рестриктивних фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз (ПДРФ, RFLP – restriction fragment length polymorphism). Це перший метод аналізу ДНК, у якому вирізані рестриктивними нуклеазами фрагменти геномної ДНК розділяють методом електрофорезу в агарозному гелі, де фрагменти різної довжини (заряду) виявляють різну рухливість і переміщуються в електромагнітному полі на різні відстані. Візуалізація і оцінка можлива після гібридизації фрагментів з радіоактивне міченими зондами ДНК у порівнянні із зразками раніше ідентифікованих типів. ПДРФ дає більшу кількість помилок типування, ніж нові молекулярно-біологічні методи, засновані на принципі ПЛР.

Методи типування HLA на основі ПЛР. ПЛР з міченими специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО,) та ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП) займають головне місце в лабораторній діагностиці гістосумісності для алогенної трансплантації нирок та кісткового мозку.

ПЛР з міченими, специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО, PCR-SSO sequence-specific oligonucleotide). Спочатку в ПЛР-СПО ампліфікують ділянки матрічної ДНК окремих генів HLA регіону. Продукти ампліфікації фіксують на нейлоновій мембрані і гібридизують зі специфічними за своєю послідовністю, хімічно або радіоактивне міченими олігонуклеотидами. Розрізнення конкретного алелю засноване на тому, що при достатньому виборі олігонуклеотидів позитивна гібридизація має місце лише тоді, коли певний олігонуклеотид комплементарний до відповідної послідовності нуклеотидів на ампліфікованих продуктах матрічної ДНК.

При наявності достатньої кількості специфічних праймерів та олігонуклеотидів метод СПО дозволяє ідентифікувати всі відомі алелі локусу. Майже для всіх експримованих генних локусів системи HLA вже існують добре відпрацьовані протоколи СПО. Однак СПО-технологія не дозволяє проводити HLA-типування на рівні окремих алелів. Максимальна розподілювальна здатність методу - від низького до середнього.

Використання цього методу для типування I класу ще тільки починається.

ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП, PCR-SSP sequence-specific primer). Принцип ПЛР-СПП (синоніми: алельспецифічна ампліфікація, система ампліфікації рефрактерних мутацій) полягає в тому, що ампліфікація специфічного продукту в ПЛР відбувається лише в тому разі, коли 3'-кінець праймеру комплементарний до цільової послідовності матрічної ДНК. Одна єдина різниця між послідовностями нуклеотидів матрічної ДНК та відповідного праймеру заважає ампліфікації в ПЛР, що зумовлює високу специфічність методу СПП в ідентифікації алелів. Для контролю ампліфікації до кожної проби додається ще одна пара праймерів. Вона забезпечує утворення продукту ПЛР при будь-яких умовах ампліфікації, незалежно від типу HLA. Це так званий внутрішній контроль.

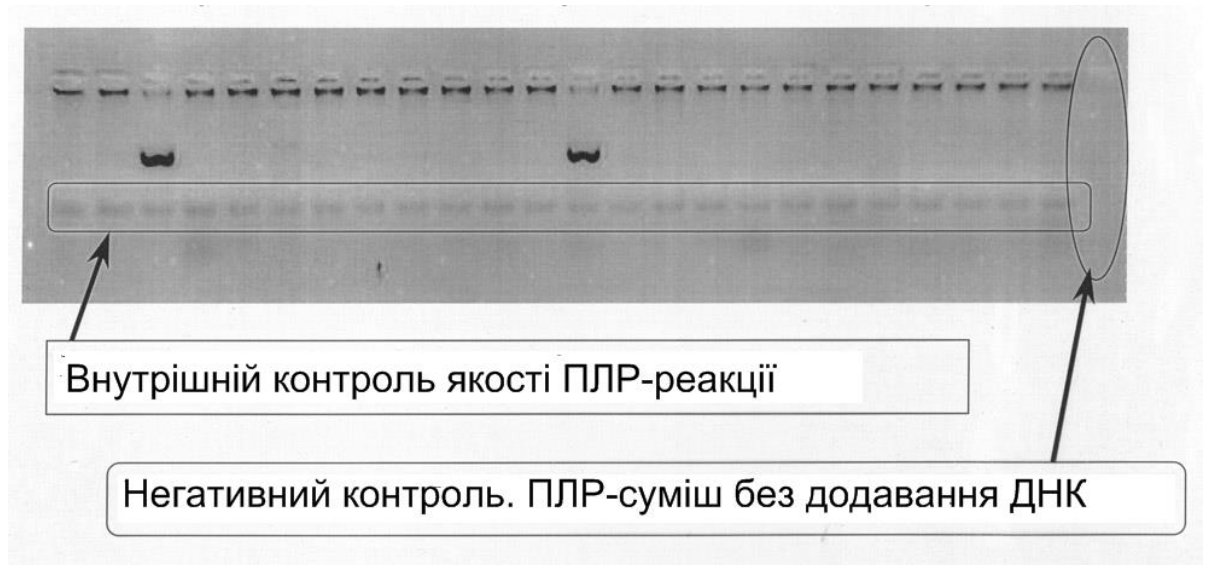


Рисунок 6.4.3 – Результати детекції продуктів ампліфікації молекулярно-генетичного типування системи HLA I класу локусу A.

Розподільвальна здатність цього методу залежить від виду та позиції різних пар нуклеотидних основ і можливості їхнього використання для ПЛР. На відміну від методу СПО ідентифікація окремих алелів відбувається вже на основі ампліфікації, і гібридизація не потрібна. Розрізнення окремих алелів чи їх груп відбувається при порівнянні специфічних продуктів реакції ампліфікації при електрофорезі в агарозному гелі, де продукти ПЛР розділяють за їх довжиною (зарядом) і візуалізують в ультрафіолетовому випромінюванні.

Вагомою перевагою СПП–технології є здатність проводити типування як на низькому (на рівні окремих груп генів), так і на високому рівні (на рівні окремих алелей, визначаючи точковий алельний поліморфізм).

Метод визначення поліморфізму фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз на основі ПЛР (ПЛР-ПФРН). У ПЛР-ПФРН після

ампліфікації ділянки ДНК зі специфічним екзоном окремі алелі чи групи алелів розпізнають на основі розщеплення продуктів ампліфікації рестриktivними нуклеазами. Розділення алель-специфічних фрагментів за їх довжиною та їх аналіз здійснюють методом електрофорезу в агарозному гелі.

Визначення поліморфізму конформації одониткового ланцюга ДНК (ПЛР-ПКОЛ). Полімеразна ланцюгова реакція з використанням принципу ПКОЛ полягає в тому, що електрофоретична рухливість окремих ланцюгів ДНК після ампліфікації залежить від розбіжностей у послідовності нуклеотидів. ПЛР-ПКОЛ використовують переважно для типування і порівняння двох алелів або двох індивідуумів.

Аналіз гетеродуплексів (ПЛР-АГ). У разі наявності в реакції ампліфікації багатьох алелів під час реасоціації комплементарних ланцюгів ДНК у ході ПЛР гібридизуватися можуть не тільки гомологічні, тобто ДНК-ланцюги одного алелю — гомодуплекс, але й комплементарні ланцюги двох різних алелей, які складають гетеродуплекс. Утворення конкретного гетеродуплексу залежить від довжини відповідних ланцюгів ДНК та характеру і кількості різних пар нуклеотидів. Розрізнення гомо- від гетеродуплексів відбувається методом електрофорезу, коли завдяки різним розмірам та/чи різному заряду продукти гібридизації переміщуються в поліакриламідному гелі на різні відстані. Синоніми ПЛР-АГ — ДНК Crossmatching та Fingerprinting.

Типування HLA на основі секвенування . Типування HLA на основі прямого визначення послідовності нуклеотидів (секвенування, sequencing) на відповідних ділянках ДНК, попередньо ампліфікованих у генспецифічній чи алельспецифічній ПЛР, дає найточніший доказ наявності окремого алелю чи комбінації алелів. З розвитком відповідної апаратури секвенування використовують як еталонний метод у типуванні HLA. При цьому один чи кілька екзонів спочатку ампліфікують в ПЛР, потім очищують продукти

реакції і піддають прямому секвенуванню. Зараз в автоматизованих системах для секвенування використовують метод обриву ланцюга за Sanger, 1977. При цьому ДНК-залежна реакція подовження за допомогою ДНК-полімерази припиняється при приєднанні одного з чотирьох різних флюоресцентно мічених дезоксинуклеотидів до комплементарної ділянки матричної ДНК. Аналіз мічених продуктів реакції елонгації відбувається в спеціальній камері з агарозним гелем.

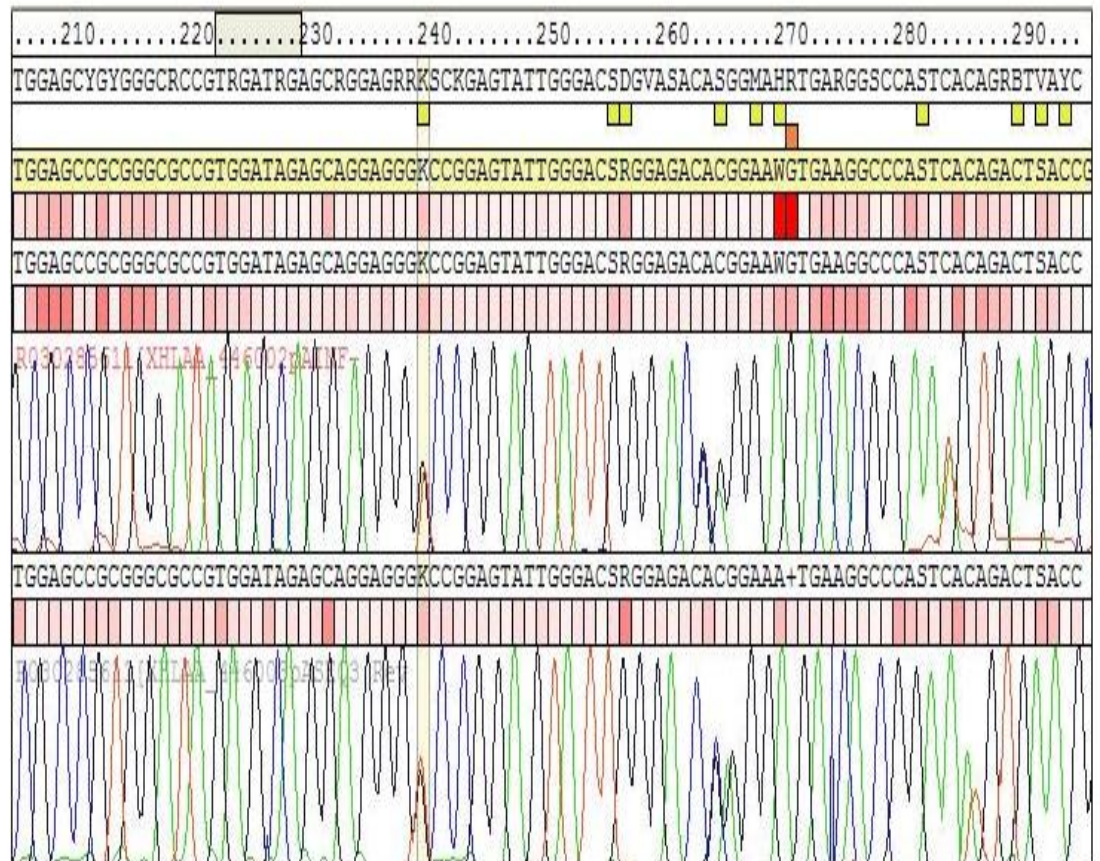


Рисунок 6.4.4 - Фрагмент результату секвенування локусу DRB1 II класу HLA-системи.

Одержану в ході секвенування нову послідовність нуклеотидів порівнюють з відомими послідовностями алелей з банку даних і таким чином ідентифікують їх або додають до банку даних, якщо послідовність ще не відома, після відповідної перевірки. Секвенування HLA-генів вже

використовують в клінічній лабораторній діагностиці при пошуку неродинних гістосумісних донорів для пацієнтів, що потребують трансплантацію кісткового мозку.

У клінічній лабораторній діагностиці гістосумісності для пересадки нирок та кісткового мозку найбільший вжиток знайшли методи СПО, СПП та секвенування на основі ПЛР. Перший з них завдяки високій автоматизації, великій пропускній здатності та відносно низькій собівартості вважається більш прийнятним для створення кріо-сховищ пуповинної крові, реєстрів донорів кісткового мозку, крупних трансплантологічних і онкологічних центрів. Недоліком методу є невисока розподільвальна здатність.

Основною перевагою СПП-метода є можливість проводити типування на низькому, середньому та високому рівнях. За розподільчою здатністю цей метод прирівнюється до секвенування, але значно дешевший за собівартістю і менш складний у виконанні. Недоліком СПП НЛА-типування є тривалість проведення методу і потреба у відносно великій кількості ДНК для аналізу.

Секвенування для визначення НЛА-генотипу є еталонним методом в рутинній лабораторній діагностиці трансплантаційних центрів. Недоліком методу є висока собівартість та складність виконання.

Інші методи на основі ПЛР використовують для вирішення окремих нестандартних проблем клінічної діагностики та наукових питань.

Питання для самоконтролю.

1. Назвіть можливі генетичні механізми, які включають обміни блоків нуклеотидів в родині генів I класу. ГКГ
2. Надайте структурну характеристику генів миші і людини.
3. Назвіть хромосомну локалізацію генів I і II класів комплексів H-2 і НЛА

4. Надайте структурну характеристику класичним, некласичним генам і псевдогенам.
5. За яким типом відбувається успадкування генетичної варіабельності ознак на рівні специфічності системи HLA.
6. Скільки груп генів містить в собі головний комплекс гістосумісності у мишей, і у людини.
7. Що являють собою антигени HLA за хімічною структурою.
8. На яких клітинах експресовані антигени I; II; III класів головного комплексу гістосумісності людини. Які імунологічні функції вони виконують.
9. Назвіть основні методи ідентифікації антигенної специфічності молекул HLA.
10. Охарактеризуйте схему еволюції α - і β -генів головного комплексу гістосумісності людини.

Література:

1. Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю. Новые антигены тканевой системы человека. - М.: Медицина, 1986. - 176 с.
2. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. - М.: Медицина, 1983. - 208 с.
3. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. С англ.. – М.: Мир, 1990. – 336 с.
4. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2. С. 287 – 301.
5. Клиническая иммунология и аллергология Под ред. Г. Лолора-младшего, Т.Фишера, Д.Адельмана. Пер. с англ. – М., Практика, 2000, -806 с.
6. Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.

VII. Генетичний контроль імунної відповіді

Загальна характеристика

Аналіз багаточислених наукових набутоків в галузі світових досліджень фізіологічної ролі головного комплексу гістосумісності людини свідчить про те, що основною фізіологічною функцією даного комплексу є регуляція імунної відповіді організму. Молекули МНС приймають безпосередню участь в ініціації імунної відповіді, оскільки контролюють молекули, які презентують антиген в імуногенній формі для розпізнавання його цитотоксичними Т-клітинами і хелперними Т-клітинами, а також контролюють утворення імунного комплексу цих молекул з антигеном. Здібність Т-лімфоцитів розпізнавати чужерідні антигени тільки в комплексі з антигенами HLA називають обмеженням (рестрикцією) по HLA. Також в МНС локалізовані гени, які контролюють синтез імунорегуляторних і ефекторних молекул - цитокінів ФНО-альфа, ФНО-бета, і деяких компонентів комплементу. Деяка невідповідність до основної функції самої назви даної генетичної системи пов'язана з відкриттям перших продуктів генів головного комплексу гістосумісності HLA (от Human leucocyte antigens), оскільки вперше молекули МНС ідентифікували по їх здібності викликати відторгнення трансплантата, але на сьогодні ця здібність є лише однією із фізіологічних функцій МНС.

Високий поліморфізм молекул МНС, а також здібність кожної антигенпрезентуючої клітини (АПК) експресувати декілька різних молекул МНС забезпечують можливість презентації Т-клітинами множинності різноманітних антигенних пептидів. Слід зауважити, що як правило, молекули МНС називають антигенами, але вони проявляють антигенність виключно у випадках, коли розпізнаються імунною системою індивіду не

особистого, а генетично іншого організму, наприклад, при органної або тканинної алотрансплантаціях. Наявність в МНС генів, більшість з яких кодує імунологічно значимі поліпептиди, дає підставу для припущення, що даний комплекс еволюційно сформований саме для здійснення імунних форм захисту індивіду.

Тобто, згідно сучасним уявам, система HLA, забезпечує регуляцію імунної відповіді організму на рівні взаємодії всіх імунокомпетентних клітин, шляхом розпізнавання своїх і чужерідних (в тому числі змінених своїх клітин), запуск і реалізацію імунної відповіді, що забезпечує виживання людини на рівні індивіду і популяції в цілому в умовах дії негативних екзогенних і ендогенних чинників. Така численність наведених функцій безумовно пов'язана зі складною структурою головного комплексу гістосумісності. Фізіологічна функція алелей і кодуємих ними антигенів HLA, визначається належністю до певного класу і в значній мірі розрізняється.

Так, антигени класу I присутні на поверхні всіх ядровмісних клітин і тромбоцитів і необхідні для розпізнавання трансформованих клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами. Але вони мають і іншу функцію, а саме забезпечення взаємодії між всіма іншими ядровмісними клітинами (навіть на рівні взаємодії нейрон – синапс), що зокрема забезпечує цілісне функціонування імунного гомеостазу і організму як біологічної системи в цілому[34]. Встановлено, що за структурою Бета2-мікроглобулін і домен альфа3 молекул МНС класу I є гомологічними окремим доменам імуноглобулінів. Враховуючи той факт, що обидва типи молекул приймають участь в імунних функціях, деякі дослідники висловлюють думку про загальне еволюційне походження цих молекул.

Основними локусами II класу HLA є DR, DQ, DP, а також DM, LMP і TAP, які були відкриті порівнянно **недавно**. Антигени класу II присутні на поверхні **В-лімфоцитів**, активованих **Т-лімфоцитів**, **моноцитів**,

макрофагів і дендритних клітин. Важливішою імунологічною функцією антигенів MHC (HLA) класу II є забезпечення **взаємодії між Т-лімфоцитами і макрофагами** в процесі імунної відповіді. **Т-хелпери** розпізнають чужерідний антиген лише після його переробки **макрофагами**, поєднання з антигенами HLA другого класу і презентації цього комплексу на поверхні макрофага. Три останніх локуси забезпечують такі важливі функції, як процесінг і експресія антигенів HLA на поверхні клітин. Низькомолекулярні білки, які контролюються цими генами, приймають участь в підготовці чужерідного антигена до презентації Т-клітинами. Велике значення для формування сучасної уяви відносно фізіологічної ролі і реалізації імунологічної функції антигенів HLA мало відкриття "нових" генів HLA DM, LMP (large multifunctional protease) і TAP. Імунологічна функція цих генетичних структур представлена на схемі 4.

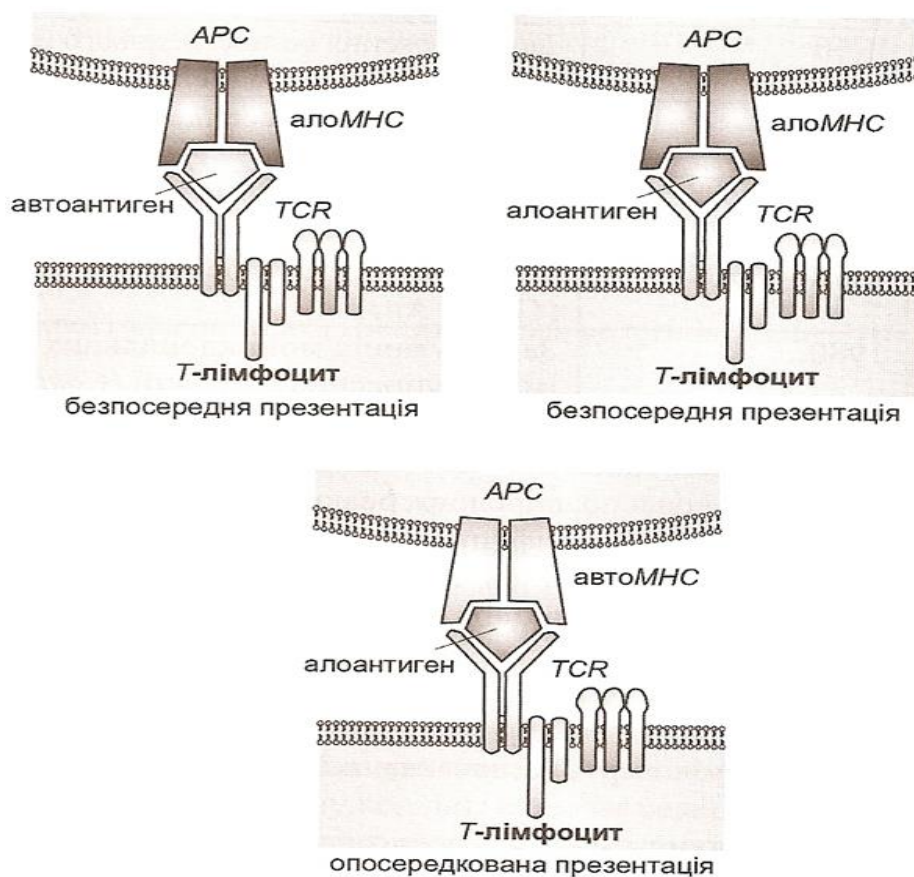


Рисунок 7.1.1 - Розпізнання комплексу антигенного пептиду з молекулами МНС I і II класів рецептором і корецептором Т-лімфоцита.

Тобто, першими в систему процесинга антигенів системи HLA вмикаються продукти локуса LMP (гени LMP, LMP7), які активовані γ -інтерфероном і потім інкорпоровані в протеосоми. Ген LMP, також відомий як RING (really interesting new genes) 12, а LMP₇ — як RING 10. Ген LMP₂; знаходиться в нерівноважному зчепленні з геном TAP1. Вперше дані гени були описані Glynnе, і Kelly і картовані в регіоні хромосоми 6, який знаходиться між TAP-генами. Чотири HLA гена (LMP₂ LMP₇ и RING4, RING11) складають кластер генів, який відповідає за індукцію інтерферонів. Саме з цим і пов'язаний механізм дії генів LMP₂ і LMP₇ в аспекті активації протеосом. Можливим механізмом дії продуктів генів LMP₂ і LMP₇ також може бути заміна ними двох протеосомних субодиниць Y і X під впливом індукції γ -інтерферона. Молекули МНС класу I синтезуються в цитозолі клітини, де в період, коли ще немає відповідного пептиду, знаходяться в разі з тирозин-калретикуліновим комплексом. Після зв'язування з пептидом відбувається визволення і транспорт молекул HLA на поверхню клітин за участю кодуємих МНС "пептидних насосів" TAP (від транспортерів, асоційованих з антигенним процесінгом). Дані гени відомі також під назвою RING4 і PSF (peptide supply factor). Саме ця назва відображає функцію даних молекул - регуляцію розміру і специфічності пептидів шляхом приведення їх до "відповідності" з зв'язуючими сайтами молекул МНС класу I. Ці гени є аналогічними Nam1 и Nam2, які були раніше відкриті у мишей.

В 1993 році дослідниками було показано, що гетеродімери TAP1 і TAP2 приймають участь в кінцевій сборці молекул антигенів класу I і презентації ними ендогенних пептидів. Молекули, які кодовані геном TAP2, знаходяться в нерівноважному зчепленні з антигенами HLA-DR і поміж генами TAP1 і

ТАР2 існує висока частота рекомбінацій. Встановлено, що деякі мутації в районі генів HLA-ТАР призводять до загублення презентуючої функції антигенів гістосумісності класу I. Можливо, що з порушенням антигенпрезентуючої функції ТАР може бути пов'язано з високим рівнем асоціації між алелями гену ТАР1 і генетичною схильністю до розвитку такого аутоімунного захворювання, як інсулінзалежний цукровий діабет. В літературі представлені також дані відносно одного з алелей ТАР1-локуса, а саме R659Q, для якого є характерним дефект транскрипції РНК, який виявляється на клітинах мілкоклітинного раку легенів. Представлені також дані що при синдромі Луї-Бар, (наявність "голих Т-лімфоцитів", порушення експресії антигенів HLA класу I пов'язано саме з гомозиготністю алелей гена ТАР2.

На відміну від молекули класу I обидва ланцюга молекули МНС класу II синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі, звідки після їх тимчасового поєднання з третім інваріантним ланцюгом вони транспортуються до ендоцитарного компартменту, де або зустрічаються і потім пов'язуються з пептидом, або ж деградують в лізосомах. Після зв'язку з пептидом, який замінює інваріантний ланцюг, молекули МНС класу II переміщуються на клітинну мембрану. Витискання пептидом інваріантного ланцюга молекул HLA класу II забезпечують білки, які кодовані також системою HLA і мають назву HLA-DM. Ці білки каталізують заміну "тимчасового" пептиду інваріантного ланцюга на специфічний пептид [24].

В систему DM входять 2 гена — DMA і DMB. Аналіз сиквенсу алельних варіантів генів DMA і DMB дозволив зробити висновки, що еволюційно вони є більш древніми, ніж класичні молекули генів HLA класу II. На основі мутаційного аналізу P. Morris і співавт. картували гени DMA і DMB між локусами DP і DQ (дивись схему I). **Роль антигенів HLA-DM є вирішальною в презентації екзогенних пептидів молекулами класу II.** ***Механізм їх дії*** - видалення тимчасово зв'язуючої пептид молекулы CLIP

(дивись схему 3) і визволення зв'язуючого сайту молекули HLA класу II для його заміщення пептидом, який походить з екзогенного білка. Дефект функції HLA-DM призводить до порушення заміни молекули CLIP на пептид і відміні антигенпрезентуючої функції молекул класу II. Враховуючи цей факт, можна припустити, що саме з порушенням функцій цих молекул і пов'язані окреми форми імунодефіцитних станів людини, в основі яких полягає знищення можливості експресії HLA на імунокомпетентних клітинах.

Незважаючи на те, що дані відносно "нових" систем HLA LMP, TAP і DM знаходяться в перспективному розвитку, вже зараз зрозуміло, що вони виконують в імунній відповіді важливу роль, яка полягає в забезпеченні фізіологічної презентації процесованих пептидів для подальшого розвитку імунної відповіді.

Таким чином, на сьогодні окреслені основні імунологічні властивості алелей і кодуємих ними антигенів I і II класів системи HLA.

Імунологічні властивості, які пов'язані з МНС

- Стимуляція продукції антитіл
- Стимуляція реакції в змішаній культурі лімфоцитів
- Реакція "трансплантат проти хазяїна"
- Клітинна реакція лімфолізу
- Гени імунної відповіді
- Рестрикція імунної відповіді

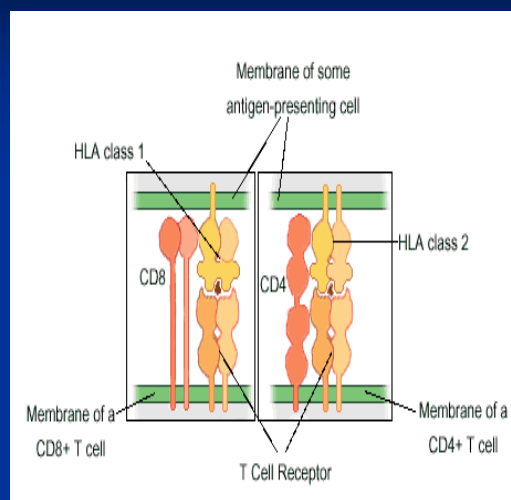


Рисунок 7.1.3 – Імунологічні властивості МНС

HLA клас III вміщує в себе гени, які кодують фактори комплементу, фактор некрозу пухлин і деякі інші. Гени МНС класу III, розміщені в межах групи генів МНС, або щільно зчеплені з нею і контролюють деякі компоненти комплементу: C4 і C2, а також фактор В, який знаходиться скоріш у плазмі крові ніж на поверхні клітин. На відміну від молекул МНС класу I і класу II приймають лише опосередковану участь в імунній відповіді. За механізмом забезпечення розвитку імунного реагування на будь який агент, роль антигенів системи HLA є найважливішою, тому що саме молекули антигенів HLA забезпечують презентацію імунодомінантних пептидів, які є продуктом внутріклітинного протеолізу чужерідних антигенів, саме проти яких і буде індукована, а потім і розвинута імунна відповідь. Ця функція антигенів системи HLA обумовлена структурою молекул, яка не зважаючи на певні поміжкласові відмінності в структурі, дозволяє створювати на зовнішнім кінці так звану пептидзв'язуючу боріздку, яка і утримує презентований для розпізнавання пептид.

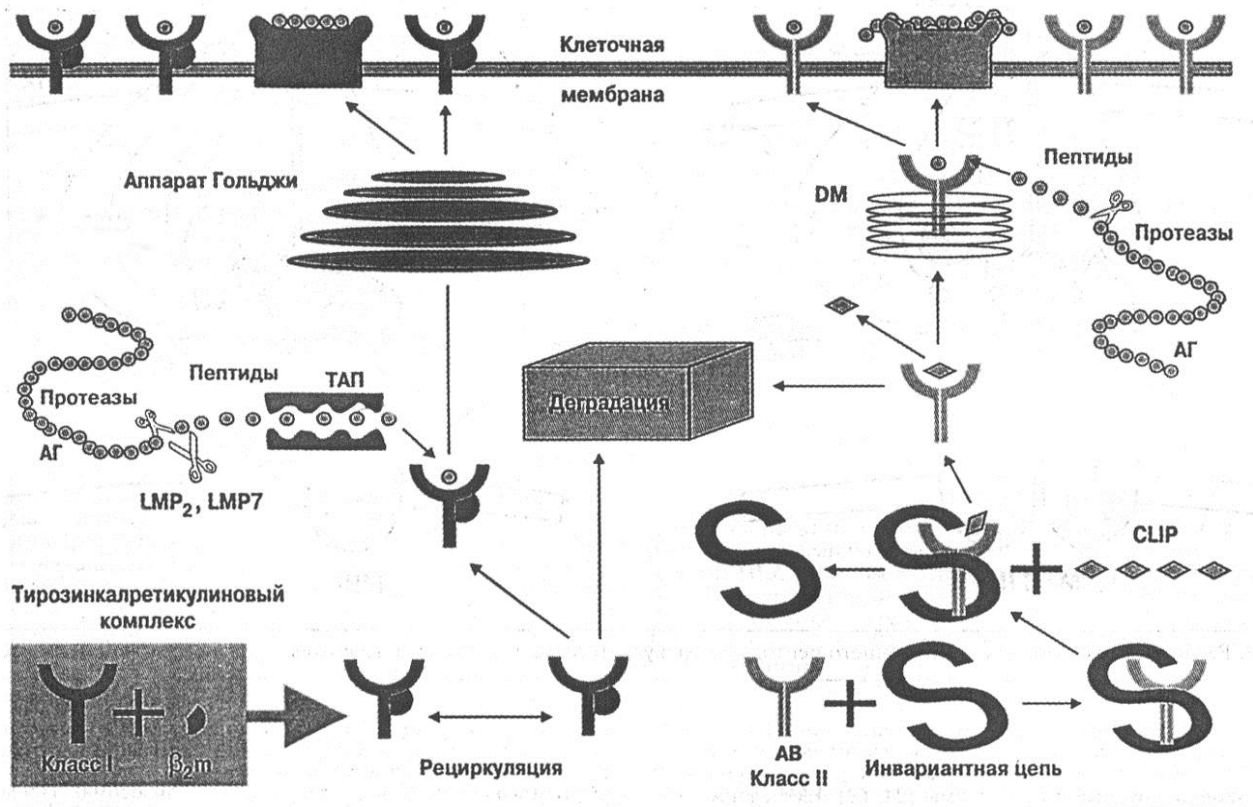


Схема 2. Процессинг и экспрессия HLA-пептид.

Рисунок 7.1.3 - На цій схемі принципово представлені пептиди антигенами HLA класа I (справа) и класа II (зліва) (Хаитов).

Загальним принципом для антигенів класів I і II є:

Антигенпрезентуюча клітина здійснює специфічну взаємодію, представляючи пептид в контексті особистої HLA-молекули, ідентичної молекулі на клітині, яка приймає інформацію. Цей феномен названо феноменом подвійного розпізнавання і саме за це відкриття Цинкернагель і Догерті отримали Нобелівську премію. Дійсно, цей феномен є ключовим в розумінні підґрунтя фізіологічної регуляції імунного гомеостазу. В той же час на схемі 2 представлені і суттєві розбіжності між взаємодією, яка забезпечується в процесі імунної відповіді антигенами HLA класів I і II. Антигени HLA класа II, як було наголошено вище, забезпечують взаємодію антигенпрезентуючої клітини з Т-хелпером, а антигени HLA класу I — з Т-ефектором/кілером. Допмагають їм в цьому різноманітні молекули корецептори — CD4 для Т-хелперів і CD8 для Т-кіллерів. Ефект такої взаємодії є різним: розпізнавання пептидів на рівні молекули HLA класу II

призводить до формування популяції Th1 и Th2-клітин. Одни з них є індукторами розвитку гуморальної імунної відповіді, а інші – виконують функцію необхідного для індукції Т-кіллерів компоненту.

Відносно антигенів гістосумісності першого класу, Т-кілер, індукований проти імунодомінантного пептиду, експресованого на поверхні клітин-мішеней, які є ідентичними такому ж пептиду на Т-кілері, знищить ці клітини. Важливо підкреслити, що обидва ланцюга фізіологічної, "нормальної", імунної відповіді рестриктовані HLA-фенотипом кожного індивіду. Якщо пептид був би презентований для розпізнання клітиною, яка відрізняється за антигенами HLA від розпізнаючих клітин, то імунна відповідь була би направлена проти саме цих клітин. В таких випадках ми торкаємось вже питань трансплантаційного імунітету.

Система HLA здійснює регулювання на всіх основних етапах імунної відповіді: початковому; продуктивному; а також забезпечує, так званий, "термінальний" етап регуляції - апоптоз різних типів антигенпрезентуючих клітин. Доцільно відмітити, що даний ефект притаманний як антигенпрезентуючим клітинам, тобто макрофагам, CD34⁺-клітинам, які диференцовані з моноцитів в культурі клітин, дендритним клітинам, так і В-лімфоцитам. Так, в останні роки було визначено, що блокуючий вплив моноклонального антитіла L243 на молекули HLA-DR, які експресовані на різних типах антигенпрезентуючих клітин, блокує їх апоптоз, який визначають за допомогою FITC-міченого аннексину V. У всіх випадках після блокування молекул DR відмічено значне зниження апоптозу. Сам ефект HLA-DR-опосередкованого апоптозу дендритних клітин не змінювався навіть при використанні високої концентрації таких інгібіторів, як z-VAD-fmk і z-DEVD-fmk. Вважається, що, регуляція апоптозу антигенпрезентуючих клітин, які є на стадії диференціювання, здійснюється крізь молекули HLA-DR і саме це може бути вирішальним механізмом для обмеження їх життя. Важливо відмітити, що роль антигенів не обмежується

регуляцією апоптозу „професійних” антигенпрезентуючих клітин, вони також приймають безпосередню участь в апоптозі В-лімфоцитів.

Світові набутки в галузі імуногенетичних досліджень свідчать, про те що гени HLA-DR і кодуємі ними молекули відповідні за "сигнал трансдукції", а саме за генерацію вторинних сигналів. Дослідниками було показано, що виявлені ними HLA-DR-опосередковані сигнали призводять до активації тирозинкінази і внутришньклітинному вихіду кальцію, а також до продукції діа-цилгліцеролу і активації сімейства серин/треонінкінази і протеїнкінази С (ПКС). Взаємовідношення між ПКС- і HLA-DR-залежними сигналами є комплексними, оскільки HLA-DR-сигнали призводять до активації ензимів. Як слідство цієї активації зростає експресія HLA-DR на клітинних мембранах, що вважається одним з механізмів апоптозу. Тобто, для В-лімфоцитів, мабуть, окрім непрямого, механізму взаємодії Fas/Fas-лигандів, може існувати і прямий механізм HLA-DR-опосередкованого апоптозу, коли не включені ці рецептори. Така пряма взаємодія може мати значення для злоякісних перетворень перероджених В-лімфоцитів, які втратили експресію Fas.

Всі вищенаведені факти, в цілому, свідчать на користь ключової фізіологічної ролі молекул HLA-DR в регуляції апоптоза всіх типів антигенпрезентуючих клітин, що по суті є регуляцією одного з найважливіших етапів імунної відповіді. Ці дані також свідчать на користь того, що сучасний рівень знань про імуно-фізіологічну роль генів HLA-DR, дає підставу вважати їх генами імунної відповіді у людини.

Генам головного комплексу гістосумісності належить також цілий ряд інших фізіологічних функцій, зокрема функції генетичного контролю якості імунної відповіді на рівні специфічності імунокомпетентних клітин – мова йде про асоційованом з системою HLA контролі активності різних субпопуляцій імунокомпетентних клітин, що в свою чергу суттєвим чином пов'язано з кінцевим рівнем імунної відповіді. Слід пам'ятати, що дана

функція є вторинною і залежить від здібності людини генетично відповідати на даний антигенний агент.

Передумовою розвитку даного напрямку було припущення W. Bodmer і J. Boomer ще в 1978 р про те, що на формування HLA-профілю європеїдної популяції в знаній мірі вплинули мавші місце в середні сторіччя епідемії таких захворювань як чума, віспа, холера та інші. В результаті цього серед виживших оказались особи з певними HLA-генотипами, в першу чергу з генотипом HLA-A1, -B8, -DR3. Даний генотип, як припускав W. Bodmer, забезпечує більш високу резистентність до інфекційних захворювань і на сьогодні є генетичним маркером європеїдної популяції. Надалі це припущення було підтверджене на прикладі недавніх епідемій брюшинного тифу в Суринамі, коли серед європеїдів які вижили, значний відсоток склали особи саме з таким генотипом. Разом з тим W. Bodmer припустив, що реалізація такого ефекту може бути пов'язана тільки в умовах асоціації між конкретними HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами в реалізації імунної відповіді. Враховуючи той факт, що з одними і тими ж гаплотипами HLA оказалась асоційована толерантність до різних інфекційних агентів, логічно було б припустити, що подібного роду асоціації з HLA може бути пов'язана не тільки з самою генетично обумовленою відповідаемістю до конкретного інфекційного агента, але і з тими ланцюгами імунної відповіді, які приймають участь в її реалізації, тобто в кінцевому результаті. Саме це і мається на увазі сьогодні імуногенетиками під терміном - якість імунної відповіді і саме цей аспект склав основу нового напрямку фізіологічної функції HLA. В даному напрямку вітчизняні дослідники мають певний пріоритет.

Насьогодні достатньо добре вивчені позитивні і негативні асоціативні зв'язки між ізольованими HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами з певними показниками імунного гомеостазу, наприклад, з кількістю і

функціональною активністю клітин $CD4^+$, $CD8^+$, ЕКК, фагоцитуючою функцією нейтрофілів і інше.

В останні роки праці дослідників різних країн свідчать про те, що **асоційовані з НЛА показники імунного статусу можуть розрізняватись в залежності від принадності до певної етнічної групи.**

Доцільно відмітити роль НЛА молекул в якості поверхневих клітинних маркерів, які розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами і Т-хелперами в комплексі з антигеном. Молекули, кодовані комплексом Ta , залучені в процеси диференціювання, особливо у ембріона, а можливо, і в плаценті. МНС також приймає участь в самих різноманітних неімунних процесах, в тому числі і в тих, які опосередковані гормонами (наприклад, регуляція маси тіла у мишей або яйцenessкості кур). Молекули МНС класу I можуть входити до складу гормональних рецепторів. Так, зв'язування інсуліну знижується, якщо з поверхні клітин у видалити антигени МНС класу I, але не класу II. Крім того, описані випадки асоціації продуктів МНС з рецепторами глюкагону, епідермального фактору росту, гама-ендорфіну.

Сучасний молекулярно-генетичний рівень досліджень НЛА дозволив по-новому подивитись на фізіологічну функцію системи НЛА. Можливість аналізувати амінокислотні послідовності всіх алельних варіантів антигенів НЛА, навіть фрагменти, які визначають їх специфічність, а також структуру пептидів, які визначають специфічність різних чужерідних агентів, в тому числі і хвороботворні, дозволяє передбачити відповідність тих чи інших імунодомінантних пептидів відповідним участкам молекули МНС. Таким чином, можливо передбачити генетичну відповідь або її відсутність на конкретний агент. В свою чергу, це дає можливість не тільки передбачити, чи відповідь даний індивід на вакцинацію проти певного хвороботворного агенту, але і передбачити, наскільки ця відповідь буде фізіологічною. Тобто даний підхід дозволить прогнозувати можливість розвитку цілого ряду захворювань аутоімунного генезу, наприклад, ревматоїдного артриту, або

інсулізалежного цукрового діабету, в генезі яких, можливо, також лежить комплементарність імунодомінантних пептидів інфекційних агентів конкретним епітопам алелей HLA. Що торкається питання відносно ролі прямого і непрямого розпізнавання чужерідних антигенів гістосумісності в процесі вагітності, то на сьогодні даний аспект розроблений недостатньо, але проблема HLA-сумісності матері і плоду має велике значення і буде розглянута окремо.

Таким чином, завдяки високому поліморфізму системи HLA, стала можливою взаємна комплементарність імунодомінантних сайтів молекул багаточисельних інфекційних збудників і конкретних антигенів гістосумісності. Саме це стало ефективним засобом захисту і збереження людини як виду в умовах мінливого мікробного оточуючого середовища.

Питання для самоконтролю:

1. Охарактеризуйте основну фізіологічну функцію ГКГС.
2. На яких етапах система HLA здійснює регулювання імунної відповіді?
3. Чи можливо передбачити генетичну відповідь або її відсутність на конкретний агент на основі HLA генотипування індивіду?
4. Гени якого класу і кодуємі ними молекули HLA відповідні за "сигнал трансдукції"?
5. Охарактеризуйте основні імунологічні властивості алелей і кодуємих ними антигенів I і II класів системи HLA.
6. Що таке феномен подвійного розпізнавання?
7. Назвіть основні локуси II класу HLA
8. Назвіть основні локуси I класу HLA

Література

7. М. Якобисяк. Імунологія/Переклад з польської за ред.. проф.. В.В. Чоп'як. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
8. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
9. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и алергология. – М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.: ил.
10. Garrido F. HLA and cancer// Tissue Antigens. - 1996. - Vol. 47. - P. 361-363.
11. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz - Cabello F, Stern P. Natural history of HLA expression during tumour development// Immunol. Today.- 1993.- Vol № 14 -10.-P. 491-499.
12. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. – 2001, №3. – с. 4-12.
13. Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.

7.1 Імунокомпетентні клітини і генетична дрегуляція імунної відповіді

Сучасні набутки фундаментальних досліджень в галузі імуногенетики свідчать про неможливість штучного розділення наукових понять на суто імунологічні і суто генетичні при дослідженні закономірностей функціонування імунного гомеостазу людини, оскільки обидва ці поняття саме в сукупності інтегрально відображають фізіологічний стан індивіду.

Імунна система є однією з найважливіших систем організму людини, головна функція якої полягає в забезпеченні толерантності до хвороботворних мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибків, найпростіших, гельмінтів) і продуктів їхньої життєдіяльності.

Імунітет також захищає організм від впливу різних речовин, що несуть чужорідні властивості (наприклад, рослинні і тваринні отрути), від розвитку пухлинних клітин і від наслідків впливу негативних екзогенних і ендогенних чинників. Саме імунологічне реагування на алоантигенну трансплантацію визначає кінцевий результат приживлення органів і тканин. Імунна система організму впливає на внутрішньоутробний розвиток плода й процеси старіння.

Важасться, що імунітет спрямований на підтримку генетичної сталості внутрішнього середовища організму, а також його цілісності й індивідуальності. В той же час, аналіз багаточисельних наукових розробок в галузі дослідження генетичних механізмів підтримки нормального гомеостазу людини на рівні всіх систем, зокрема на рівні імунологічної системи, свідчить про існування генетичного контролю імунної відповіді.

Головна роль в такій важливій фізіологічній функції організму як регуляція імунної відповіді відведена головному комплексу гістосумісності (система лейкоцитарних антигенів HLA). Молекули МНС приймають безпосередню участь в ініціації імунної відповіді, на рівні контролю

молекул, які презентують антиген в імуногенній формі для розпізнавання його цитотоксичними Т-клітинами і хелперними Т-клітинами. Молекули комплексу МНС також контролюють утворення імуного комплексу молекул імунокомпетентних клітин з антигеном. Встановлена здібність Т-лімфоцитів розпізнавати чужерідні антигени тільки в комплексі з антигенами HLA. Цей феномен отримав назву обмеження (рестрикція) за HLA. Гени комплексу МНС контролюють синтез імунорегуляторних і ефektorних молекул - цитокінів ФНО-альфа, ФНО-бета, і деяких компонентів комплементу. Встановлено, що антигени даного комплексу не тільки відіграють важливу роль в регуляції імуноної відповіді, але і являють собою сильні антигени.

В попередніх розділах ми детально розглянули структуру і функції молекул системи HLA, а також антигенний поліморфізм який складає основу тканинної несумісності. Коротко нагадаємо їх основні функції і на поверхні яких клітин вони експресуються.

Антигени(HLA) класу I - необхідні для розпізнавання трансформованих клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами. Антигени I класу експресовані на поверхні усіх адровміщуючих клітин і тромбоцитів.

Антигени (HLA) класу II – забезпечують взаємодію між Т-лімфоцитами і макрофагами. Антигени II класу присутні на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і на дендритних клітинах.

Комплекс МНС класу III, розміщений в межах групи генів МНС, або тісно зчеплений з нею, контролює деякі компоненти комплементу: C4 і C2, фактор В, який в більшості представлений у плазмі крові а не на поверхні клітин.

Вищенаведені характеристики молекул ГКГС свідчать про те, що розміщення і виконання фізіологічних функцій цих генетичних структур є неразривно пов'язаним з різними субпопуляціями

імунокомпетентних клітин і для розуміння механізмів імунологічного реагування з позицій генетичного контролю імуної відповіді вважаємо за необхідне досить детально зупинитись на головних компонентах імуної відповіді – імунокомпетентних клітинах.

7.2 Лімфоцити

Лімфоцити - це єдині клітини організму, здатні специфічно розпізнавати і розрізняти різні антигени і відповідати активацією на контакт з певним антигеном.

Лімфоцити є представниками групи незернистих лейкоцитів, що характеризуються специфічним співвідношенням ядерно-цитоплазматичного матеріалу: великі, округлої форми ядра на фоні незначного об'єму базofilної цитоплазми, яка огортає ядро на зразок перстня.

У крові людини кількість лімфоцитів становить в нормі близько 20-35%. В залежності від розмірів розрізняють малі (діаметром 5-7 мкм), середні (діаметром 7-10 мкм) і великі (діаметром понад 10 мкм) лімфоцити. Останні зустрічаються лише у крові новонароджених і малолітніх дітей, у крові дорослих подібна форма лімфоцитів в нормі відсутня. Загалом у крові здорової дорослої людини присутні наступні типи лімфоцитів: 1) малі світлі лімфоцити; 2) малі темні лімфоцити; 3) середні лімфоцити; 4) плазмоцити. Характерною особливістю лімфоцитів є те, що за умов значної морфологічної подібності цим клітинам властива виразна функціональна гетерогенність, яка забезпечує активну участь лімфоцитів у реакціях як клітинного, так і гуморального імунітету.

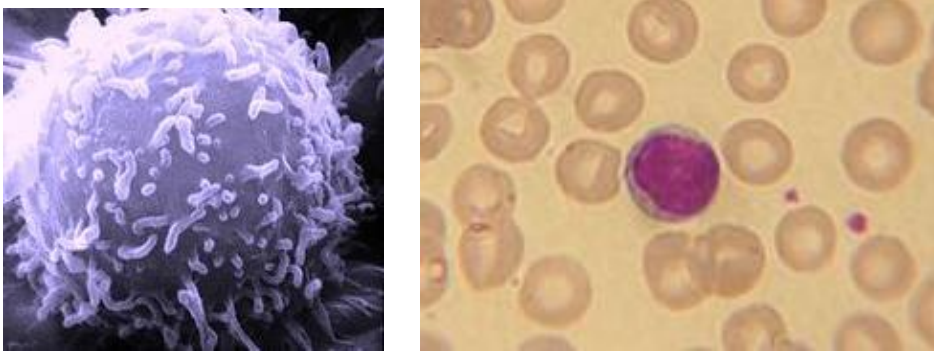


Рис. 7.2.1 Морфологічна характеристика лімфоцитів

Тривалий час вважали, що лімфоцити в людини утворюються у лімфоїдній тканині, на відміну від решти клітин крові. І хоча присутність лімфоцитів у мієлоїдній тканині засвідчувалась вченими неодноразово, достатньої уваги цьому факту не надавали. Знаходження лімфоцитів у червоному кістковому мозку пов'язували з їх здатністю пересуватись з лімфоїдної тканини у кров, а звідти у мієлоїдну тканину. І дійсно, незначна частина присутніх тут лімфоцитів потрапила у мієлоїдну тканину саме таким шляхом. Однак, згодом, сучасними методами, зокрема радіоавтографією, було доведено походження значного відсотка лімфоцитів з червоного кісткового мозку, з клітини-попередника лімфоцитів. У червоному кістковому мозку стовбурові лімфоїдні клітини надходять на ранніх стадіях ембріогенезу з ембріональної печінки. Ще раніше частина стовбурових клітин з печінки висівають у центральні органи імунної системи, де дають початок величезним популяціям Т- і В-лімфоцитів.

Лімфоцитопоез починається із диференціації стовбурових клітин крові і, в залежності від особливостей генезу, розрізняють Т- і В-лімфоцити. Т-лімфоцитами називають гетерогенну групу клітин, дозрівання яких відбувається в тимусі та які забезпечують існування в організмі клітинного імунітету.

В-лімфоцити значною мірою забезпечують гуморальний імунітет організму, оскільки синтезують специфічні антитіла (імуноглобуліни); крім

того, вони впливають на активність деяких Т-лімфоцитів, беручи, таким чином, участь у реакціях клітинного імунітету.

Т-лімфоцити

Диференціювання Т-лімфоцитів починається в період ембріонального розвитку. У ембріонів хребетних попередники лімфоцитів виявляються спочатку в жовтковому мішку, а після його атрофії - в ембріональній печінці. У постембріональному періоді попередники лімфоцитів знаходяться в більшій кількості - в кістковому мозку і в меншій мірі - в селезінці. З жовткового мішка, печінки і кісткового мозку попередники клітин мігрують в тимус, де перетворюються на Т-імунокомпетентні клітини. У тимусі створюється особливе мікрооточення за рахунок тимічного епітелію, що впливає на диференціювання Т-лімфоцитів.

Пре-Т-лімфоцити в кістковому мозку предетерміновані і їх диференціювання в Т-клітини може бути індуковане різними чинниками. Суть цих змін полягає в морфологічній реорганізації цитомембрани, що супроводжується появою нових антигенів і організацією специфічної сигнальної системи.

Попередники тимоцитів спочатку мігрують у субкапсулярну зону тимуса, а надалі послідовно переміщуюються в кортикальну зону, де перетворюються на незрілі кортикальні (до 90% клітини тимуса) тимоцити (фермент термінальну дезоксинуклеотидилтрансферазу (*TdT*) - специфічний маркер кортикальних тимоцитів) і в медулярну зону, де перетворюються на зрілі медулярні тимоцити, що становлять близько 10% клітин тимуса.

Дозрівання і проліферація тимоцитів відбувається під впливом гормонів, що продукуються епітелієм тимуса: *тимозину, тимопоетину, тимусного гормонального чинника, тимостимуліну та сироваткового тимусного чинника*. Вони дозрівають по мірі переміщення з кортикальної зони тимусу в мозкову.

Процес проліферації лімфоцитів в тимусі протікає дуже інтенсивно, але не всі клітини мігрують з вилючкової залози у вигляді Т-лімфоцитів: більшість з них там же гине. Вважають, що причиною їх загибелі служить приєднання антигену до антигенспецифічного рецептора цих клітин. В тимусі немає чужорідних антигенів, от чому цей механізм може служити для видалення Т-лімфоцитів, здатних реагувати з аутоструктурами організму, тобто захищати його від аутоімунних реакцій. Більш ніж 95 % тимоцитів знищуються в результаті їх позитивної та негативної клональної селекції. Спочатку відбувається позитивна селекція: в кортикальній зоні тимусу відбираються тимоцити, що несуть низькоафінні Т-клітинні рецептори і взаємодіють з поверхневими молекулами кортикальних епітеліальних клітин (з їх МНС II, презентуючими пептиди). Потім відбувається негативна селекція: в медулярній зоні тимусу тимоцити, що підлягли позитивній селекції, знищуються у випадку експресії ними Т-клітинного рецептору з підвищеною афінністю до власних антигенів. Цей процес відбувається в результаті високоафінної взаємодії Т-клітинного рецептора тимоцитів з поверхневими комплексами МНС II та пептид антигенпрезентуючих клітин (дендритні клітини та медулярних епітеліальних клітин тимусу).

Після дозрівання в тимусі Т-лімфоцити з потоком крові поступають в лімфоїдні органи і заселяють тимусзалежні зони вторинних лімфоїдних органів та бар'єрних тканин де залишаються в тривалий час і де завершується останній етап їх антигенезалежного диференціювання. Специфічна взаємодія з антигеном служить початком процесу диференціювання в зрілі і триваложивучі клітки, що становлять велику частину рециркулюючих Т-лімфоцитів.

Таким чином, попередники Т-лімфоцитів заселяють тимус, там проліферують і перетворюються на Т-лімфоцити, а потім мігрують в тимусзалежні зони периферичних органів імунної системи, де відбувається завершення диференціювання Т-лімфоцитів в зрілі у

функціональному відношенні субпопуляції Т-хелперів, Т-супресорів і Т-кілерів, які набувають здатності до специфічної активації.

Т-клітини пам'яті здатні тривалий період часу (декілька років) зберігати інформацію про той антиген, з яким вони контактували. При повторній зустрічі з даним антигеном Т-клітини пам'яті забезпечують швидке розгортання процесів вторинної відповіді імунної системи, перешкоджаючи тим самим розмноженню і поширенню антигену в організмі.

Багато років в імунології існувала ситуація, коли було відомо, що Т-лімфоцити мають на поверхні рецептор для антигену, схожий з антитілами на В-лімфоцитах, але було незрозуміло, наскільки ідентичні ці молекули. Питання було зняте в 1983-1984 рр., коли застосування моноклональних антитіл і зондів ДНК дозволило точно встановити, що і на молекулярному і на генетичному рівні Т-клітинний рецептор (*TCR - T cell receptors*) є унікальним.

Рецептор Т-лімфоцита має характерну для суперсімейства імуноглобулінів структуру, а саме поліпептидні ланцюги, що складаються з доменів, сполучені дисульфідними зв'язками. Молекула рецептора має 2 основні ланцюги – α і β - (90% Т-лімфоцитів крові), або в окремих випадках – γ і δ (1-10%), що складаються з 2 доменів кожна.

Незвичність рецепторних білків полягає в тому, що кодуєчі їх гени розташовані на хромосомі не поряд, а через деякі проміжки і для поєднання відповідних генів відбувається вирізання лежачих між ними сегментів ДНК, а потім і РНК. Цей процес, відомий як перебудова генів, відбувається тільки в Т-лімфоцитах, тоді як у всіх інших клітинах гени залишаються в нефункціональному стані зародкової лінії. Перебудова генів спостерігається в індивідуальному Т-лімфоциті, що забезпечує йому унікальний рецептор і як наслідок унікальну антигенрозпізнавальну здатність.

(*TCR - T cell receptors*) — Т-клітинний рецептор. Складається з одного α - (ММ 50 000 Да) і одного β - (ММ 45 000 Да) ланцюгів, кожен з

яких має зовнішній (варіабельний) та внутрішній (константний) домени, внутрішньомембранну і цитоплазматичну коротку ділянку. На ранній стадії ембріонального розвитку, а також в деяких органах (кишечник, шкіра) Т-лімфоцити можуть мати альтернативні рецептори з γ - і δ -ланцюгами та розпізнавати інші антигени в порівнянні з α - і β -Т-лімфоцитами. Середня кількість TCR на Т-лімфоциті складає $\sim 5 \times 10^4$.

CD3 — молекулярний комплекс, що складається з 3 ланцюгів: γ - (ММ 25 000), δ - (ММ 20 000) і ϵ - (ММ 20 000), який відіграє істотну роль у всіх функціях Т-клітин. TCR, CD3 і сигнальні дволанцюгові молекули ($z\alpha$ і $z\beta$) разом утворюють комплекс, що взаємодіє з антигеном (МНС + пептид). Ця взаємодія веде до активації клітини, принаймні, через два внутріклітинні процеси, що залучають тирозинкіназу і фосфоліпазу С, що в результаті приводить до проліферації клітини і вивільнення цитокінів.

CD4 — одноланцюгова поверхнева молекула (ММ 60 000) Т-хелпера, що бере участь в його взаємодії з молекулами МНС II класу.

CD8 — поверхнева молекула більшості цитотоксичних Т-лімфоцитів. Бере участь у взаємодії з молекулами МНС I класу. CD8 людини складається з 2 однакових ланцюгів. Підкреслюючи тісний зв'язок з TCR, молекулами CD4 і CD8 називають ко-рецепторами.

CD2, CD28, LFA-1 — три з багатьох адгезивних молекул, що підтримують контакт Т-лімфоцита з антигенпрезентуючими клітинами або В-лімфоцитами. Особливу роль відіграє молекула CD28, що розпізнає молекулу В7 як істотний ко-стимулятор Т-клітинної активації. Вважається, що за відсутності ко-стимуляції Т-клітина набуває стану невідповідності, який має значення при розвитку аутореактивності.

На поверхні цитоплазматичної мембрани клітин імунної системи, у тому числі і Т-лімфоцитів існують особливі молекули, які служать їх маркерами. (табл. 1).

Табл.7.2.1. Найважливіші молекули на поверхні зрілих Т-лімфоцитів

Молекули	Їх ліганди	Функції
TCR (α/β)	Антигенний епітоп + МНС	Розпізнавання і зв'язування комплексу
CD3 (α,β)		Асоційований комплекс трансдукції сигналу
LFA-2 (CD2)	LFA-3 (CD58)	Адгезія, активація, рецептор еритроцитів барана
CD4 або CD8	МНС I або II кл.	Корецептор: зв'язує МНС-молекули
CD5	CD72 на В-клітинах	Скевенджер - рецептор, активація продукції IL-2 та експресії IL-2R
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1 (CD54)	Адгезія, активація
CD28 CTLA-4	B7.1 (CD80) B7.2 (CD86)	Адгезія, активація продукції IL-2 і експресії IL-2R
CD40L	CD40 на В-клітинах	Активація, індукція переключення синтезу Ig на інший ізотип В-клітинами
CD45R A, B		Експресований на найвних Т-клітинах
CD45RO	CD22 на В-клітинах	Експресований на активованих Т-клітинах і Т-клітинах пам'яті
CD44	CD58	Хомінг-рецептор в лімфовузлах
CD69	?	Активація проліферації і продукції цитокінів через Ca^{2+} опосередкований механізм
L-селектин (CD62L)		Хомінг рецептор

Т-лімфоцити - це складна за складом група клітин, яка походить від поліпотентної стовбурової клітини кісткового мозку, а дозріває і диференціюється в тимусі з попередників. На частку цих клітин припадає

близько 75 % всієї лімфоїдної популяції. Загальним маркером Т-лімфоцитів є CD3, а також рецептор до еритроцитів барана. Залежно від будови Т-клітинного антигенного TCR-рецептора (α , β - або γ - δ -), а також функціональної спрямованості популяцію Т-лімфоцитів розділяють на окремі групи (субпопуляції).

Професійно Т-лімфоцити також розділяють на дві субпопуляції: імунорегулятори та ефектори. Регуляцію імунної відповіді (що в основному активує) виконують Т-хелпери. Т-супресори забезпечують гальмування розвитку імунної реакції (супресія). Ефекторну функцію здійснюють цитотоксичні лімфоцити.

У організмі Т-лімфоцити забезпечують клітинні форми імунної відповіді (гіперчутливість сповільненого типу, трансплантаційний імунітет, протипухлинний імунітет і т. д.), визначають силу і тривалість імунної реакції. Їх дозріванням, диференціюванням і активністю управляють цитокіни.

Т-хелпери (Тх) - CD4⁺ (або Т-індуктори) - субпопуляція Т-лімфоцитів, які виконують регуляторну функцію. На частку цих клітин припадає близько 55% всієї популяції Т-лімфоцитів. На їх цитоплазматичній мембрані визначаються молекули CD4, а також α -, β -TCR до антигену, представленого в комплексі з МНС II класу. За допомогою специфічного рецептора Т-хелпер аналізує інформацію, що представляється йому АПК.

Рецепція антигена Т-хелпером, тобто аналіз його чужерідності- це складний процес, що вимагає високої точності, йому сприяє безліч чинників:

- Молекула CD3 у комплексі з TCR;
- ко-рецепторні молекули CD4, що мають спорідненість до молекулярного комплексу МНС II класу;
- молекули адгезії, що стабілізують міжклітинний контакт;
- рецептори, що взаємодіють з ко-стимулюючими чинниками

АПК (CD28, CD40L).

Продуктивна рецепція стимулює Т-хелпер до вироблення широкого спектру цитокінів, за допомогою яких він управляє біологічною активністю клітин, залучених в імунну відповідь.

Встановлена гетерогенність популяції Т-хелперів. Активованій $CD4^+$ Т-лімфоцит (**Tx0**) диференціюється в одного з своїх попередників: **Tx1** або **Tx2**. Це диференціювання є альтернативним, його напрям визначають цитокінові стимули. **Tx1** або **Tx2** - хелпери розрізняються лише функціонально - по спектру продукованих цитокінів.

Tx1 – продукує IL-2, IL -3, IFN- γ , TNF та ін. прозапальні цитокіни, які стимулюють проліферацію цитотоксичних Т-лімфоцитів і активують макрофаги, а також необхідні для розвитку клітинної імунної відповіді, гіперчутливості сповільненого типу та імунного запалення.

Tx2 - продукує IL -4, IL -5, IL -6, IL -9, IL -10, IL -13 і ін. протизапальні цитокіни, які стимулюють проліферацію, диференціювання В-лімфоцитів, а також синтез антитіл (особливо класу IgE) і підтримують гуморальну імунну відповідь, а також гіперчутливість негайного типу. Диференціювання у бік Tx2-типу потенціюють γ - δ - Т-клітини, базофіли, опасисті клітини та еозинофіли, що синтезують IL -4 і IL -13.

У організмі підтримується баланс **Tx1 / Tx2**. Він необхідний для розвитку адекватної імунної відповіді. Самі клітини знаходяться в конкурентних взаємовідносинах, вони гальмують клональний розвиток один одного. Цитокіни, що виділяються Tx1, пригнічують активність Tx2, і навпаки.

Tx3 – секретують TGF β . Ця субпопуляція клітин є суп ресорами імунної відповіді.

T-супресори - $CD4^+25^+$; $CD8^+HLA-DR^+$ – субпопуляція регуляторних Т-лімфоцитів, здатних індукувати супресію імунної відповіді і пригнічувати активацію інших лімфоцитів, опосередковуючи домінуючу імунологічну толерантність. Вона може бути як корисна

(запобігання аутоімунним захворюванням), так і шкідлива (пригнічення протипухлинної відповіді) для організму. Т-супресори регулюють самі різні форми гуморальної і клітинної імунної відповіді, включаючи гіперчутливість сповільненого типу, проліферацію цитотоксичних лімфоцитів і проліферацію антигенспецифічних лімфоцитів.

Клітини генетично запрограмовані для супресорної активності, відповідають на продукти генів МНС класу II (CD4) і МНС класу I (CD8).

В даний час описано велику кількість супресорних Т-кліток, що мають відмінні особливості:

- **Tc1** (CD4⁺) - клітки індуктори Т-лимфоцитів/супресорів, самостійно не проявляють супресивних властивостей. Антигенспецифічний фактор TcF1, який вони виділяють складається з α -TCR або β -TCR ланцюгів може індукувати появу Tc2-лімфоцитів;

- **Tc2** (CD4⁺ або CD8⁺) - супресорні ефektorні Т-клітини зв'язують антиген та секретують фактори, що інактивують Т-хелпери;

- **Tc3** – це антигензв'язуючий, несучий ідіотип ефektorний Т-супресор, що викликає супресію реакцій ГСТ;

- **Т-супресор** (CD4⁺CD25⁺) що розпізнають молекули (продукту) МНС I та експресують фактор транскрипції FOXP-3. Основним знаряддям пригнічення імунної відповіді CD4⁺CD25⁺ вважається продукція імуносупресорних цитокінів IL -10 і TGF- β .

- **Т-супресори**, що розпізнають молекули (продукту) МНС II класу та що запобігають проліферації клітин у відповідь на антиген або супресуючий секретію антитіл антигензв'язуючими В-клітинами;

- **Т-супресори**, що розпізнають ідіотип і що зв'язуються з ним чим і супресують секретію антитіл В-клітинами, що несуть відповідні антигенні детермінанти;

- **Контрсупресорні Т-клітини**. Вони запобігають інактивації Т-

хелперів супресорними ефекторними Т-клітинами. Про ці клітини відомо небагато: вони специфічні по відношенню до антигену і відіграють важливу роль в розвитку імунологічної пам'яті при активній супресії.

В цілому, на сьогодні виділяють вже більше 10 типів Т-клітин, а в майбутньому належить виявити ще більшу їх різноманітність. Проте у будь-якому випадку слід пам'ятати про те, що у різних класів Т-клітин антиген розпізнають різні рецепторні молекули.

Т-цитотоксичні – $CD8^{+}28^{+}$ (ЦТЛ) – субпопуляція Т-лімфоцитів-ефекторів. На їх частку доводиться ~ 25 % всієї популяції Т-лімфоцитів. На цитоплазматичній мембрані ЦТЛ визначається молекула CD8, а також α - β -TCR до антигену в комплексі з МНС I класу. У рецепції беруть участь молекула CD3, у комплексі з TCR, і ко-рецепторними молекулами CD8, тропні до МНС I класу. ЦТЛ розвиваються з попередників, які активуються комплексом антигену і молекул МНС-I класу, проліферують і дозрівають під дією IL -2, а також факторами диференціювання, що продукуються Т-хелперами.

ЦТЛ аналізують клітини власного організму у пошуках зміненої, тобто відмінної від власної, структури комплексу антиген - МНС I класу. Клітини, мутантів, клітини уражені вірусом, а також клітини аlogenного трансплантату несуть на своїй поверхні такі ознаки генетичної чужерідності і тому вони є мішенню для ЦТЛ.

ЦТЛ усувають мішені клітин шляхом антитіло незалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності, для чого синтезують ряд токсичних субстанцій: білок - **перфорин** (осмотичний лізис (некроз)), серинові протеази - **гранзими** (ферментативний апоптоз) і фермент - **гранулізин** (апоптоз, мітохондріальне пошкодження).

ЦТЛ володіють величезним біологічним потенціалом, за короткий термін вони можуть знищити декілька типів мішеней клітин, витрачаючи на

кожну ~ 5 хвилин. Ефекторну функцію ЦТЛ стимулюють Тх1 -хелпери, хоча у ряді випадків їх допомога не потрібна.

ЦТЛ забезпечують в організмі антителонезалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність, формування Т-клітинної імунологічної пам'яті і ГСТ. Активовані ЦТЛ синтезують IFN- γ , TNF, а також IL -4 і IL -5, стимулюють макрофаги та потенціюють імунне запалення.

Т-хелпери 1 типу (CD4+) та цитотоксичні Т-лімфоцити (CD8+) беруть участь у клітинній імунній відповіді. Антигенпрезентуючі клітини після процесингу поглиненого антигену представляють ЦТЛ чужерідні (мікробні) пептиди в комплекс із МНС I класу. ЦТЛ за допомогою свого рецептора – TCR та корецептора CD8 розпізнають мікробний пептид та МНС I класу. Ця взаємодія стабілізує CD40L Т-лімфоцита та CD40 АПК. Основним цитокином клітинної імунної відповіді є IL-12, який стимулює ріст та диференціацію CD4 Тх0 (у бік Тх1), CD8+ ЦТЛ та НК, а також індукує продукцію IFN- γ Т-лімфоцитами і НК, пригнічує апоптоз Тх1. Під дією IL-2 відбувається проліферація ЦТЛ. ЦТЛ впізнають клітини мішені, що інфіковані, наприклад вірусами: на клітинах-мішенях експресуються мікробні пептиди в комплексі з МНС I класу, що розпізнаються TCR та корецептором CD8+ цитотоксичного Т-лімфоцита. Активовані диференційовані ЦТЛ викликають загибель клітин-мішеней з участю перфोरину, гранзимів, гранулізинів, Fas-рецепторів і TNF.

В-лімфоцити

Диференціювання В-лімфоцитів відбувається в червоному кістковому мозку (або у бурсі Фабрицієвої сумки в клоаці птахів), де вони потрапляють під вплив стромальних клітин кісткового мозку, дендритних клітин, макрофагів та цитокинів. Дозрівання В-лімфоцитів відбувається у дві фази: антигеннезалежне та антигензалежне. Перша фаза антигеннезалежного дозрівання починається з стадії про-В-клітин. На цьому етапі гени

імуноглобулінів знаходяться в неперебудованій формі (в «зародковій конфігурації»), але вже експресовані гени RAG-1, RAG-2 та TdT, на поверхні клітин з'являються неваріабельні компоненти В-клітинного рецептора (BCR) — димери Ig α и Ig β (CD79a та b) та CD19 — самі ранні пан-В-клітинні (тобто присутні на всіх В-клітинах) маркери. На цій стадії ростовими факторами служать фактор стовбурових клітин та ІЛ-7. На етапі пре-В-I (великих пре В) відбувається зближення сегментів D та J V-генів H-ланцюгів, тобто реалізується перший етап реоранжировки цих генів. В цей час на поверхні клітини з'являється молекула — попередник імуноглобуліна — псевдо L-ланцюг, який вміщує продукти неваріабельних генів V_{preB} та $\lambda 5$. До моменту формування повноцінного (VDJ) V μ -гена псевдо-L-ланцюг на поверхні пре-В-II зв'язаний з білками p130 і p35/p65.

Перехід на стадію малих пре-В-клітин (пре-ВII) пов'язаний з завершенням перебудови V μ -гена та експресією μ -ланцюга. Останній з'являється одночасно у вільній формі в цитоплазмі клітини та в складі мембранного проторецептора у сполученні з псевдо-L-ланцюгом. При цьому ослаблюється експресія генів RAG-1, RAG-2 та TdT, яка знову підсилюється, що служить початком перебудови генів L-ланцюгів. Починаючи зі стадії малих пре-В и до повного дозрівання В-клітин, на поверхні цих клітин присутні загальні В-клітинні маркери — CD20 и CD72. Ростовим фактором служить ІЛ-7. На стадії малих пре-В відбувається перебудова генів L-ланцюгів, яка завершує процес генетичних претворень в лімфоцитах В-ряда. При цьому в кожній конкретній клітині перебудовується і експресується один тип L-ланцюгів — лише κ або лише λ , причому число κ^+ В-клітин майже в 10 раз перевищує чисельність λ^+ В-клітин. Наслідком реаранжировки генів L-ланцюгів є експресія останніх в складі повноцінного мембранного IgM в сукупності з іншими допоміжними молекулами рецепторного комплексу. Появлення на поверхні клітини сформованого BCR говорить про перехід клітин В-ряда на стадію незрілої В-клітини. Завершення генетичних претворень в генах BCR

знаходить відображення у заключній зупинці експресії генів RAG-1 та RAG-2. На цьому етапі розвитку руйнується приблизно 85—90 % незрілих В-лімфоцитів, вірогідно, внаслідок негативної селекції — руйнування аутоспецифічних клонів. Таким чином чисельність дозріваючих В-клітин лише в 10 раз перевищує число про-В-клітин, що першочергово вступили на шлях В-лимфопоезу.

Процес антигеннезалежного розвитку В-клітин завершується експресією IgD-рецептора, який співіснує з IgM-рецептором. IgM⁺IgD⁺-клітини позначають як зрілі В-лімфоцити. Експресія IgD-рецептора стає можливою завдяки переключенню С-генів, тобто прилеглий до V-гену С_μ-ген виключається з процесу транскрипції і замість нього зчитується наступний за ним С_δ-ген.

Після зв'язування В-клітини з антигеном починається друга антигензалежна фаза диференціювання. Відбуваються подальші переключення С-генів рецептора та послідовне виникнення на поверхні В-лімфоцитів рецепторів, що відносяться до різних підкласів IgG, потім — до IgE та IgA.

Активация В-лімфоцитів та їх диференціювання у антитілотворюючі плазматичні клітини є основою гуморальної імунної відповіді. В-лімфоцит відіграє роль антигенпрезентуючої клітини. BCR розпізнає антиген і клітина поглинає його. Після процесингу (розщеплення поглиненого антигену до низькомолекулярних пептидів та вбудовування їх в МНС II класу) В-лімфоцити представляють утворившийся комплекс Тх2, які взаємодіють з ними рецептором TCR та корецептором CD4. Тх2 експресують CD40L, який зв'язується з CD40 на В-лімфоциті, та клітини активуються комплексом CD40 + CD40 L. Відбувається проліферація В-лімфоцитів. Под впливом інтерлейкінів (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 та др.) експресивних Тх-2, відбувається переключення імуноглобулінових генів В-лімфоцитів, які синтезують імуноглобуліни різних класів.

Вирішальну роль в контролі розвитку клітин В-ряду відіграють кістковомозкове мікрооточення — клітини стромы та молекули міжклітинного матриксу, з якими клітини В-ряду контактують завдяки мембранним інтегринам, а також близькодючі гуморальні фактори. Для розвитку В-клітин і формування їх клональної структури важливі сигнали, що подають цитокіни, які виробляються клітинами стромы кісткового мозку. Уже зазначалось, що ІЛ-7 служить основним ростовим та диференційним фактором на стадіях про-В (наряду з фактором стовбурових клітин) та пре-В; можливо, ІЛ-7 визначає диференціювання клітин у напрямленні В-лімфоцитів. Виживанню и розвитку В-лімфоцитів на ранніх стадіях сприяють фактор стовбурових клітин, а також ІЛ-3. Навпаки, ІЛ-1 і ІЛ4 віднімають ростову дію ІЛ-7 на преВ-клітинах. В той же час ІЛ-1 сприяє експресії генів імуноглобулінів, а ІЛ-4 підвищує виживання преВ-клітин (у відсутності ІЛ-4 вони піддаються програмованій загибелі — апоптозу). TFR β пригнічує як ростовий, так і диференціальний ефекти ІЛ-7. Здійсненню диференціювання пре -В-клітин сприяє також інтерферон γ .

В-лімфоцити несуть частину поверхневих маркерів, спільних з іншими клітинами: рецептори для імуноглобулінів (FcR), для компонентів комплемента (CR1), антигени гістосумісності (MHC I та II класів). Унікальними поверхневими маркерами В-лімфоцитів є: імуноглобулінові антиген-розпізнавальні рецептори (поверхневі імуноглобуліни), деякі кластери диференціювання(CD)ірецепториВ-клітинних мітогенів.

табл.7.2.2 Найважливіші молекули на поверхні зрілих В-лімфоцитів

Молекули	Їх ліганди	Функції
IgR (H + L)	Епітоп антигену	Розпізнавання антигену
Ig (+ β (CD79a + b)		Асоційовані сигнал-трансдукційні молекули

CD19, CD20		Додаткові сигнал-трансдукційні молекули
FcγR II (CD32)	Fc фрагмент IgG	Зв'язування IgG у складі імунних комплексів або агрегатів
FcεR II (CD23)	Fc фрагмент IgE	Існує в розчинній формі. Є IgE-зв'язуючим фактором. Бере участь в регуляції синтезу IgE.
CR2 (CD21)	C3d, EBV	Опосередковує активацію В-клітин
MHC II класу	CD4 на Т-клітках	Бере участь в презентації антигена
CD40	CD40L на Т-клітинах	Індукує перемикання синтезу Ig на інший ізотип: IgM (IgG)
B7.1 (CD80) B7.2 (CD86)	CD28 на Т-клітинах CTLA-4 на Т-клітинах	Костимулюючі молекули забезпечують другий сигнал активації В-лімфоцитів
LFA-1(CD11a/CD18)	ICAM-1(CD54)	Адгезійні молекули
LFA-3 (CD58)	LFA-2 (CD2)	Сигнал-трансдукційні молекули

В-клітинний антиген-розпізнавальний рецептор (IgR) складається з мембранної форми IgD або IgM і асоційованих з ними гетеродимерів CD19 і CD20, що експресовані на всіх В-лімфоцитах. З IgR в мембрані В-лімфоцитів асоційовані дві трансмембранні молекули CD79a і CD79b, що беруть участь в трансдукції сигналу, в якій беруть участь і інші молекули В-клітинної поверхні: CD19, CD20. З інших кластерів диференціювання для зрілих і вступаючих в активацію В-лімфоцитів характерні наступні: CD21 - CR2 рецептор для C3d-фракції комплемента і вірусу Епштейна-Барр (EBV); CD23 - FcRII низькоафінний рецептор для IgE; CD40 - рецептор CD40L-ліганда, що опосередковує антиген-залежне диференціювання В-клітин і перемикання на синтез іншого ізотипу імуноглобулінів; CD80 (B7) - костимулююча молекула

для отримання другого сигналу активації від Т-лімфоцитів через CD28. Для виконання функції антиген-презентуючих клітин В-лімфоцити конститутивно експресують МНС II класу і костимулюючі молекули B7.1 (CD80) і B7.2 (CD86), експресія яких посилюється при їх активації. Всі зрілі В-лімфоцити експресують низькоафінні рецептори FcRII (CD32) для скріплення IgG у складі імунних комплексів або в агрегатах. Якщо Fc-фрагмент IgG у складі імунного комплексу зв'язується з CD32, а антиген у складі цього ж імунного комплексу зв'язується з IgR на тій же В-клітині, то вона інактивується, тобто CD32 може опосередковувати негативну регуляцію В-лімфоцитів.

В-лімфоцити можуть відповідати проліферацією на дію ряду мітогенів, зокрема на дію бактерійного ліпополісахариду (ЛПС). Однак у якості стандартного В-клітинного мітогену, як правило, використовують рослинного походження «pokeweed mitogen» (PWM), який з найбільшою постійністю індукує проліферацію В-лімфоцитів.

Близько 5×10^7 В-лімфоцитів залишають кістковий мозок щодня. Цього достатньо, щоб повністю відновити популяцію периферичних В-лімфоцитів за 4 - 5 днів. Зрілі В-лімфоцити виходять в кров і починають рециркулювати через периферичні лімфоїдні тканини. Близько 85% В-лімфоцитів, що знов утворилися, складають короткоживучі клітини, тривалість життя яких не перевищує 10 днів. Менша частина (близько 14%) мають середню тривалість життя 4 - 6 тижнів. Близько 1% всіх В-лімфоцитів складають В-клітини пам'яті, які можуть жити роками і десятиліттями. Поверхневі імуноглобулінові рецептори В-лімфоцитів пам'яті належать до різних ізотипів за винятком IgM і IgD. Вони локалізуються переважно в периферичних лімфоїдних органах і експресують високий рівень CD44, що опосередковує хомінг лімфоцитів в тканині. Особливістю В-клітин пам'яті є здатність швидко відповідати на зустріч з причинним антигеном проліферацією, диференціюванням в плазматичні клітини і швидким

перемиканням на синтез IgG, IgA або IgE, які продукуються цими клітинами у великих кількостях і характеризуються високою афінністю. Для розвитку повноцінної імунної відповіді (вторинного) буває досить меншої дози антигена. В-лімфоцити пам'яті чутливіші до дії активуючих цитокінів - продуктів Т-хелперів.

Щоб уникнути загибелі при проліферації і диференціюванні в зародкових центрах, В-лімфоцит повинен одержати одночасно два сигнали активації: від антиген-розпізнавальних рецепторів при «зшиванні» поверхневих імуноглобулінів антигенним комплексом і від взаємодії CD40 з лігандом CD40L на Т-лімфоцитах. Після цього йде диференціювання В-лімфоцитів в плазматичні клітини або в клітини пам'яті. Всі ці процеси контролюються відповідними цитокінами. Спочатку В-лімфоцити активуються антигеном за участю ІЛ-4, потім вони проліферують у відповідь на ІЛ-5 і перетворюються на плазматичні клітини під дією ІЛ-6, який дає термінальний сигнал диференціювання В-лімфоцитів.

В-лімфоцити пам'яті (CD27⁺) – довгоживучі клітини, що несуть на своїй мембрані IgG та IgA чим і відрізняються від звичайних В-лімфоцитів, що несуть IgM або IgM/D. Мають молекулу CD27, яка в результаті взаємодії з молекулою CD70 транслює сигнали, що сприяють проліферації та диференціюванню В-лімфоцитів в плазматичні клітини. В-лімфоцити пам'яті, стимульовані антигеном, прямують в червоний кістковий мозок, де вони перетворюються в антитілотворючі плазматичні клітини.

При порушеннях диференціювання В-лімфоцитів розвиваються імунодефіцити, що проявляється нестачею або відхиленнями в спектрі синтезованих імуноглобулінів. Клітинний імунітет відносно зберігається, але із-за пригнічення механізмів антиідиотипічної регуляції, можливі аутоімунні синдроми.

Таким чином лімфоцити є головними клітинами імунної системи. Вони забезпечують специфічність імунної відповіді на конкретні

антигени. Це досягається завдяки присутності на їх поверхні антигенрозпізнавальних рецепторів.

Запитання:

1. Як проходить розвиток Т-лімфоцитів.
2. Назвіть субпопуляції Т-лімфоцитів, їх властивості.
3. Які види селекції лімфоцитів ви знаєте?
4. Основні маркери Т-лімфоцитів
5. Функціональна здатність Т-лімфоцитів, їх роль у розвитку клітинної імунної відповіді
6. Онтогенез В-лімфоцитів.
7. Назвіть найважливіші маркери В-лімфоцитів.
8. Функціональна здатність В-лімфоцитів, їх роль у розвитку гуморальної імунної відповіді.
9. Які цитокіни секретують Т- і В-лімфоцити ?
10. Які лімфоцити є антигенпрезентуючими клітинами.

Література

1. Иммунология: в 3-х т. Т.1. Перевод с нгл. / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1988. – 476 с.
2. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб пособие. – К. Вища школа, 1989. – 736 с.
3. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология. – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
4. А.Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. Иммунология. – Москва «Мир», 2000. – 592с.
5. Плейфер Дж. Наглядная иммунология. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – 96 с.
6. . Morgan B., Walport M. Complement deficiency and disease // Immunology Today, 1991, v. 12, P. 301-306.
7. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes // Annu. Rev. Immunol., 1992, v. 10, P. 97-108.
8. Robey E., Fowlkes B. Selective events in T cell development // Annu. Rev. Immunol., 1994, v. 12, P. 675-682.
9. Parkman R. The biology of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. // Adv. Immunol., 1991, v. 49, P. 381-388.
10. Shemizu Y., Newman W., Tanaka Y., Shaw S. Lymphocyte interaction with endothelial cells // Immunology Today, 1992, v. 13, P. 106-111.
11. . Kaufman S. Immunity to intracellular bacteria // Annu. Rev. Immunol., 1993, v. 11, P. 129 -140.
12. Benjamini E., Sunshine G., Leskowitz S. Immunology, a short course. WILEY-LISS, New York, 1996, 451 p.

13. Clark E., Ledbetter J. How B and T cells talk to each other // Nature, 1994, v. 367, P. 425-427.
14. Bona C., Bonilla F. Textbook of immunology, second ed., Harwood Acad. Publ., Amsterdam, 1996, 406 p
15. А.А.Ярилин. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
16. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии). Учебник для студентов мед ВУЗов. – СПб.: 2005. – 656с.

7.3 Мононуклеарні фагоцити

Говорячи про фагоцити необхідно згадати, що перші класичні дослідження цих клітин провів видатний вчений І.І. Мечніков ще у кінці ІХХ і на початку ХХ століття. Він підійшов до фагоцитів та мікро- і макрофагам із порівнянно-еволюційних позицій, блискуче висвітив їх роль в процесі запалення як універсальної захисно-приспосованої реакції багатоклітинних організмів. І.І. Мечніков та його послідовники вважали основною здатністю фагоцитуючих клітин поглинальну та бактерицидну функції, з якими вони пов'язували їх участь у антимікробному імунітеті.

У 20-х роках, вчення І.І. Мечнікова про фагоцитоз лягло в основу концепції про ретикулоендотеліальну систему, а у 30-40 р. – вчення про систему сполучної тканини. В кінці 50-х – 60-х років уявлення про систему сполучної тканини почали змінювати імунологічні концепції. Замість системи сполучної тканини все частіше стали говорити про «систему імунологічного гомеостазу», та в кінці кінців лімфоцити, що забезпечують специфічні імунні реакції, зайняли привілейоване положення, а усі інші фагоцитуючі клітини сполучної тканини та крові – допоміжне. У області вивчення лімфоцитів досягли великих успіхів, впорядкували уявлення про структуру популяції лімфоцитів і про молекулярні механізми специфічних імунних реакцій. Виявлено, що макрофаги є антигенпрезентуючими клітинами. Макрофаги представляють антиген Т-лімфоцитам в зручній для них формі для того, щоб в подальшому лімфоцитарному механізмі легше було ним маніпулювати.

Були відкриті фактори лімфоцитарного походження – лімфокіни, які, як вважали, робили макрофаги слухняними виконавцями волі лімфоцитів.

За останні 50 років проявлення лімфоцитарного центризму стали поступово слабшати, і фагоцити, які довгий час були низведені до «чистильників», почали відновлювати своє положення і входити в число «імунологічно респектабельних клітин». Накопичились факти, що свідчать про те, що фагоцитуючі клітини не лише полегшують лімфоцитам здійснювати специфічну імунну відповідь, але самі беруть участь в патогенезі алергічних реакцій негайного (нейтрофіли) або сповільненого типу (ГСТ) (макрофаги). Вперше первинні уявлення про макрофаги як допоміжні клітини в імунитеті показували роботи Мекеніза (1971), в яких продемонстрована ефекторна роль макрофагів у розвитку ГСТ і у формуванні протиінфекційної перехрестної резистентності. У ті ж роки у загальних рисах сформувалась концепція про систему мононуклеарних фагоцитів. З'ясувалось, що усі зрілі органо- і тканиноспецифічні макрофаги, а також фагоцитуючі мононуклеари з вогнищ запалення мають єдиного попередника – кровотворну стовбурову клітину кісткового мозку. Периферичний пул макрофагів представлений мігруючими клітинами та клітинами-резидентами з тривалим життєвим циклом. Він поповнюється за рахунок моноцитів циркулюючої крові. А.Н. Маянський у своїй монографії (1983) показав, яку важливу роль в патогенезі запалення, репаративної регенерації та фіброгенезу відіграє секреторна функція макрофагів. Роздивляючись макрофаг з позиції загальної патології, він хотів показати макрофаг, як клітину «на всі випадки життя», кінцева роль функціонування якої у масштабах організму – підтримання структурного гомеостазу. Інтерес до макрофагів різко зріс з кінця 60-х - початку 80-х рр. Почали регулярно виходити колективні праці, в яких проводились підсумки вивчення макрофагів з різних сторін, але головним чином в реакціях специфічного імунітету. Наряду з цим «макрофагальні проблеми» роздивляли і окремі

автори, в тому числі І.Я. Учитель – «Макрофаги в імунитеті» (1978) та Я.Карр – «Макрофаги, обзор ультраструктуры и функции».

Система мононуклеарних фагоцитів - велика популяція клітин імунної системи, яка включає кістковомозкові попередники, що походять з єдиної стовбурової клітини - монобласт та промоноцит, циркулюючий в крові моноцит та зрілі тканьові макрофаги.(рис.7.3.1).

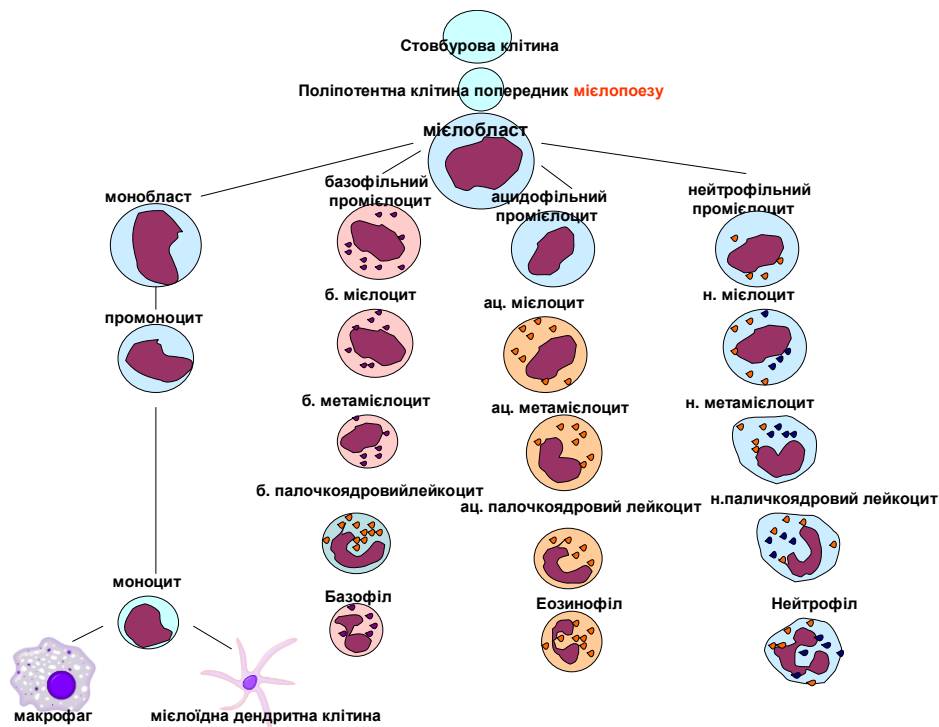


Рисунок 7.3.1 - Схема мієлопоезу

Фагоцити забезпечують в значній мірі неспецифічний захист організму за рахунок своєї фагоцитарної функції.

Фагоцитоз – поглинення моноцитами/макрофагами і гранулоцитами (нейтрофілами, еозинофілами, базофілами) часток діаметром більш 0,1 мкм,

в.т.ч. бактерій або крупних макромолекулярних комплексів. Фагоцитоз є різновидом ендоцитозу. Клітини організму поглинають ендоцитозом будь-які речовини з навколишнього середовища через спеціальні ділянки у своїй мембрані. Поглинання маленьких рідких частинок називається піноцитозом, або рідкофазним ендоцитозом. Рецептор-опосередкований ендоцитоз починається із взаємодії об'єкту ендоцитозу з рецепторами мембрани клітини і формування мембранних «обмежених ямок», вкритих всередині білковим комплексом, що називається клатрином. Везикули, вкриті клатрином, або «обмежені ямки», фагосоми, з'єднуються з лізосомами, в результаті чого антигени перетравлюються.

Фагоцитоз включає наступні етапи: 1) активація фагоцита; 2) хемотаксиси; 3) прикріплення (адгезія) до об'єкту фагоцитоза; 4) поглинення об'єкта; 5) кілінг та перетравлення, процесинг (перетравлення) об'єкта фагоцитозу.

Фагоцити направлено транспортуються до об'єкту фагоцитоза у сторону підвищення концентрації хемоаттрактантів – речовин мікроорганізмів, активованих компонентів комплемента (C5a) та цитокінів. Процес фагоцитозу підсилюють опсоніни, що оточують об'єкт фагоцитоза. **Об'єкт фагоцитозу прилипає (адгезія) до рецепторів фагоцита.** Псевдоподія – вип'ячування клітини, охоплює бактерію або іншу корпускулу. Потім об'єкт фагоцитозу оточується плазмо лемою по так називаємому «zipper»-механізму (від англ. Zipper – застібка «молнія»); утворюється мембранна везикула (фагосома), яка занурюється в цитоплазму фагоцита (рання ендосома). Мембрана ранньої ендосоми (фагосоми) зливається з лізосомою, утворюючи фаголізосому (пізню ендосому). В пізніх ендосомах мікроорганізм руйнується: відбувається закислення (рН до 4,5) і активація ферментів лізосом (нуклеаз, протеаз глікозидаз, ліпаз, фосфатаз, сульфатаз, фосфоліпаз).

Макрофаги, моноцити

Макрофаги постійно дозрівають з циркулюючих в крові моноцитів, що мають кістковомозкове походження. Залишаючи кров'яне русло, дозріваючі макрофаги мігрують в різні тканини організму. У легенях вони представлені альвеолярними макрофагами. Велика кількість макрофагів знаходиться в сполучній тканині, в лімфовузлах і лімфоїдній тканині, що асоціюється із слизовими, зокрема із слизовими повітряноносних шляхів. Оновлення тканинних макрофагів відбувається в основному за рахунок рекрутування моноцитів з крові.

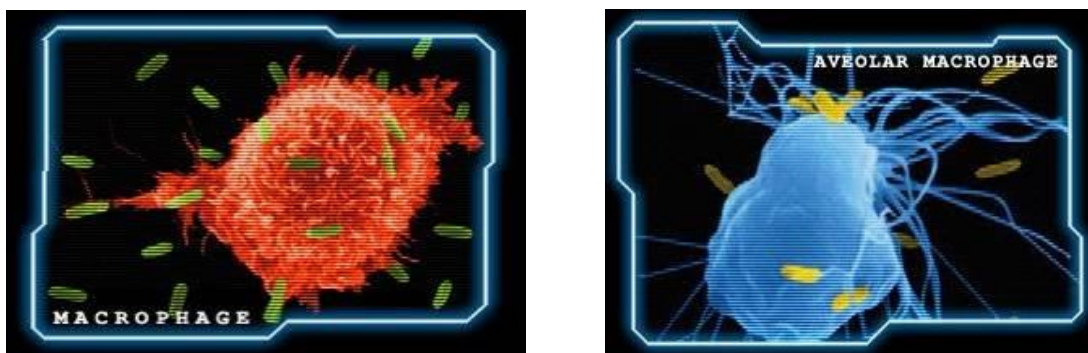


Рисунок 7.3.2 - Різновиди макрофагів

Макрофаги беруть найактивнішу участь в неспецифічному захисті від патогенних мікроорганізмів, в ранній запальній відповіді на інфекцію, в «запусканні» специфічної імунної відповіді, в клітинно-опосередкованій імунній відповіді. У вогнищі гострого запалення в перші години моноцити/макрофаги складають менше 5% інфільтруючих клітин, значно поступаючись за чисельністю гранулоцитам, проте через 24-48 годин від початку запалення макрофаги стають домінуючими клітинами інфільтрату, бо приходять на зміну швидко гинучим нейтрофілам .

Молекули, що секретуються макрофагами виконують ефektorні і регуляторні функції. При формуванні специфічної імунної відповіді макрофаги виконують функцію представлення (презентації) антигену Т-

лімфоцитам, тобто є антигенпрезентуючими клітинами. Для цього захоплений макрофагами антиген піддається переробці у фаголізосомах. Пептидні фрагменти антигену, утворені в результаті обмеженого протеолізу, комплексуються з молекулами антигенів головного комплексу гістосумісності II класу і експресуються на мембрані макрофага у формі, що доступна для розпізнавання Т-лімфоцитами. Крім того, цитокіни, що секретують макрофаги, зокрема інтерлейкін-1, сприяють активації Т-лімфоцитів при їх відповіді на антиген. **Участь макрофагів в ефекторній фазі специфічної імунної відповіді проявляється безпосередньо їх мобілізацією у вогнище імунного запалення під впливом лімфоцитарних продуктів.** Інші цитокіни лімфоцитарного походження, зокрема ІФН- γ , здатні активувати макрофаги: підвищувати їх мікробіцидність і цитотоксичність. Такі активовані макрофаги виконують функції основних ефекторних клітин клітинно-опосередкованої імунної відповіді. **Макрофаги також беруть участь в ефекторній фазі гуморальної імунної відповіді, захоплюючи і знищуючи патогенні бактерії, опсонізовані специфічними антитілами і комплементом.** Для цього на мембрані макрофагів експресовані спеціальні рецептори: FcR – для імуноглобулінів, що з'єднані з відповідними антигенами мікроорганізму, і CR1, CR3 та CR4 – для фракцій активованого комплементу. Найбільш відомі рецептори для Fc-фрагментів IgG: Fc γ RI (CD64) – високоафінний рецептор; Fc γ RII (CD32) – рецептор з меншою афінністю; Fc γ RIII (CD14) – низькоафінний рецептор.

На мембрані макрофагів експресовані різні рецептори для захоплення мікроорганізмів: макрофагальний манозний рецептор (MMR), scavenger-рецептор (MSR), рецептори для бактерійного ліпополісахариду (CD14). MMR опосередкує захоплення багатьох мікроорганізмів: *Mycobacteria*, *Leishmania*, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* і ін. Через MSR проходить ендоцитоз модифікованих ліпопротеїнів при перетворенні макрофага у пінисту клітину. Через ті ж MSR можуть фагоцитиуватись більшість бактерій як грам-

позитивних, так і грам-негативних. Проте вплив бактерійного ліпополісахариду (ЛПС) на макрофаги опосередкований спеціальним рецептором CD14. Експресія цього рецептора підвищується на макрофагах при запаленні та імунній відповіді. Можлива участь CD14 в процесі адгезії моноцитів до ендотеліальних клітин, хоча оборотня адгезія моноцитів до ендотелію при трансендотеліальній міграції пов'язана з іншим компонентом мембрани - CD31. На моноцитах крові експресоровані два β_2 – інтегрини: LFA-1(CD11a) та Mac-1(CD11b), а також β_1 – інтегрин VLA-4(CD29).

Їх лігандами на ендотеліальних клітинах є адгезійні молекули ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, фібриноген, фібронектин та ін. Експресія цих ліганд на ендотеліальних клітинах зростає під впливом прозапальних цитокінів (TNF α , IL-1, IFN γ).

Таблиця 7.3.1 - Поверхневий фенотип моноцитів/макрофагів

Поверхневі молекули	Позначення маркерів	Функції
МНС I та II кл.	CD 74	Антигени гістосумісності
LFA-1	CD11a/CD18	Адгезійні молекули
LFA-3	CD58	
ICAM-1	CD54	
ICAM-2	CD102	
B7	CD80	
MMR, MFR		Манозний або манозо-фукозний рецептори або лектиноподібні поверхневі молекули для прикріплення мікроорганізмів
LLM		
CR1	CD35	Рецептор C3b, iC3b
CR3	CD11b/CD18	Рецептори iC3b, адгезійні молекули
CR4	CD11c/CD18	
C5aR		Рецептор C5a - хемоатрактанту
Fc γ RI	CD64	Рецептори IgG
Fc γ RII	CD32	
Fc γ RIII	CD16	
Fc ϵ RII	CD23	Рецептор низькоафінних IgE
IL-1R	CDw121	Рецептор інтерлейкіна 1
TNFR	CDw120a,b	Рецептори туморнекротичного чинника
GM-CSFR	CDw116	Рецептор ростового чинника GM-CSF
IFN γ R	CDw119	Рецептор IFN- γ
β_2 інтегрин	CD18	Рецептор ліпополісахариду (ЛПС)
	CD14	Рецептор ЛПС-зв'язуючого білка сироватки крові

Альвеолярні макрофаги відповідальні за очищення від вдихуваних чужорідних частинок різної природи. Взаємодія альвеолярних макрофагів з частинками, що видаляються, через певні рецептори визначає вираженість запальної відповіді: від мінімальної до активного запалення з пошкодженням легеневої тканини. Відповідь альвеолярних макрофагів істотно відрізняється залежно від рецепторів, що залучені при фагоцитозі часток. Максимально виражена запальна відповідь на захоплення опсонізованих частинок через Fc-рецептори, від яких відходить міцний сигнал активації респіраторного вибуху, секреції TNF α і хемокінів. Опсонін-незалежний фагоцитоз не супроводжується такою вираженою активацією метаболізму макрофагів. Захоплення неопсонізованих частинок альвеолярними макрофагами можливе через інтегровані рецептори або через рецептори для різних поверхневих компонентів часток: лектиноподібні (MMR) для вуглеводів, рецептори для залишків апоптотических клітин, сквенджер-рецептори для модифікованих LDL та ін. Експресія всіх цих рецепторів регулюється прозапальними цитокінами. Їх експресією визначається роль альвеолярних макрофагів як бар'єру на шляху проникнення в організм різних компонентів забруднень повітря (air pollutions).

Таблиця 7.3.2 - Антимікробні компоненти вмісту лізосом

Компоненти	Функції
Кислі гідролази (протеінази, нуклеази)	Гідролітичні ферменти з оптимумом при низьких значеннях рН, розщеплюють макромолекули бактерій
Нейтральні протеази	Розщеплюють білки бактерій
Лізоцим	Мурамідаза, руйнує клітинну стінку бактерій
Катіонні білки	Проявляють бактерицидність за рахунок підвищення проникності клітинної стінки бактерій
Дефензиви	Утворюють пори в мембранах, викликають одноланцюгові розриви в молекулі ДНК у бактерій
В12 - що зв'язує білок	Інгібує В12-залежні ферменти, що беруть участь в синтезі ДНК у бактерій
Лактоферин	Зв'язує залізо, інгібує залізо-залежні ферменти, що беруть участь в біологічному окисненні у бактерій

Коли патогенний мікроорганізм долає епітеліальний бар'єр, в субепітеліальній сполучній тканині він зустрічається з макрофагом. Взаємодія мікроорганізму з макрофагом спричиняє за собою декілька наслідків. По-перше, мікроорганізм захоплюється, вбивається і перетравлюється всередині макрофага. Цих подій може опинитися достатньо для запобігання подальшому розвитку інфекції. Проте багато патогенних мікроорганізмів в процесі еволюції паразитизму придбали чинники стратегії, що дозволяють їм уникнути захоплення, або внутріклітинної загибелі та перетравлення в макрофагах. Так, наприклад, полісахаридна капсула оберігає пневмококи та клебсієли від взаємодії з рецепторами макрофагів. Інфікуюча доза мікроорганізмів може бути така велика, що макрофаги не справляються з їх елімінацією. Проте взаємодія мікроорганізмів з рецепторами макрофагів має ще один важливий наслідок - індукцію продукції і секреції прозапальних цитокінів, що забезпечують розвиток ранньої запальної відповіді на інфекцію. Крім того, захоплення і переробка макрофагами збудника є першою фазою індукції специфічної імунної відповіді на його антигени. **Макрофаги відносяться до професійних антигенпрезентуючих клітин, здатних взаємодіяти з Т-лімфоцитами.**

Таблиця 7.3.3 - Секреторні продукти макрофагів

Групи	Продукти
Лізосомні ферменти	Протеази, (дезоксид) рибонуклеаза, ліпази, лізоцим, мієлопероксидаза
Кисневі радикали	Перекис водню, супероксид, нітроксид і ін.
Цитокіни	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN α/β , CSFs, TGF, FGF, PDGF
Інгібітори цитокінів	IL-1 inh
Гормони	Адренкортикотропний гормон, тимозин, β -ендорфин, вітамін Д3
Метаболіти арахідонової кислоти	Простагландини, лейкотрієни, тромбосани
Інгібітори протеаз	α 2-макроглобулін і ін.
Компоненти комплемента	C1 - C9
Компоненти позаклітинного матриксу	Фібронектин, тромбоспондин, хондроїтин сульфат
Зв'язують білки	Трансферин, авидин, аполіпопротеїн Е

На мембрані макрофагів експресовані рецептори для багатьох регулюючих цитокінів, головним активуючим серед яких є $IFN\gamma$. Дозрівання, диференціація і активація макрофагів залежать від ростових чинників: GM-CSF і M-CSF. Альтернативним регулюючим цитокіном для макрофагів є IL-10, що інгібує всі властивості і функції макрофагів, які стимулює $IFN\gamma$. Проміжний вплив на функції макрофагів роблять IL-4, IL-13, M-CSF і TGF β .

Серед продуктів секреції макрофагів головне місце займають прозапальні (IL-1, IL-6, TNF α IL-8, IL-12) і протизапальні (IL10, TGF β) цитокіни. Макрофаги продукують і секретують чинники зростання для аутокринної регуляції і для регуляції інших клітин (фактор росту фібробластів). Серед монокінів виявляються хемокіни для різних клітин. Продукти макрофагів забезпечують адгезію лейкоцитів до ендотелію судин і подальшу трансендотеліальну міграцію (TNF α , IL-8 і ін. хемокіни).

Макрофаги є джерелом цитокінів та костимулюючих молекул, необхідних для активації Т- і В-лімфоцитів. При цьому експресія костимулюючих молекул на мембранах макрофагів модулюється цитокінами і вони можуть діяти в синергізмі з костимулюючими молекулами. З іншого боку, продуковані Т-лімфоцитами цитокіни впливають на макрофаги, викликаючи їх активацію. Основний стимулятор макрофагів - $IFN\gamma$ - стимулює продукцію макрофагами IL-12 і костимулюючих молекул B7.1(CD80) і B7.2(CD86). Цитокіни IL-6 та IL-12 у синергізмі з молекулами B7 підсилюють проліферацію Т-лімфоцитів і їх диференціацію. На Т-лімфоцитах лігандами для костимулюючих молекул B7 служать молекули CD28 і CTLA-4.

$IFN\gamma$, крім того, індукує продукцію макрофагами додаткового ростового фактора Т-лімфоцитів - IL-15, що має багато загальних властивостей з IL-2. Активовані Т-лімфоцити разом з $IFN\gamma$ продукують

фактор інгібуючий міграцію (MIF), який в синергізмі з $\text{TNF}\alpha$ індукує продукцію макрофагами нітроксидних радикалів.

Разом з прозапальними цитокінами, що активують макрофаги, існують протизапальні цитокіни, що інгібують окремі функції макрофагів: IL-4, IL-10, IL-13, $\text{TGF}\beta$. IL-10, який продукують і макрофаги, і Т-лімфоцити, пригнічує багато функцій макрофагів: знижує експресію B7, інгібуює продукцію і активність MIF, $\text{TNF}\alpha$, IL-12. На відміну від цього IL-4 і $\text{TGF}\beta$ інгібують секрецію монокінів, але не знижують експресії костимулюючих молекул B7. Всі протизапальні цитокіни пригнічують продукцію макрофагами нітроксидних радикалів. В ролі інгібіторів можуть виступати і інші цитокіни, наприклад IL-2, який може індукувати продукцію макрофагами $\text{TGF}\beta$. Останній знижує мікробіцидність макрофагів, інгібуючи продукцію нітроксидних радикалів, інгібуює продукцію простагландину E2, а на Т-лімфоцитах знижує експресію рецепторів для IL-2. Інгібіторним ефектам $\text{TGF}\beta$, можуть протистояти стимулюючі ефекти $\text{IFN}\gamma$ та $\text{TNF}\alpha$, які продукуються паралельно з IL-2. Кінцевий результат активації або деактивації макрофагів багато в чому залежить від особливостей мікрооточення. На відміну від певного напряму диференціювання Т-лімфоцитів (в $\text{T}_\text{H}1$ або $\text{T}_\text{H}2$), активація макрофагів, як правило, не приводить до такого цілеспрямованого диференціювання, а може проявитися виборчою активацією окремих функцій макрофагів.

Дисфункції макрофагів можуть бути наслідком дефектів гуморальних чинників: антитіл, системи комплемента, цитокінів, які необхідні для їх активації. Дисфункції макрофагів можуть бути проявами дефектів їх метаболічних шляхів. Найбільш істотними для підтримки захисних функцій фагоцитів є метаболічні шляхи, що забезпечують мікробіцидність фагоцитів. Тому найбільш істотними можуть виявитися дефекти таких ферментів, як мієлопероксидаза, глюкозо-6-фосфат-

дегідрогеназа, кисла і лужна фосфатази, лізосомні гідролази, нейтральні протеази.

Генетичні дефекти моноцитів/макрофагів можуть торкатися окремих їх функцій: рухливості, хемотаксису, адгезії (при порушенні синтезу і експресії адгезійних молекул або їх компонентів), бактерицидності (при порушенні киснево-залежних або киснево-незалежних механізмів). Набуті іммунодефіцити з дефектами функцій макрофагів найчастіше розвиваються в результаті перенесених інфекцій. Деякі віруси та найпростіші здатні синтезувати копії FcR, які зв'язують антитіла, що утворилися, через Fc-фрагменти і перешкоджають активації захисних функцій макрофагів (фагоцитозу). Патогенні мікобактерії містять сульфатиди та гліколіпіди, які інгібують злиття лізосом з фагосомами, та продукують ряд ферментів, що нейтралізують реактивні кисневі радикали фагоцитів. Лейшманії секретують протеази, що інактивують лізосомні ферменти, або інгібують респіраторний вибух. Деякі бактерії продукують екзотоксини, що одержали назву лейкоцидини, які викликають дезінтеграцію лізосом всередині макрофагів, що приводить до руйнування клітинної органели і до загибелі клітин. Багато з внутріклітинних паразитуючих бактерій, найпростіших і вірусів усередині макрофагів по-різному інтерферують із складною системою внутріклітинної трансдукції сигналів. Викликане ними порушення взаємозв'язків між протеїнкіназами, фосфоліпазами та іншими молекулами внутріклітинних вторинних месенджерів призводить до деактивації макрофагів. При цьому знижується переробка захоплених антигенів, експресія антигенів гістосумісності МНС II класу, презентація антигенів, продукція цитокінів, страждають і захисні функції макрофагів. У людей, інфікованих плазмодіями або трипаносомами, була описана поява «супресивних макрофагів», секретуючих цитокін, який інгібував і секрецію IL-2 та експресію IL-2R на T-лімфоцитах. Такі

дефектні макрофаги можуть пригнічувати Т-лімфоцити через клітинні контакти, що залучають поверхневі регуляторні молекули.

Описаний рідкісний набутий дефект макрофагів під назвою «малакоплакія», при якій запальні гранулеми утворюються в різних тканинах, частіше - в епітелії сечостатевого тракту. У складі таких гранулем виявляються крупні мононуклеари з мінералізованими агрегатами бактерій у фагосомах (тільца Michaelis-Gutman'а). Передбачається дефект деградації захоплених бактерій.

Дендритні клітини та клітини Лангерганса

За останні 10 років уявлення про дендритні клітини, їх походження і функції значно уточнилися. Доведено кістково-мозкове походження дендритних клітин. Можливі два шляхи диференціювання: з окремої клітини-попередника дендритної клітини або із загального попередника мієломоноцитарної серії, який диференціюється до стадії моноцита, а моноцит може диференціюватися або в тканинний макрофаг, або в дендритну клітину (рис 7.3.2). Попередники дендритних клітин з кісткового мозку через кров'яне русло заселяють різні нелімфоїдні тканини: епідерміс шкіри, слизові оболонки повітроносних шляхів, шлунково-кишкового і уrogenітального трактів, інтерстиціальні тканини серця, нирок і інших органів. У епідермісі шкіри і слизових повітроносних шляхів ці клітини носять назву «клітини Лангерганса». Міграція дендритних клітин-попередників з периферичної крові в шкіру може бути пов'язана з тим, що на них посилюється експресія ліганд для селективів ендотелію. Одночасно на ендотеліальних клітинах дермальних капілярів посилюється експресія E-селективів. Заселення нелімфоїдних тканин дендритними клітинами стимулює ростовий чинник - GM-CSF .



Рисунок 7.3.3 - Походження дендритних клітин

Посилена продукція GM-CSF в легеневій тканині при запаленні приводить до рекрутування в легеневу тканину клітин типу Лангерганса. Самі найперші клітини, що мігрують у вогнище бактерійного запалення в легенях - це дендритні клітини - попередники, які експресують антигени МНС II класу. Транспортовані клітини залишаються у зв'язку з епітеліальними і диференціюються в типові дендритні клітини. Дендритні клітини рекрутують в епітелій дихальних шляхів у відповідь на аерозольне введення ліпополісахариду бактерій (ЛПС). Той же ЛПС, очевидно, через

індукцію синтезу TNF може послужити сигналом переходу дендритних клітин з периферичної тканини в дренуючий лімфовузол. У нелімфоїдних тканинах відбувається початкове диференціювання дендритних клітин, де вони набувають максимальної активності.

Прозапальні цитокіни (IL-1, TNF α) викликають прискорене дозрівання дендритних клітин та їх міграцію з нелімфоїдних органів у кров або в аферентну лімфу. Таким чином дендритні клітини мігрують в лімфовузли, де їх фенотип різко змінюється і вони перетворюються на зрілі «презентуючі» клітини, що експресують на мембранах коstimулюючі молекули та здатні ініціювати специфічну відповідь Т-лімфоцитів. До цитокінів, що підсилюють диференціювання дендритних клітин, відносяться: TNF α , GM-CSF IL-4, IFN γ . На відміну від цього продукований кератиноцитами IL-10 пригнічує антигенпрезентуючі функції дендритних клітин. Дендритні клітини разом з макрофагами і В-лімфоцитами є професійними антиген-презентуючими клітинами. Дендритні клітини найбільш активні в ініціації первинної імунної відповіді.

Дендритні клітини мають багато подібностей з макрофагами, але мають і істотні відмінності. Фагоцитарною активністю володіють лише незрілі дендритні клітини на ранніх стадіях диференціювання в нелімфоїдних тканинах, наприклад клітини Лангерганса. Основний шлях захоплення антигену, властивий дендритним клітинам, - це макропіноцитоз, в результаті якого антиген транспортується у вакуоль, де переробляється, а пептиди, що утворилися, з'єднуються з молекулами МНС. Як правило, дендритні клітини захоплюють антиген на периферії (у нелімфоїдних тканинах), після чого вони мігрують в лімфовузли, де презентують цей антиген для розпізнавання ТКР і активації Т-клітин.

Таблиця 7.3.4 - Характеристики професійних антиген-презентуючих клітин

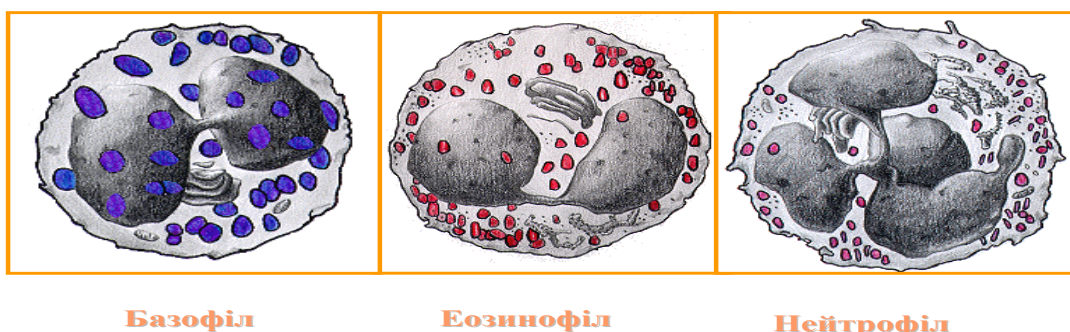
Типи клітин		Макрофаги	Дендритні клітини	В-лімфоцити
Експресія	Конститутивна	++	+++	++
МНС II кл.	Індукується	IFN γ , TNF α	IFN γ , TNF α	IL-4 але не IFN γ
Рецептори		FcR CR1	FcR	SIg, FcR CR1
Адгезійні молекули		B7, LFA-1, ICAM-1,	LFA-2, LFA-3, ICAM-2	B7, LFA-1, LFA-3, CD72, CD22, CD54
Продукція і секреція IL-1		+++	+	+
Здатність до:				
Фагоцитозу		+++	-	-
Піноцитозу		+++	+++	+
Переробка антигену		+++	+	+
Презентація антигену		+	+++	+++

При цьому відбувається переключення функцій дендритних клітин із захоплення антигену на стимуляцію Т-лімфоцитів, тому на мембрані дендритних клітин починають експресуватися відповідні адгезійні (ICAM-1, LFA-3) і ко-стимулюючі (B7-1, B7-2, CD40) молекули, а також молекули CD44, що контролюють міграцію дендритних клітин в лімфоїдні органи. **Дендритні клітини можуть презентувати перероблений у фаголізосомах антиген в комплексі з молекулами МНС II класу, а розчинні екзогенні антигени - в комплексі з молекулами МНС I класу.** При цьому захоплення антигену і його презентація роз'єднані в часі та просторі. На відміну від макрофагів дендритні клітини не здатні виконувати функції «двірника» з перетравленням захоплених білків до окремих амінокислот. У дендритних клітин ендцитоз служить лише першим етапом презентації антигену. Вони вважаються найбільш активними з професійних антигенпрезентуючих клітин, здатних презентувати і власні аутоантигенні епітопи, та туморасоційовані антигенні епітопи. Крім того, дендритні клітини здібні до конститутивного синтезу фізіологічно значущих кількостей біологічно активного MIP-1, γ який опосередковує хемотаксис і міграцію Т-лімфоцитів,

тобто дендритні клітини можуть брати участь в рекрутуванні Т-лімфоцитів (як CD4+ , так і CD8+) перед їх активацією.

Гранулоцити

У ефektorній фазі специфічної імунної відповіді можуть брати участь і інші лейкоцити крові: гранулоцити або поліморфноядерні лейкоцити. (Рис.7.3.4.)



Базофіл

Еозинофіл

Нейтрофіл

?

Рисунок 7.3.4 - Гранулоцити або поліморфноядерні лейкоцити.

Ці клітини складають першу лінію неспецифічного протимікробного захисту. Вони першими мобілізуються у вогнище запалення або інфекції і від їх фагоцитарної активності залежить елімінація збудників. Їх мобілізація з кров'яного русла різко підвищується під впливом цитокінів макрофагального походження (IL-8) або C5a -фракції активованої системи комплементу. Інші продукти макрофагів активують функції гранулоцитів (TNF- α).

Гранулоцити продукуються в кістковому мозку під впливом IL-1, IL-3, IL-5, GM-CSF і G-CSF. У кістковому мозку у дорослих міститься 2×10^{11} мієлоїдних попередників, а резерв гранулоцитів складає 6×10^{11} . Попередники активно проліферують, а в резерв входять дозріваючі гранулоцити, що не діляться. Через стадію попередника вони проходять за 4 дні (3-5 ділень), а морфологічне і функціональне дозрівання в резерві займає ще 5 днів. Щоденний вихід з кісткового мозку в нормі складає 10^{11} гранулоцитів, але він може підвищуватися у декілька разів під впливом запальних стимулів, які примушують виходити з резерву менш зрілі клітини, що проявляється «зрушенням вліво», яке розцінюється як ознака гострої інфекції. Такий посилений вихід гранулоцитів з резерву можуть індукувати бактерійні ліпополісахариди, або прозапальні цитокіни (IL-1, TNF α), або C3-фракція активованого комплекменту, або кортикостероїди.

У судинному руслі 5×10^{11} гранулоцитів (середня норма у дорослих - 2000 - 9000 в мм³) діляться на два майже рівні пули: циркулюючий і пристінковий, які тимчасово секвеструють в стані прилипання до поверхні ендотелію венул. При заборі венозної крові враховується лише циркулюючий пул. Динамічна рівновага двох пулів регулюється: агентами, що підсилюють пристінкове стояння шляхом посилення експресії адгезійних молекул (ICAMs), до яких відносяться хемокіни IL-1, TNF α , IFN γ , а також агентами, що інгібують пристінкове стояння, до яких відносяться кортикостероїди. Пристінкове стояння - це перший крок до виходу з судин в тканині, в осередок інфекції або запалення.

Нейтрофіли

Нейтрофільні гранулоцити – сама багаточисельна група лейкоцитів, що складає (48-78 % із загальної кількості лейкоцитів). У зрілому сегментоядровому нейтрофілі ядро складає 3-5 сегментів, сполучених тонкими перемичками. В популяції нейтрофілів крові

можуть знаходитись клітини різної ступені зрілості – юні, паличкоядрові і сегментоядрові.

Нейтрофіл займає одну з найбільш активних позицій в системі гуморально-клітинної кооперації крові та сполучної тканини. Це робить його універсальною мішенню та індикатором різних порушень гомеостазу та гоміокінезу. У свою чергу, стимульований нейтрофіл сам стає міцним ефектором та одним із пускових механізмів каскадних реакцій, які забезпечують розвиток запалення .

У 1978 р. Пісаревський В.Е. у своїй монографії представив важливе питання – антимікробні властивості нейтрофілів. Наряду з цим у ній нейтрофіл не роздивляється з позицій фізіології та загальної патології. В книзі В.А. Фрадкіна «Аллергодиагностика *in vitro*» (1975) проаналізований ще один приклад – хемокінез нейтрофілів як відображення реакції крові на специфічні алергени. Окремі сторінки відведені нейтрофілу. У працях Маянського О.М.(1983, 1985 рр.) головна увага приділяється змінам нейтрофілів у відповідь на стимуляцію: метаболічній перебудові, випадковій та направленій міграції, процесам поглинання, секреторній дегрануляції, бактерицидним ефектам. Спеціально розбираються молекулярні основи рецепції та ультраструктурні переутворення фагоцитів в процесі ендоцитозу.

нейтрофільний гранулоцит

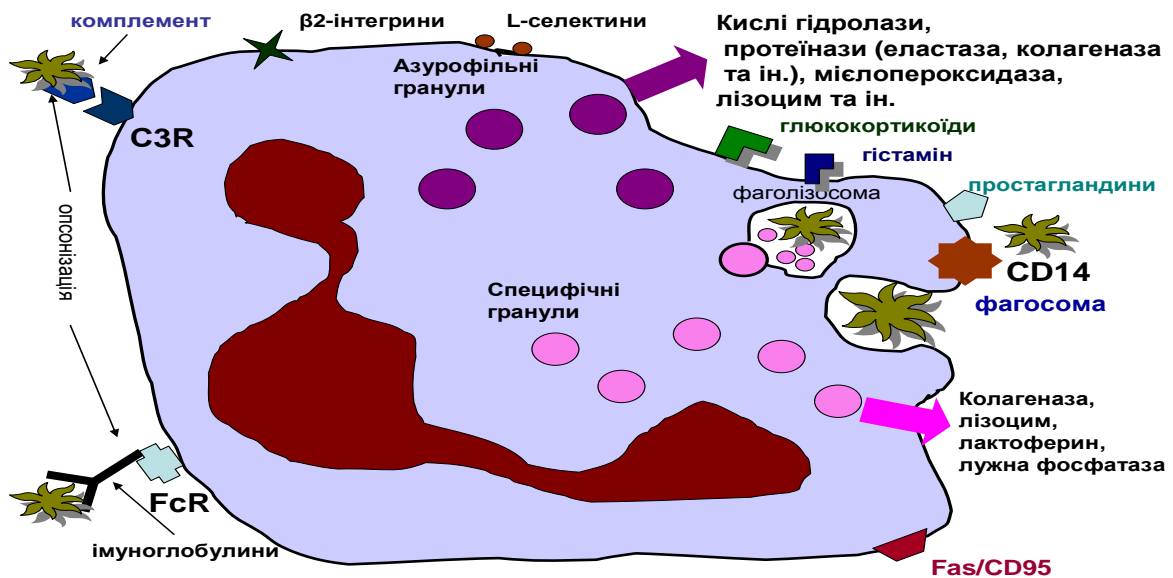


Рисунок 7.3.5 – Нейтрофільний гранулоцит

Нейтрофіли володіють всіма функціями фагоцитарних клітин: адгезивністю, рухливістю, здатністю до хемотаксису, здатністю захоплювати бактерії та інші частки без участі специфічних рецепторів або за участю FcR або CR1, вбивати захоплені мікроорганізми за допомогою кисень-залежних та кисень-незалежних механізмів і переварювати захоплені об'єкти фагоцитозу. Нейтрофіли містять 2 основних типи гранул (первинні і вторинні). В первинних гранулах містяться кислі гідролази (фукозидаза, нуклеотидаза, галактозидаза, манозидаза та ін.), нейтральні протеїнази (катепсин G, еластаза, колагеназа), а також катіонні білки, мієлопероксидаза, лізоцим і мукополісахариди. У вторинних гранулах немає кислих гідролаз, тут містяться лише активні за нейтральних і лужних значень рН агенти (лужна фосфатаза, лактоферин, лізоцим та білок, що зв'язує вітамін B₁₂. Крім того, нейтрофіли є активними продуцентами вільних радикалів, які забезпечують максимальний пошкоджуючий вплив. Тактика нейтрофілу полягає у першочерговому вивільненні у навколишню рідину вільних радикалів та вмісту вторинних гранул, ферменти яких активні саме на

початкових етапах запалення, поки в осередку не розвинувся виражений ацидоз. Пізніше нейтрофіл вивільняє первинні гранули, кислі гідролази яких активно функціонують при низьких значеннях рН.

Ферменти і чинники бактерицидності, що містяться в специфічних гранулах і лізосомах нейтрофіла окрім знищення патогенів можуть викликати пошкодження власних клітин і тканин організму. З цим пов'язана патогенетична роль нейтрофілів у імунотоксичній патології, при якій імунні комплекси активують систему комплементу з утворенням біологічно активних пептидів, зокрема С5а - хемоатрактанту для нейтрофілів. Інфільтрація вогнища імунного запалення нейтрофілами веде до пошкодження тканин їх ферментами.

У зрілому стимульованому нейтрофілі спостерігається перебудова метаболізму, його міграція до антигену, адгезії, поглинання, утворення травних вакуолей, секреторна дегрануляція. Один і той же антиген здатний індукувати усі чи більшість реакцій нейтрофіла. Різні форми реактивності його забезпечуються різними механізмами дії, та можуть проявлятися незалежно одне від одного.

На поверхневій мембрані нейтрофілів експресуються різні антигени і рецепторні структури. Дані клітини експресують антигени I та II класів ГКГ, більшість поверхневих рецепторів: FcγRI, FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) – низькоафінний рецептор для IgG та FcγRIII (CD64) – ліганд для різних підкласів IgG. FcαR (CD89) – ліганд для IgA; IgE - зв'язуючий білок Mac-2/VP; рецептори для компонента комплементу - CD88 (ліганд C5a), CD35 (ліганди C3b та C4b). На поверхні нейтрофілів експресуються і багато адгезивних молекул, серед яких в першу чергу слід відмітити CD11 та CD11b – ліганди для ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) та ін. В реалізації багатьох функцій нейтрофілів, зокрема фагоцитозу та адгезії до ендотеліальних клітин, активна участь приймає і комплекс CD11b/CD18, який має здатність

зв'язуватись з багатьма лігандами. Нейтрофіли також експресують CD49f (ліганди – ламініни, інвазіни та ін.), CD147 та ін.

Також нейтрофіли експресують: рецептори для гістаміну (H1, H2, H3, H4), р-адренергічні, до глюкокортикоїдів GRa та GRb, різних хемотоксичних факторів, простогландинів, цитохрому В, лейкотрієну LTB-4 та ін.

Значний інтерес представляє експресія CD69, який, експресується нейтрофілами після їх стимуляції різними стимулами, включаючи цитокіни.

Нейтрофільні гранулоцити є джерелом різних біологічно активних речовин, так як наряду з різноманітним складом гранул вони продукують різні цитокіни. Комплекс біологічно активних сполучень нейтрофілів забезпечує їм і багато регуляторних впливів. До таких цитокінів відносять: ІЛ-1а, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-9, ІЛ-10, ІЛ-12, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , фактор росту гепатоцитів (HGF), фактор активації тромбоцитів (PAF), фактор росту ендотелію судин (VEGF), MIP-1 α MIP-1 β та гістамін.

Регуляторний вплив, пов'язаний з дією різних цитокінів, здійснюється локально, оскільки загальний рівень цитокінів, що продукуються нейтрофілами, в периферичній крові невеликий. Біологічні властивості цитокінів, що виділяються нейтрофілами, дозволяють їм регулярно впливати на різні типи клітин, включаючи Т- і В-лімфоцити, моноцити, макрофаги та ін.

Одне з центральних місць в регуляторних ефектах нейтрофілів належить GM-CSF и G-CSF, так як вони впливають на продукцію цитокінів іншими клітинами; G-CSF індукує синтез ІЛ-10 в нейтрофилах. Не менш суттєва і регуляція з участю TNF α .

Отримані докази впливу нейтрофілів і на функції В-лімфоцитів. Після стимуляції TNF- α вони починають експресувати новий білок BlyS, який відноситься до суперродина TNF α ; його розчинна форма виявляється в сироватці крові хворих після введення G-CSF, що свідчить про важливу роль цього білку в підтриманні гомеостазу В-лімфоцитів.

Регуляторний вплив нейтрофілів проявляється і у відношенні опасистих клітин. Існують дані, згідно яких лактоферин інгібує IgE-залежну активацію опасистих клітин людини та модулює активність протеаз. Більш детальне вивчення цього факту з використанням опасистих клітин шкіри, лігень та мигдалин дозволило встановити, що лактоферин опосередковано інгібує активність триптази; його дія на гепарин лишає останньої здатності стабілізувати триптазу.

Таким чином біологічні властивості нейтрофілів дають їм можливість активно впливати на різні клітинні популяції.

Еозинофіли

На еозинофільні лейкоцити крові здорової людини припадає 2-5%. Вони здатні фагоцитувати та знищувати поглинені мікробні клітини.

Еозинофіли крові людини зазвичай мають дводольчате ядро і багато цитоплазматичних гранул, які фарбуються кислими барвниками (еозином). (рис.7.3.5.).

Еозинофільні гранулоцити містять гранули, де перебуває низка біологічно активних речовин, здатних до фагоцитозу і хемотаксису. Агенти, що містяться в еозинофілах, виконують різні функції, в тому числі – протиалергійну, сприяючи розщепленню біологічно активних речовин, які виділяються у ранній фазі atopічних реакцій. Так, гістаміназа здійснює інактивацію гістаміну, арилсульфатаза В розщеплює лейкотрієни, а фосфоліпаза D – тромбоцит активуючий фактор.



Рисунок 7.3.6 – Еозинифілі

Особливістю еозинофілів є експресія на їх мембранах Fcε-рецепторів, специфічних для імуноглобулінів E. У зв'язку з цим їх ефекторна функція виявляється в основному в протипаразитарній імунній відповіді, при якій утворюються специфічні антитіла, що відносяться до класу імуноглобулінів E. Оскільки продукція останніх характерна також для алергічних реакцій негайного (анафілактичного) типу, в місцях прояву таких реакцій відбувається скупчення еозинофілів.

Певні стимули викликають дегрануляцію еозинофілів, тобто зливання гранул з цитоплазматичною мембраною і вивільнення їх внутрішнього вмісту в позаклітинне середовище. Реакція дегрануляції – це один з механізмів використання еозинофілами токсичного вмісту своїх гранул для знищення крупних мішеней, що не піддаються фагоцитозу. Інший механізм складається з утворення токсичних реакційно здатних метаболітів кисню. Ці механізми складають основу протигельмінтного імунітету, в якому еозинофілам належить особлива роль. Приваблення еозинофілів до місця

інвазії паразитів відбувається за рахунок вивільнення Т-лімфоцитами, опасистими клітинами і базофілами особливих продуктів, таких як анафілактичний фактор хемотаксиса еозинофілів. Вони зв'язуються з поверхнею мішеней, опсонізованої специфічними антитілами ізотопу IgG або IgE, і в процесі дегрануляції виділяють токсин – головний основний білок. Цей токсин знаходиться у серцевині еозинофільної гранули; матрикс гранули вміщує іншу токсичну речовину – катіонний білок еозинофілів. Еозинофіли виділяють також гістаміназу та арилсульфатазу, які інактивують продукти виділення опасистих клітин – гістамін та фактор анафілаксії, що викликає алергічну реакцію сповільненого типу. Таким, чином речовини, що виділяються еозинофілами пригнічують запальну реакцію і міграцію гранулоцитів у вогнище запалення.

Базофіли

Базофіли присутні у крові у невеликій кількості, менш 0,2 % загальної кількості лейкоцитів. Аналогами базофілів є опасисті (тучні) клітини, але вони не зустрічаються в циркуляції і мають рід відмінностей. Відомо два види опасистих клітин – опасисті клітини слизових оболонок та опасисті клітини сполучної тканини (рис.7.3.7).



Рисунок 7.3.7 – Базофіли

На мембранах базофілів експресовані високоафінні FcR рецептори для імуноглобуліну E, на яких зв'язуються циркулюючі антитіла, що відносяться до класу імуноглобуліну E.

Подальша взаємодія специфічного антигену з такими фіксованими на базофілах антитілами викликає дегрануляцію клітин. Гранули базофілів, як і опасистих клітин, містять біогенні аміни (гістамін), гепарин, деякі ферменти (трипази, хімази, карбоксипептидаза A) та хемотаксичні фактори, які викликають реакції гіперчутливості негайного (анафілактичного) типу. Таким чином, базофіли та еозинофіли крові належать до клітин-ефекторів імуноглобулін E-опосередкованих алергічних реакцій. На відміну від інших Fc-рецепторів FcRI з високою афінністю зв'язують вільні IgE на опасистих клітинах і базофілах [20]. Але активує клітини не мономерна форма IgE-антитіл, а тільки їх агрегати, що утворилися в результаті «зшивання» при взаємодії з полівалентним антигеном. Сигнал активації від цих рецепторів примушує опасисті клітини і базофіли секретувати вміст гранул і запускати місцеву запальну відповідь. Миттєво відбувається дегрануляція цих клітин з

викидом гістаміну і серотоніну, які викликають місцеве посилення кровотоку і підвищення проникності судин з швидким накопиченням рідини в навколишніх тканинах і притокою гранулоцитів з кров'яного русла. Така швидка запальна відповідь може бути захисною, оскільки сприяє швидкій мобілізації фагоцитів і антитіл в осередок інфекції. Проте відомо, що аналогічні реакції лежать в основі патогенезу алергії анафілактичного типу. Гістамін і серотонін - короткоживучі молекули, їх дія короткочасна. Але місцеве запалення далі підтримується подальшою продукцією тими ж клітинами інших молекул, зокрема лейкотрієнів, - вазоактивних метаболітів арахідонової кислоти. На сигнал активації базофіли відповідають синтезом і секрецією SRS-A (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) PGD_2 , а також $TNF\alpha$, які вносять істотний внесок в підтримку місцевої запальної реакції.

Гранулоцитопенія може служити проявом різних генетичних дефектів. Назва «Генетична хронічна нейтропенія» об'єднує групу генетично детермінованих станів, зрілих нейтрофілів, що характеризуються низьким рівнем продукції. У таких пацієнтів частіше виникають інфекції шкірних покривів або респіраторного тракту, викликані *Staph. aureus*, або надмірне розмноження і дисемінація представників нормальної мікрофлори кишечника. Частота і тяжкість таких інфекцій корелює з рівнем нейтропенії. Саме під час епізодів нейтропенії виявляються інфекції шкіри і слизової порожнини рота. При рідкісніших генетичних порушеннях нейтрофіли можуть повністю бути відсутнім: інфантильний генетичний агранулоцитоз (синдром Kostmann'a) і синдром Scywachman'a, при якому нейтропенія асоційована з недостатністю підшлункової залози.

Гранулоцити не довгий час перебувають в крові: середній напівперіод життя 6-7 днів, а після виходу в тканині - не більше двох днів. У зв'язку з цим будь-яке порушення продукції гранулоцитів в кістковому мозку веде до зниження рівня циркулюючих в крові

гранулоцитів. Придбана нейтропенія може мати різні причини. Лікарську нейтропенію можуть індукувати багато фармакологічних агентів. Важку нейтропенію аж до агранулоцитозу може викликати застосування таких поширених лікувальних препаратів, як сульфаніламід, пеніцилін, цефалоспорини, фенотіазини, антитиреоїдні препарати, хлорамфенікол. Препарати, вживані для протипухлинної хіміотерапії, володіють антимітотичною дією, антибіотик хлорамфенікол викликає мієлосупресію. Інші лікарські препарати (наприклад, сульфаніламід) комплексуються з глікопротеїнами мембрани гранулоцитів і індукують синтез аутоантитіл, що активують систему комплементу на мембранах гранулоцитів, що веде до їх лізису.

Іноді у вагітних жінок виробляються антитіла проти ізоантигенів гранулоцитів плоду, які можуть викликати зниження тривалості життя нейтрофілів новонародженого - ізоімунна неонатальна нейтропенія.

З іншого боку, посилене споживання препаратів при важких і тривалих бактерійних або грибкових інфекціях може привести до гранулоцитопенії, якщо продукція гранулоцитів в кістковому мозку з якихось причин пригнічена. Таке явище спостерігається, наприклад, при крупозній пневмонії у алкоголіків або осіб з дефіцитом живлення. Нижнім лімітом вважається зміст 1800 - 2000 гранулоцитів в мкл крові. При зниженні кількості циркулюючих гранулоцитів до 1500 кліток в мкл це виявляється порушенням перебігу місцевої гострої запальної відповіді. При падінні рівня гранулоцитів в крові нижче 500 кліток в мкл прогресивно наростає частота інфекцій. При рівні 100 гранулоцитів в мкл всі хворі мають інфекційні ускладнення.

Причинами розвитку нейтропенії можуть служити самі інфекції, в першу чергу вірусні (HIV, HBV, EBV), а також викликані мікобактеріями, грибами. Транзиторна нейтропенія розвивається за ендотоксемією. На фоні нейтропенії частіше за інших розвиваються інфекції, викликані бактеріями, що колонізують шкіру, слизисті, носоглотку, шлунково-кишковий тракт: E.

coli, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus і іншими гнійними бактеріями.

Описані численні генетичні дефекти окремих функцій гранулоцитів. Дефект актинових ниток в цитоплазмі нейтрофілів призводить до зниження їх рухливості і порушенню хемотаксису - синдром ледачих лейкоцитів. Нездатність синтезувати і експресувати адгезійні молекули (CD18) служить причиною порушення мобілізації клітин з кров'яного руслу в осередок інфекції. Хронічна гранулематозна хвороба є наслідком дефектів продукції різних компонентів NADPH-оксидази. У більшості хворих виявлена дефектна субодиниця цитохрому b_{558} . При цьому порушена продукція антимікробних окислюючих кисневих радикалів при фагоцитозі. Важкий імунодефіцит у таких хворих пов'язаний з нездатністю їх гранулоцитів вбивати захоплені бактерії у фаголізосомах із-за дефектності їх окислювального вибуху. Тому найбільшу небезпеку для таких хворих представляють інфекції, викликані каталаза-продукуючими мікроорганізмами: *S.aureus*, *E.coli*, *S.marcescens*, *Aspergillus*, *Candida*. Дефект бактерицидності гранулоцитів може бути пов'язаний з недостатнім синтезом таких ферментів, як глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, мієлопероксидаза. Успадкований синдром Chediak - Higashi включає серед безлічі різних генетичних дефектів недостатність лізосомного апарату нейтрофілів. Нейтрофіли містять гігантські лізосоми і відрізняються ослабленою здібністю до фагоцитозу та мікробоцидності, дегрануляції і хемотаксису. Захворювання виявляється різко підвищеною чутливістю до інфекцій, викликаних гнійними бактеріями. Порушення мікробоцидності нейтрофілів може бути також слідством дефекту специфічних гранул. У дітей з таким генетичним дефектом часто виявляється місцевий ювенільний періодонтит. Рецидивуючі важкі інфекції порожнини рота ведуть до втрати зубів і альвеолярних відростків.

Таким чином мононуклеарні фагоцити та гранулоцити надзвичайно різноманітні за структурою, місцем синтезу та функціональною активністю мають одну спільну рису – участь у боротьбі з антигеном різного походження на підставі розпізнавання, поглинання та перетравлення чужорідних агентів, а також регуляції та ініціації імунної відповіді, яка не може здійснитися без тісної взаємодії та взаємозв'язку цих клітин з лімфоцитами.

Запитання:

1. Які клітини володіють фагоцитарною активністю?
2. Які клітини відносяться до антигенпрезентуючих ?
3. Чи є різниця між функціональною здатністю антигенпрезентуючих клітин?
4. Які функції виконують макрофаги при специфічній імунній відповіді?
5. Назвіть основні інгібітори та індуктори макрофагів ?
6. Які рецептори на макрофагах ви знаєте, назвіть їх функції?
7. Як впливають прозапальні цитокіни (ТНФ- α , ИЛ-1) на дозрівання дендритних клітин?
8. Що спільного у структурі функціональній здатності дендритних клітин та макрофагів?
9. Які біологічно активні речовини виділяють нейтрофіли. Перечисліть їх.
10. Яку основну функцію виконують еозинофіли?
11. Які гранулоцити беруть участь в алергічних реакціях?
12. Які патології гранулоцитів ви знаєте?

Література:

1. Hall B., Joiner K. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences // *Immunology Today*, 1991, v. 12, P. A22.
2. Juius M., Maroun C., Haughn L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling // *Immunology Today*, 1993, v. 14, P. 177-182.
3. Benjamini E., Sunshine G., Leskowitz S. *Immunology, a short course*. WILEY-LISS, New York, 1996, 451 p.
4. Gordon S., Clarke S., Greaves D., Doile A. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress // *Current Opinion in Immunology*, 1995, v. 7, P. 24-33.

5. Rothbard J., Gefer M. Interaction between immunogenic peptides and MHC proteins // *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, v. 9, P. 527-535.
6. Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation // *Current Opinion in immunology*, 1996, p. 348-354.
7. Tomasi T. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system // *Immunology Today*, 1992, v. 13, P. 416 -421.
8. Harnett M. Antigen receptor signalling: from the membrane to the nucleus // *Immunology Today*, 1994, v. 15, P. 1-5.
9. Doherty T. M. T-cell regulation of macrophage function // *Current Opinion in Immunology*, 1995, V. 7, P. 400-404.
10. Bona C., Bonilla F. *Textbook of immunology*, second ed., Harwood Acad. Publ., Amsterdam, в 1996, 406 p.
11. Halpern M. Human nonspecific suppressive lymphokines // *J. Clin. Immunol.*, 1991, v. 11, P. 1-8.
12. Reth M. B cell antigen receptors // *Curr. Opinion Immunol*, 1994, v. 6, P. 3-14.
13. Austyn J. M. New insight into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells // *J. Exp. Med.*, 1996, p. 1287-1292.
14. Pierce J. et al. Salicylates inhibit IB- phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration // *J. of Immunology*, 1996, v. 156, P. 3961-3969.
15. Lehrer R., Lichtenstein F., Ganz T. Defensins // *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, v. 11, P. 105-115.
16. Nisonoff A. Idiotypes: concepts and applications // *J. Immunol.*, 1991, v. 147, P. 2429-2436.
17. Takafuji Sh, et al. Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells // *J. of Immunology*, 1996, v. 156, P. 3980-3985.
18. Lopez A., Elliot M., Woodcock J., Vadas M. GM-CSF IL-3, IL-5: cross - competition on human haemopoietic cells // *Immunology Today*, 1992, v. 13, P. 495-501.
19. Thomson A. (Ed.) *The Cytokine Handbook*, Academic Press, London, в 1992, 418 p.
20. Moller G. The B-cell antigen receptor complex // *Immunol. Rev.*, 1993, v. 132, P. 5-15.
21. Abbas A., Lichtman A., Pober J. *Cellular and molecular immunology*. New York.: W. B. Saunders Company, 1991.
22. Zurawski G., de Vries J. Interleukin-13, an interleukin-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells // *Immunology Today*, 1994, v. 15, P. 19-24.
23. Бернет Ф.М. *Клеточная иммунология/ пер. С англ.*. М.: Мир, 1971. 720 с.
24. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. *Очерки о нейтрофиле и макрофаге.* – Новосибирск: Наука, 1983. 256 с.
25. В.Є. Казмірчук, Л.В. Ковальчук. *Клінічна імунологія і алергологія.* – Вінниця:Нова Книга, 2006. 528 с.

26. А.Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. Иммунология. – Москва «Мир», 2000. – 592с.
27. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.

7.4.Вторинні посередники регуляції активності імунної відповіді

Цитокіни (від греч. cyto – клітина, kinos – рух) –медіатори білкової та небілкової природи, що секретуються переважно активованими клітинами імунної системи і забезпечують ріст, проліферацію та диференціювання багатьох клітин. Вони є обов'язковими чинниками здійснення ендогенної регуляції всіх ланок імунної системи, гемопоезу, запалення і міжклітинних взаємодій для реалізації механізмів неспецифічної реактивності чи специфічного імунітету. Деякі цитокіни опосередковують запрограмовану клітинну загибель – апоптоз. Цитокіни секретуються клітиною-продуцентом у вільній формі або експресуються у зв'язаній формі з мембраною клітини. Для здійснення своїх функцій цитокіни пов'язуються із специфічними рецепторами клітин-мішеней, які регулюють експресію того чи іншого рецептора на своїй мембрані що контролює дію цитокінів. У відповідь на дію цитокіна клітина може експресувати ряд інших цитокінів – цитокіновий каскад. До цитокінів відносять інтерферони (ІФН), інтерлейкіни (ІЛ), фактори некрозу пухлин (ФНП), колонієстимулюючі фактори (КСФ), фактори росту, хемокіни.

Цитокіни діють за різними механізмами

Інтракринний – дія цитокінів всередині клітини-продуцента; пов'язування цитокінів із специфічними внутрішньоклітинними рецепторами

Аутокринний – дія цитокіна на клітину яка його секретує (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-18, ФНПа – аутокринні фактори для моноцитів/макрофагів)

Паракринний – вплив цитокінів на близько розташовані клітини і тканини

Ендокринний – дія цитокінів на відстані від клітин-продуцентів

Одні цитокіни плюрипотентні, тобто такі, що впливають на різноманітні клітини, а інші специфічні – вибірково впливають на окремі клітини.

Цитокіни мають ряд особливостей:

- цитокіни, які продукуються більш ніж одним типом клітин;
- одна клітина може продукувати більш ніж один цитокін;
- один цитокін може діяти на кілька типів клітин;
- кілька цитокінів можуть індукувати однакову функцію у конкретному типі клітин;

Умовно, за біологічною дією цитокіни розділяють на 5 груп

1 – прозапальні цитокіни: ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, ІФН α , γ , ФНП

2 – протизапальні: ІЛ-4, ІЛ-10

3 – фактори росту та диференціювання – ТФР

4 – гемопоетичні колонієстимулюючі фактори (М-КСФ, Г-КСФ, ГМ-КСФ)

5 – фактори росту мезенхімальних клітин – фактор росту фібробластів

Цитокіни володіють системною дією, від їх сполучення і послідовності залежить кінцевий біологічний ефект.

Інтерлейкіни – поліпептиди, які синтезуються лімфоїдними та нелімфоїдними клітинами і впливають на функціональну активність імунокомпетентних клітин та відповідають за міжклітинні взаємодії між лейкоцитами. На теперішній час відомо понад 30 інтерлейкінів.

ІЛ-1 (ендогенний піроген, лімфоцитарактивуючий фактор) – є одним із основних регуляторів імунної та запальної відповіді, який діє на майже всі типи клітин.

Молекулярна маса – 17,5 кД. Головними продуцентами ІЛ-1 в організмі є моноцити/макрофаги. Разом з тим, ІЛ-1 здатні продукувати й інші клітини: дендритні клітини, астроцити, фібробласти, НК, кератиноцити та ендотеліальні клітини.

Існує 2 форми ІЛ-1: ІЛ-1 α і ІЛ-1 β , які кодують різними генами і відрізняються біологічною активністю, але пов'язуються з одним і тим же рецептором. ІЛ-1 α підсилює протипухлинний імунітет, а ІЛ-1 β підсилює регенерацію тканин і стимулює у онкологічних хворих розвиток метастазів. На поверхні клітин-мішеней експресується 2 типи рецепторів до ІЛ-1: з молекулярною масою 80 кД (на Т-лімфоцитах, кератиноцитах, гепатоцитах, фібробластах) та 68 кД (на В-лімфоцитах, макрофагах). Існує ІЛ-1-рецептор-антагоніст (ІЛ-1-Ра) – синтезується моноцитами, макрофагами, нейтрофілами і гепатоцитами. ІЛ-1-Ра зв'язується з CD121a Т-лімфоцитів і не активує клітини-мішені. Баланс між ІЛ-1 та ІЛ-1-Ра важливий для захисту організму від інфекцій.

ІЛ-1 впливає на:

- тимоцити – посилює їх проліферацію (з ІЛ-7)
- Т-лімфоцити – посилює експресію рецепторів для ІЛ-2, збільшує експресію ІЛ-2, ІЛ-4, ІФН- γ , ГМ-КСФ. Під впливом ІЛ-1 під час презентації антигенного пептида макрофагами Т-лімфоцитам хелперам 1 типу, останні починають продукувати ІЛ-2. ІЛ-1 індукує проліферацію Т-лімфоцитів тільки, якщо знаходиться на поверхні мембрани моноцитів/макрофагів, в зв'язаному з мембраною вигляді, шляхом міжклітинного контакту. Розчинна секреторна фракція ІЛ-1 проліферації лімфоцитів не запускає.
- В-лімфоцити – стимулює проліферацію, експресію рецепторів ІЛ-2, антигенів головного комплексу гістосумісності (МНС)
- макрофаги – стимулює фагоцитоз, хемотаксис, цитотоксичність, експресію антигенів МНС, продукцію простагландину E2 (ПГЕ2), тромбоксана A2. Стимулює секрецію ФНП, ІЛ-6.
- природні кілери – посилює цитотоксичність, експресію рецептора для ІЛ-2, синтез ІФН γ
- нейтрофіли – опосередковано посилює хемотаксис і дегрануляцію
- базофіли та тучні клітини – індукує вивільнення гістаміну

- ІЛ-1, зв'язаний з мембраною кератиноцитів, приймає участь в представленні антигену в епідермісі шкіри людини.

Крім того, ІЛ-1 викликає підвищення температури тіла, активуючи:

- гепатоцити до утворення білків гострої фази запалення;
- фібробласти – посилює проліферацію, викликає синтез ІЛ-6, КСФ, ІФН- β , ПГЕ2.
- ендотелій – стимулює проліферацію, індукує прокоагулянтну активність (синтез тромбoplastину, ПГЕ).

Сильними індукторами ІЛ-1 є ліпополісахарид та ФНП- α .

В нормі концентрація ІЛ-1 в плазмі чи сироватці крові 0-5 пг/мл (1-10 пг/мл в супернатанті активованих моноцитів). При запальних реакціях чи аутоімунних реакціях вміст цитокіну зростає до 200 пг/мл.

ІЛ-2 (фактор росту Т-клітин) – продукується переважно активованими Т-лімфоцитами, зокрема Т-хелперами 1 типу. Лише невелика його кількість продукується Т-кілерами/супресорами. Після активації антигеном Т-лімфоцити набувають здатності відповідати на ІЛ-2 і подальша їх проліферація без нього стає не можливою. ІЛ-2 зв'язується з клітинами через рецептор для ІЛ-2, що складається з трьох ланцюгів: α -ланцюг (CD 25), β -ланцюг (CD 122) і γ -ланцюг (CD132).

ІЛ-2 індукує проліферацію Т-хелперів-1, цитотоксичних Т-лімфоцитів. Стимулює синтез імуноглобулінів В-лімфоцитами, підсилює функцію НК і моноцитів, стимулює продукцію γ -ІФН, ФНП, ІЛ-6, ІЛ-8. Відновлює порушену УФ-випромінюванням здатність макрофагів до презентації антигенів, підвищує радіорезистентність Т-лімфоцитів. Сприяє дозріванню антигенспецифічних лімфокінактивованих кілерів (LAK). Препарати ІЛ-2 спричиняють ефективний захист у ряді пухлин.

Підвищення рівня ІЛ-2 спостерігається при: лейкозах, аутоімунних порушеннях, в ранньому періоді СНІДу, у хворих з міокардитами.

Зниження рівня ІЛ-2 спостерігається після важких оперативних втручань, хіміотерапії, опіків, тяжких інфекціях.

ІЛ-3 (колонієстимулюючий фактор, поліпоетин) – продукується Т-лімфоцитами і стовбуровими клітинами, а також тканьовими базофілами, епітеліальними клітинами тимуса. Стимулює проліферацію та диференціювання поліпотентних попередників гемопоетичних клітин. Підтримує ріст та виживання попередників тучних клітин, необхідний для прояву активності базофільних клітин. Посилює проліферацію В-клітин. У сукупності з Г-КСФ підсилює продукцію нейтрофілів, а разом з еритропоетином – еритроцитів.

ІЛ-4 (В-клітинний стимулюючий фактор) – протизапальний цитокін продукується в основному Т-хелперами-2 типу, а також тучними клітинами та стромальними клітинами кісткового мозку. Головна функція ІЛ-4 полягає у переключенні синтезу ІgG1 на синтез ІgG4 і ІgE. Разом з іншими цитокінами сприяє проліферації тканьових базофілів. Підсилює проліферацію В-лімфоцитів та експресію рецептора до Fc фрагменту ІgE на базофілах. Посилює проліферацію тучних клітин і фібробластів. ІЛ-4 є кофактором проліферації кістково-мозкових попередників гемопоезу. Підвищує експресію МНС II класу на неактивованих В-лімфоцитах і макрофагах. Стимулює проліферацію Т-хелперів -2 типу і Т-цитототоксичних клітин. Посилює алоантигенспецифічну клітинну цитотоксичність.

ІЛ-4 пригнічує продукцію ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-8. Цей інтерлейкін має сильний антагоністичний ефект до ІФН- γ . Пригнічує генерацію цитотоксичних лімфоцитів, натуральних кілерів (НК) та протипухлинну активність макрофагів. Інгібує проліферацію CD4+, CD8+ Т-лімфоцитів. Пригнічує активацію моноклеарних фагоцитів та стимульовану ІЛ-2 індукцію ефекторних клітин, В-лімфоцитів, протипухлинних моноцитів/макрофагів.

ІЛ-5 (еозинофільний фактор) - протизапальний цитокін. Продукується Т-хелперами -2 типу. До функцій цього цитокіну належить індукція подальшої прогресії по клітинному циклу після стимуляції В-лімфоцитів ІЛ-4, посилення проліферації В-клітин прямою та опосередкованою дією. Індукує диференціацію, активацію і хемотаксис еозинофілів, підвищує їх життєздатність. Підвищує продукцію ІgЕ і експресію рецептора до нього на еозинофілах. Підсилює продукцію ІgА.

Підвищення рівня ІЛ-5 в крові викликає еозинофілію.

ІЛ-6 – прозапальний цитокін - продукується різними типами клітин – макрофагами, Т- і В-лімфоцитами, фібробластами, ендотеліальними, епідермальними і мікрогліальними клітинами, хондроцитами, остеоцитами. На неактивованих Т-лімфоцитах і активованих В-лімфоцитах для ІЛ-6 є 2 типи рецептора: високоафінний та низькоафінний. Стимулює проліферацію тимоцитів, В-лімфоцитів, активує попередники цитотоксичних лімфоцитів, гранулоцитів і макрофагів. Індукує диференціацію В-лімфоцитів у антитілоутворюючі клітини. Підсилює продукцію гепатоцитами білків гострої фази. Сприяє проліферації та диференціюванню Т-лімфоцитів. Посилює активність НК.

Забезпечує взаємозв'язок імунної, нервової та ендокринної систем. Індуктором продукції ІЛ-6 є ІЛ-1, а також ІФН, ФНП, ліпополісахарид і віруси. ІЛ-6 стимулює ріст кератиноцитів і диференціацію нервових клітин, а також виділення кортикотропіну гіпофізом. ІЛ-6 наряду з ІЛ-11, кардіотрофіном-1, циліарним нейротрофіном і онкостатином належать до родини нейропоетинів, які підтримують виживання нейронів.

ІЛ-6 може бути співвідповідальним за розвиток деяких патологічних станів і хвороб. Вважається, що він індукує проліферацію мезангіальних клітин при мезангіальному проліферативному гломерулонефриті. Підвищення його рівня в сироватці крові спостерігається при ревматоїдному артриті, причому спостерігається підвищення концентрації ІЛ-6 і в синовіальній рідині. Вже з успіхом застосовують антитіла проти ІЛ-6 для полегшення проявів ревматоїдного артрити.

Досить давно встановлено, що ІЛ-6 є фактором росту для плазмоцидів і деяких клітин гібридами, які походять від В-лімфоцитів. Висока чутливість цих гібридом до пікограмових (на мл) концентрацій ІЛ-6 може навіть застосовуватись для його виявлення. На жаль, ІЛ-6 є апокринним і паракринним фактором росту мієломи людини. Підозрюють, що ІЛ-6 бере участь у поліклональній активації В-лімфоцитів при СНІДі, а також те, що він одним з факторів росту для клітин саркоми Капоші, яка є частим злоякісним новоутвором, що розвивається при цій хворобі.

Нещодавно були отримані докази участі ІЛ-6 у патогенезі інфаркту міокарда. ІЛ-6 є основним медіатором синтезу білків гострої фази при цьому захворюванні. Крім того, високий рівень ІЛ-6 у хворих з гострим інфарктом міокарда має прямий кореляційний зв'язок з С-реактивним білком.

ІЛ-7 – продукується фібробластами, ендотеліальними клітинами, Т-лімфоцитами, клітинами кісткового мозку і стромальними клітинами тимуса. ІЛ-7 є важливим фактором росту та диференціації як про-, так пре-В-лімфоцитів, а також тимоцитів. ІЛ-7 може індукувати появу LAK-клітин.

ІЛ-8 – низькомолекулярний прозапальний цитокін, який синтезується активованими ендотеліальними клітинами, моноцитами, фібробластами, кератиноцитами, гепатоцитами та іншими клітинами. ІЛ-8 – є хемоаттрактантом для нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів і еозинофілів. Викликає міграцію нейтрофілів і базофілів у вогнище запалення і їх дегрануляцію, виділення супероксидного радикала. Сприяє трансміграції макрофагів через ендотелій. Стимулює ангиогенез.

ІЛ-9 – продукується Т-лімфоцитами, зокрема Т-хелперами-2 типу. Стимулює проліферацію Т-лімфоцитів і базофілів. Підсилює ефект ІЛ-4 відповідаючий продукції IgE і IgG4.

ІЛ-10 – (супресорний фактор) – протизапальний цитокін. Продукується переважно Т-хелперами-2-типу, а також CD8⁺ цитотоксичними лімфоцитами, макрофагами і дендритними клітинами. Стимулює проліферацію В-лімфоцитів,

тимоцитів та тучних клітин. Пригнічує функцію Т-хелперів-1 типу, НК, моноцитів/макрофагів, знижуючи синтез ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-8, ІФН- γ і ФНП. Таким чином ІЛ-10 вважається важливим регуляторним фактором імунної відповіді, оскільки він пригнічує клітинний імунітет (Т-хелперами-1) стимулюючи гуморальну відповідь (Т-хелперами-2).

ІЛ-11 – (тромбоцитарний фактор) – продукується фібробластами і стромальними клітинами кісткового мозку. Основна функція – стимуляція тромбоцитопоезу (особливо в поєднанні з ІЛ-3).

ІЛ-12 - прозапальний цитокін, продукується В-лімфоцитами, моноцитами/макрофагами, дендритними клітинами. Рецептори до нього експресуються на активованих CD4+ Т-клітинах, CD8+ і НК.

Сприяє диференціації наївних Т-хелперів в Т-хелпери-1 типу, НК і цитотоксичних Т-лімфоцитів. Стимулює хемотаксис ефektorних кілерних клітин. Підвищує продукцію ІФН- γ Т-лімфоцитами і НК. Синергічний по відношенню до ІЛ-2 в генерації LAK. Підвищує цитотоксичну активність Т-клітин. Регулює баланс Т-хелперів-1 і Т-хелперів-2 (індукує T χ -1 і пригнічує T χ -2). Підсилює диференціацію і дозрівання В-лімфоцитів, стимульованих ІЛ-2. Посилює диференціювання та дозрівання В-лімфоцитів, стимульованих ІЛ-2.

ІЛ-13 – протизапальний цитокін, продукується активованими Т-хелперами 2 типу. За функціями подібний до ІЛ-4, але не впливає на ендотеліальні клітини. Підвищує синтез ІЛ-4 посилюючи його ефекти: підвищує проліферацію В-лімфоцитів, синтез IgE і IgG4, експресію CD23 і молекул МНС II класу на мембрані В-лімфоцитів. Знижує функцію моноцитів/макрофагів, та пригнічує продукцію ними прозапальних цитокінів.

ІЛ-14 – продукується фолікулярними дендритними клітинами і Т-лімфоцитами. Рецептори до нього експресуються на В-лімфоцитах. Підвищує проліферацію В-лімфоцитів. Пригнічує синтез імуноглобулінів.

ІЛ-15 – продукується моноцитами/макрофагами. За біологічною активністю схожий на ІЛ-2, тому здатний зв'язуватись з рецептором для ІЛ-2. ІЛ-15 підтримує проліферацію та життєздатність Т-лімфоцитів і НК. Забезпечує дозрівання Т-лімфоцитів в тимусі та антигеннезалежну диференціацію Т-лімфоцитів і стимулює їх ріст. Індукує LAK-активність.

Рецептори активованих CD8⁺ Т-лімфоцитів мають підвищену активність до ІЛ-15. Фізіологічна роль його полягає в стимуляції швидкої реакції факторів природного імунітету, оскільки він може індукувати активацію і ранні проліферативні стимули для клітинних елементів природного імунітету.

ІЛ-16 – синтезується CD8⁺ Т-лімфоцитами, клітинами мікроглії мозку, еозинофілами. Рецептором для нього є молекула CD4, і тому він діє на всі клітини, які мають цю молекулу на своїй поверхні (Т-лімфоцити, моноцити, еозинофіли). ІЛ-16 є одним з найсильніших хемотаксичних факторів для еозинофільних гранулоцитів. Діючи на Т-лімфоцити, він посилює експресію рецептора для ІЛ-2 і молекул МНС-II класу. Одночасно ІЛ-16 гальмує проліферацію цих клітин. Багато даних вказує на те, що ІЛ-16 може знайти застосування у лікуванні СНІДу, бо він пригнічує реплікацію ВІЛ у Т-лімфоцитах.

ІЛ-17 – продукується активованими Т-лімфоцитами, зокрема CD4⁺ Т-клітинами і НК. Стимулює секрецію цитокінів: ІЛ-6, ІЛ-8, Г-КСФ, ПГЕ2. Підвищує експресію ICAM-1, стимулює активність фібробластів та проліферацію Т-лімфоцитів. Бере участь в реакціях відторгнення трансплантанта. Підвищений синтез ІЛ-17 Т-хелперами є характерною ознакою у хворих на контактний дерматит.

ІЛ-18 – регуляторний цитокін. Синтезується активованими макрофагами і гепатоцитами. Стимулює синтез Т-лімфоцитами ІФН- γ , макрофагами – ІЛ-1, ІЛ-8 і ФНП. Активує НК. Інгібує активність Т-хелперів-2-типу.

ІЛ-19 (гомолог ІЛ-10)- секретується в основному моноцитами. Регулює активність макрофагів і знижує активність Т-х-1 і Тх-2.

ІЛ-20 (гомолог ІЛ-10)- продукується в основному кератиноцитами. Рецептори до ІЛ-20 експресуються в тканинах різних органів – головному мозку, легень, шлунка, підшлункової та щитоподібної залоз, яєчників і сім'яників, матки, м'язів, в лімфоцитах крові і кістковому мозку.

ІЛ-10 приймає активну участь у запаленні шкіри. Його синтез підвищений при псоріазі.

ІЛ-21 – продукується Т-лімфоцитами і тучними клітинами. Відіграє важливу роль в регуляції гемопоезу і в імунній відповіді. Сприяє проліферації Т-і В-лімфоцитів та НК. Підсилює продукцію імуноглобулінів.

ІЛ-22 (гомолог ІЛ-10) – продукується активованими Т-лімфоцитами при гострому запаленні.

ІЛ-23 – продукується активованими дендритними клітинами. Індукує проліферацію CD4⁺ Т-лімфоцитів пам'яті і продукцію ними ІФН- γ .

ІЛ-24 (гомолог ІЛ-10) - продукується активованими моноцитами і Т-лімфоцитами. Стимулює ріст Т-лімфоцитів та пригнічує ангиогенез.

ІЛ-25 - синтезують стромальні клітини кісткового мозку. Посилює продукцію цитокінів Т-хелперами-2типу.

ІЛ-26 (гомолог ІЛ-10) - продукується активованими моноцитами, Т-лімфоцитами і НК.

ІЛ-27 – продукується активованими макрофагами, В-лімфоцитами, дендритними клітинами. Контролює продукцію цитокінів Т-хелперами-1. Діє синергічно з ІЛ-12 та ІЛ-18 стосовно стимуляції продукції ІФН- γ .

Ростові фактори – поліпептидні фактори, що регулюють мітогенну активність і диференціацію клітин. Серед них виділяють:

- інсуліноподібні фактори росту (IGF I, IGF-II)
- фактори росту фібробластів (FGF 1-9)
- тромбоцитарні фактори росту (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB)
- епідермальні фактори росту (EGF)
- трансформуючий фактор росту (TGF- α , TGF- β 1-3)
- фактор росту гепатоцитів (HGF)
- колонієстимулюючі фактори росту (G-CSF, M-CSF, GM-CSF)

Колонієстимулюючі фактори – поліпептидні фактори росту, які регулюють ділення, диференціацію кістковомозкових стовбурових клітин та попередників клітин крові:

Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ) – продукується моноцитами/макрофагами, фібробластами і ендотеліальними клітинами. Підсилює ріст, диференціацію і активацію гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів, базофілів).

Моноцитарний колонієстимулюючий фактор (М-КСФ) - продукується моноцитами/макрофагами, Т-лімфоцитами, фібробластами, епітеліальними і ендотеліальними клітинами. Активує проліферацію попередників моноцитів/макрофагів в кістковому мозку.

Гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) – продукується Т-лімфоцитами і моноцитами/макрофагами, а також фібробластами і ендотеліальними клітинами. Стимулює ділення і диференціацію попередників гранулоцитів та макрофагів і активує їх. Бере участь в стимуляції диференціації кровотворних попередників в антигенпрезентуючі дендритні клітини. Підсилює секрецію ІЛ-1, ІЛ-6 і ФНП- α клітинами системи мононуклеарних фагоцитів.

Трансформуючий фактор росту- β (ТФР- β) – поліпептидний поліфункціональний фактор росту, до якого належать також фактори росту фібробластів, тромбоцитів, ендотелію, інсуліноподібний, епідермальний фактор росту та ін.

ТФР- β представлений білками ТФР- β 1, 2, 3, 4 і продукується різними клітинами – макрофагами, Т-хелперами-3 типу, тромбоцитами, м'язовими і деякими пухлинними клітинами. Основна його функція полягає у пригніченні росту і активності Т-лімфоцитів. Деактивує функції макрофагів/моноцитів, В-лімфоцитів, нейтрофілів, НК. Знижує цитотоксичну та цитокінпродукуючу активність макрофагів, а також експресію на їх поверхні молекул МНС. Він діє синергічно з ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13 (деактиватори макрофагів).

ТФР- β – протизапальний цитокін, але у ряді випадків він може викликати і прозапальні ефекти. Регулює процеси запрограмованої клітинної загибелі нормальних і трансформованих клітин. ТФР- β пригнічує апоптоз Т-х1, а разом з ІЛ-2 інгібує апоптоз Тх-2.

Цей медіатор обумовлює імуносупресію при непластичних захворюваннях. Надлишкова активність його та інших ростових факторів може призвести до гіперпроліферативних процесів: гломерулонефриту, склерозуванню шкіри, цирозу печінки, а також до прогресуючого пухлинного росту.

Фактор некрозу пухлин (ФНП, TNF – tumor necrosis factor) - розрізняють власне ФНП- α та ФНП- β .

ФНП- α – прозапальний цитокін, продукується активованими макрофагами/моноцитами, дендритними клітинами, Т- і В-лімфоцитами, нейтрофілами, НК, кератиноцитами, астроцитами, ендотеліальними і гладком'язевими клітинами. Утворення ФНП- α індукується бактеріями та ІЛ-1, ІЛ-2, ІФН- γ , М-КСФ, а інгібується ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФН- α , ІФН- β , Г-КСФ, ТФР- β та вірусом Епштейн-Барра.

В низьких концентраціях ФНП- α підвищує синтез адгезивних молекул на ендотеліальних клітинах, що дозволяє нейтрофілам прикріплюватись до стінки судин в місцях запалення. Підсилює синтез цитокінів хелперними Т-клітинами і стимулює проліферацію і ріст В-лімфоцитів та Т-клітин (індукує експресію рецепторів до ІЛ-2). Індукує секрецію IgG2. Відіграє роль медіатора цитотоксичності моноклеарних клітин та НК. ФНП- α токсичний для пухлинних клітин за рахунок активації ендонуклеаз та пошкодження мітохондрій злоякісно трансформованих клітин.

У великих концентраціях, відомий як кахексин – має здатність пригнічувати ліпопротеїнову ліпазу жирової тканини (зменшення утилізації жирних кислот, що призводить до кахексії). Також приводить до розвитку ендотоксин-індукованого септичного шоку.

ФНП- α індукує синтез макрофагами ІЛ-1, ІЛ-6 і утворення печінкою білків гострої фази. Посилює експресію МНС на макрофагах. Стимулює ангиогенез. Здатний викликати геморагічний некроз деяких пухлин, обумовлений внутрішньосудинним тромбозом у межах малігнізованих тканин, що приводить до геморагічних "інфарктів" пухлинної тканини.

ФНП- β (лімфотоксин) – продукується активованими Т-і В-лімфоцитами. Головна його функція полягає в індукції апоптозу клітин –мішеней.

Виявлена роль ФНП у виникненні інсулітів і деструкції β -клітин острівками Лангенгарса, артриту, ішемії та запаленні міокарда. ФНП- α є маркером показника активності запального процесу.

Спостерігається підвищення рівня ФНП- α при серцевій недостатності та гострому інфаркті міокарда (його рівень корелює з розміром вогнища некрозу і ступеню важкості дисфункції лівого шлуночка). Гіперекспресія ФНП- α спостерігається не лише в плазмі крові, але і в міокарді при порушенні його функцій. Підвищена експресія ФНП- α та рецептора до нього на кардіоцитах спостерігається при дисфункції міокарда різної етіології. ФНП- α здатний індукувати ремоделювання серцевого м'яза, викликати гіпертрофію міокарда та зниження його скорочення. Зменшує артеріальний тиск і сприяє набряку легень. Можливо ці ефекти пов'язані із здатністю ФНП- α активувати синтез NO-синтетази, підвищуючи тим самим склад в тканинах закису азоту.

Інтерферони (ІФН) – глікопротеїни, що виробляються клітинами у відповідь на вірусну інфекцію та ін. Блокують репродукцію вірусів в клітинах та беруть участь у взаємодії між клітинами імунної системи. Клітини людини виробляють 4 основних види інтерферонів: ІФН- α , ω , β , γ .

ІФН- α , ω , β обумовлюють противірусну та протипухлинну дію. ІФН- α (лейкоцитарний) продукується лейкоцитами і макрофагами. ІФН- ω дуже схожий на ІФН- α . ІФН- β (фібробластний) – синтезується фібробластами, ендотеліальними клітинами, лімфоцитами, НК.

ІФН- γ – продукується активованими Т-хелперами-1 та НК. Регулює специфічну імунну відповідь та неспецифічну резистентність.

Розрізняють наступні біологічні ефекти інтерферонів:

- противірусний ефект забезпечується 3-ома процесами, що відбуваються одночасно після зв'язування ІФН з рецептором.

Табл.7.4.1



Ці механізми реалізують противірусний ефект, що приводить до пригнічення реплікації віруса.

- протипухлинний(антипроліферативний) ефект забезпечується наступними механізмами:

1. активація цитотоксичних клітин
2. підсилена експресія пухлиноасоційованих антигенів
3. модуляція продукції антитіл
4. пригнічення дії пухлинних ростових факторів
5. інгібіція синтезу РНК і білків пухлинної клітини
6. сповільнення клітинного циклу і перехід у стан спокою
7. стимуляція злякано трансформованих клітин до дозрівання
8. відновлення стримуючого контролю за проліферацією
9. гальмування утворення нових судин в пухлині

10. пригнічення метастазування

11. біомодуляція активності цитостатиків (зміна метаболізма, зниження кліренса)

Насьогодні, використовують рекомбінантні ІФН, отримані за допомогою генно-інженерних технологій для лікування вірусних інфекцій та численних ракових захворювань.

- імуномодулюючий ефект забезпечується наступними механізмами:

1. підвищення експресії антигенів МНС клісів I та II
2. регуляція чутливості до цитокінів
3. активація цитотоксичних ефекторних клітин

- антибактеріальний ефект, в основі якого лежить здатність ІФН індукувати активність деяких ферментів в ураженій клітині:

1. індукція індоламін-2,3-дезоксигенази приводить до зниження внутріклітинного складу L-триптофану, що є причиною смерті бактеріальної клітини у зв'язку з порушенням метаболізму
2. індукція NO-синтетази призводить до продукції NO – бактерицидний фактор, здатний руйнувати бактеріальні клітини.

Хемокіни - низькомолекулярні цитокіни (їх близько 50), які відповідають за хемотаксис лейкоцитарних клітин у вогнище запалення (направлений рух за градієнтом концентрації) та беруть участь у активації лейкоцитів. Вони регулюють рухливість лейкоцитів. Молекулярна маса складає від 8-12 кД. Рецептори для хемокінів структурно мають вид трансмембранної "гармошки" з 7 шарів G-зв'язуючих протеїнів. Хемокіни розташовані у міжклітинному матриксі. Концентрація хемокінів підвищується по мірі наближення до клітини-продуцента. Хемокіни можуть викликати дегрануляцію клітин і підвищувати експресію молекул адгезії. Хемокіни експресуються лише активованими клітинами.

За хімічною структурою в порівнянні конфігурації залишків цистеїну (C) в амінокислотній послідовності хемокіни поділяють на 4 групи:

CXC – α -хемокіни

CC – β -хемокіни

C – γ -хемокіни

CXXXC – δ -хемокіни

Характеристика деяких хемокінів

CXC – α -хемокіни

NAP-1 (neutrofil activating protein-1, нейтрофіли, що активують білок-1), IL-8 – продукуються моноцитами, гранулоцитами, лімфоцитами. Основна функція – активація нейтрофілів: посилення хемотаксису, підвищення експресії адгезивних молекул, прилипання до ендотеліальних клітин. Крім того, підсилюють екзоцитоз лізосомальних ферментів ангиогенеза і підвищує експресію рецепторів до комплекта.

NAP-2 (neutrofil activating protein-2, нейтрофіли, що активують білок-2) – продукуються тромбоцитами. Головна функція – підсилення хемотаксису і активація нейтрофілів.

PF-4 (platelet factor 4, тромбоцитарний фактор-4) – продукується тромбоцитами. Індукує вивільнення гістаміну з базофілів, підсилює експресію рецептора до IgE на еозинофілах, підвищує хемотаксис гранулоцитів і моноцитів.

GRO- α (growth regulated oncogene, онкоген регулюючий ріст) - продукується моноцитами, епітеліоцитами і ендотеліоцитами, а також злоякісно трансформованими клітинами (зокрема клітинами меланоми). Підсилює ангиогенез і ріст деяких типів пухлин.

IP-10 (inducible protein, індукцйбельний протеїн) – продукується ендотеліоцитами, моноцитами і фібробластами, стромальними клітинами тимуса і селезінки. Підвищує хемотаксис активованих Т-лімфоцитів. Пригнічує проліферацію клітин ендотелія.

SDF-1 α , β (stromal cell-derived factor-1, фактор-1, що продукується стромальними клітинами) – продукується стромальними клітинами. Стимулює ріст пре-В-лімфоцитів. Підсилює хемотаксис моноцитів і Т-лімфоцитів.

MIG (monokine induced by IFN- γ , монокін, індукований γ -інтерфероном) – продукується моноцитами/макрофагами стимульовані γ -інтерфероном. Головна функція – посилення хемотаксису лімфоцитів інфільтруючих пухлину.

CC – β -хемокіни

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, моноцитарний хемоаттрактант білок-1) – продукується моноцитами/макрофагами, фібробластами, кератиноцитами. Підсилює хемотаксис Т-лімфоцитів, індукує хемотаксис і активацію моноцитів.

MIP-1 α , β (macrophage inflammatory protein-1 α , β , запальний макрофагальний білок-1 α , β) – продукується моноцитами, Т-лімфоцитами, тучними клітинами, фібробластами. Посилює хемотаксис моноцитів і Т-лімфоцитів. Пригнічує проліферацію гемопоетичних стовбурових клітин.

RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted, регулятор активації, експресії і секреції нормальних Т-клітин) – продукується Т-лімфоцитами, моноцитами, тромбоцитами. Посилює хемотаксис Т-лімфоцитів, моноцитів, В-лімфоцитів, еозинофілів. Сприяє дегрануляції базофілів.

Eotaxin (еотаксин) – продукується ендотеліальними, епітеліальними клітинами, моноцитами, альвеолярними макрофагами, клітинами серця, тимусу, нирок, печінки. Приймає участь в алергії посилюючи хемотаксис еозинофілів.

C – γ -хемокіни

Lymphotactin (лімфотактин) – продукується тимоцитами і активованими Т-клітинами. Посилює хемотаксис Т-лімфоцитів.

CXXXC – δ -хемокіни

Neurotactin (fractalkine, нейротактин) – єдиний хемокін, пов'язаний з мембраною клітин. Експресується на мембрані клітин мозку, легень і серця також на ендотеліальних клітинах, моноцитах. Забезпечує виражену адгезію моноцитів, Т-

цитотоксичних клітин і НК. Високий рівень експресії нейротактина на ендотеліальних клітинах вказує на його важливу роль у приваблюванні лейкоцитів, Т-лімфоцитів і моноцитів з кров'яного русла.

В останні роки отриманні докази важливої участі хемокінів в різноманітних патофізіологічних процесах – хронічному і гострому запаленні, інфекційних захворюваннях, проліферації гемопоетичних стовбурових клітин та ін. Цікавим є відкриття того, що деякі хемокінові рецептори функціонують у якості ко-рецепторів для ВІЛ. Відомо, що молекула CD4 є головним рецептором, з яким зв'язується ВІЛ-1 своїм білком gp 120. Але для інфікування клітини одного такого зв'язування не достатньо. Необхідне допоміжне зв'язування ВІЛ-1 з ко-рецептором – рецептором для хемокінів. Так на макрофагах таким допоміжним ко-рецептором слугує рецептор для хемокінів MIP-1 α , β і RANTES. На Т-лімфоцитах – SDF-1. Виявилось, що у тих випадках, коли на поверхні макрофагів або Т-лімфоцитах у людини не експресувались дані ко-рецептори, то такі люди були резистентні до ВІЛ-інфекцій. Це відкриття відкриває перспективу для профілактики та лікування ВІЛ/СНІДу шляхом штучної блокади хемокінових рецепторів.

Таким чином цитокини - це білкові продукти активованих клітин імунної системи, що забезпечують міжклітинні комунікації не лише при імунній відповіді, але і при кровотворенні, розвитку запалення та ін. До них відносяться інтерлейкіни, інтерферони, ростові фактори, хемокіни та ін. Система цитокінів характеризується тісним взаємозв'язком факторів, що виражаються у взаємних впливах та індукції, міцним перекриванням ефектів. Недивлячись на поліфункціональність та небезпеку розвитку токсичних ефектів, цитокини в наш час все ширше використовуються у якості лікувальних засобів.

Запитання:

1. Назвіть основні механізми дії цитокінів.
2. На які групи поділяють цитокини за біологічними властивостями
3. Які цитокини відносяться до протизапальних.

4. Які цитокіни відносять до прозапальних.
5. Хто є головним продуцентом ІЛ-2.
6. Які ростові фактори ви знаєте.
7. Назвіть функції ФНП- α , β .
8. Які види інтерферонів ви знаєте.
9. Назвіть основні ефекти ІФН- γ
10. Що таке хемокіни. Назвіть їх представників.

Література

14. М. Якобісяк. Імунологія/Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
15. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
16. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и алергология. – М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.: ил.
17. С.А. Кетлинский, Н.М. Калинина / Иммунология. – 1995. - №3. – С. 30-49
18. Біла Н.В. / Лабораторна Діагностика. – 2005. - №3. – С.6-8.
19. Марушко Т.В., Бережний В.В., Гавриленко Т.І. /Український ревматологічний журнал .– 2006. - №1(23). – С.33-36.

7.5 Система комплементу

Серед антигенспецифічних гуморальних факторів імунного захисту велике значення має система комплементу, в склад якої входять 25-30 сироваткових і мембранних білків, які приймають участь в каскадній реакції при імунологічному реагуванні організму людини на втручання відмінного за антигенним складом агенту. У звичайному стані каскадні протеїни неактивні. Для їх ініціації необхідний певний стимул, після впливу якого в каскадних реакціях продукт однієї реакції виконує роль каталізатора для здійснення наступної. Активація системи комплементу відбувається при взаємодії з продуктами інфекційних агентів, манозозв'язуючим білком сироватки крові, С-реактивним білком та імунними комплексами.

Вважається, що система комплементу є прикладом тісного взаємозв'язку між специфічними механізмами імунітету і вродженими факторами імунологічного захисту.

Основні характеристики даної системи полягають в тому, що:

- система на розпізнає антигени, активується антитілами, відповідає за ефektorні механізми імунної відповіді;
- більшість білків системи активується в певній послідовності при ланцюговій реакції комплексами антиген-антитіло і реалізує ефекти на рівні клітинних мембран.

Здійснюються наступні імунологічні ефекти:

1. Опсонізація - ефект полягає в тому, що одразу ж за активацією комплементу відбувається виділення опсонізуючих компонентів, які покривають патогенні організми або імунні комплекси, що в свою чергу, призводить до підсилення процесу фагоцитоза. Процес опсонізації і дегрануляції торкається в основному мастоцитів і нейтрофілів. Термін "опсонізація" означає процес приєднання до мікроорганізму різних молекул, які відіграють роль лігандів (контррецепторів), до яких і

прикріплюються мононуклеарні клітини, які мають на своїй поверхні рецептори до цих лігандів. Вперше процес опсонізації був описаний Райтом і Дугласом в 1903 році. Насьогодні вже вивчені молекулярні основи цього процесу, в якому приймають участь дві групи опсонинів: молекули деяких імуноглобулінів; 3-й компонент комплементу (C3). Насьогодні визначені декілька рецепторів на фагоцитуючих клітинах, які здібні зв'язуватись з Fc-фрагментом імуноглобулінів. Так, наприклад, Fc-гамма R₁ –рецептор на мононуклеарах зв'язується з IgG₁G₃G₄. Таким чином, досить велика група опсонинів це є молекули імуноглобулінів, перш за все IgG і його ізотипи і IgA. Інша група опсонинів представлена C3 компонентом комплементу. Описано три рецептора C3, які представлені на мембрані різних клітин - CR₁, CR₂ CR₃. Доведено, що CR₁, зв'язується з активованим C3 (C3b); CR₂ з C3d; а CR₃ – з інактивованим C3 (C3bi). В усіх випадках таке зв'язування призводить до підсилення фагоцитозу опсонизованих мікроорганізмів. Такі складні взаємовідносини між усіма цими опсонінами і відповідними до них рецепторами на клітинах являють собою головний захисний механізм антмікробному імунітету.

2. Лізис клітин-мишеней (бактеріоліз, цитоліз) – на кінцевій стадії активації системи комплементу утворюється „ мембранно-атакуючий” комплекс із пізніх компонентів даної системи , який втілюється в мембрану антигенного агента і порушує останню.

3. Ефект хемотаксису, який проявляється на рівні нейтрофілів і полягає в переміщенні клітин у напрямку зростання концентрації хемотаксичного фактора.

4. Дегрануляція, яка полягає у вивільненні гранул клітиною і стосується переважно мастоцитів і базофілів.

Білки активованої системи комплементу утворюють мультимолекулярні комплекси (рис2), які виконують три основні функції:

- 1) стимулюють гострі запальні реакції;
- 2) змінюють поверхню антигена для збільшення ефективності фагоцитозу;
- 3) модифікують клітинну мембрану інфекційного агента, що приводить до лізису мікроорганізма (формують в мембрані клітин, водні канали, завдяки чому в клітину потрапляє вода і вона підлягає лізису).

Ці реакції призначені для боротьби з бактеріями, що проникли зовні, забезпечують захист від вірусних інфекцій, елімінують білкові комплекси і активують розвиток імунних процесів. Приклад взаємодії такого комплексу з молекулами антитіл IgG, представлені на рис.

Рис.1 Взаємодія комплексу C1 (C1q, C1r₂, C1s₂) з двома молекулами IgG, зв'язаними антиген.

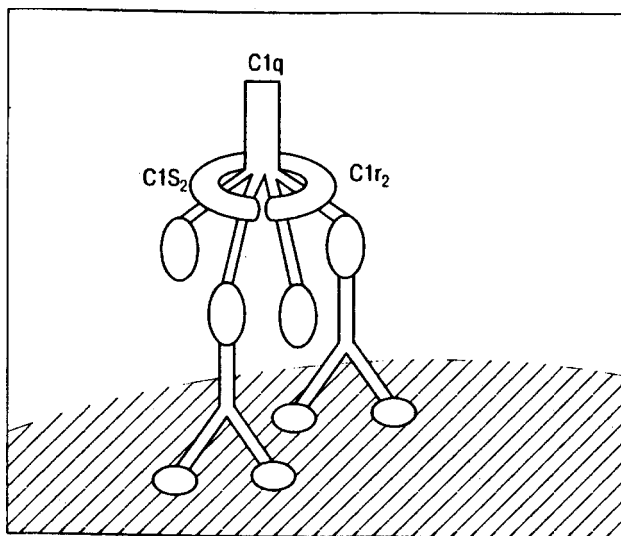
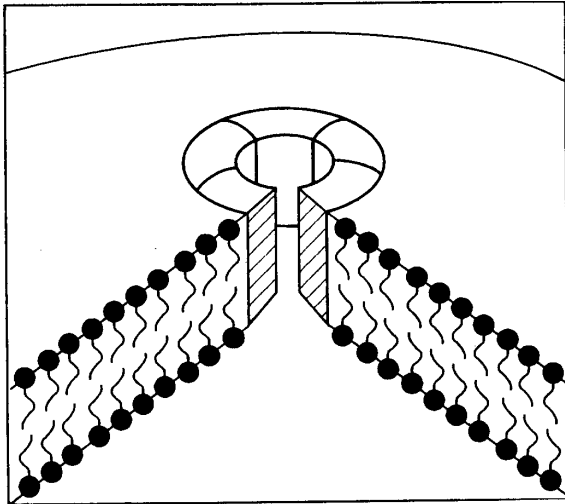


Рис.2 Утворення трансмембранного каналу (мембраноатакуючого комплексу) за рахунок полімеризації C9.

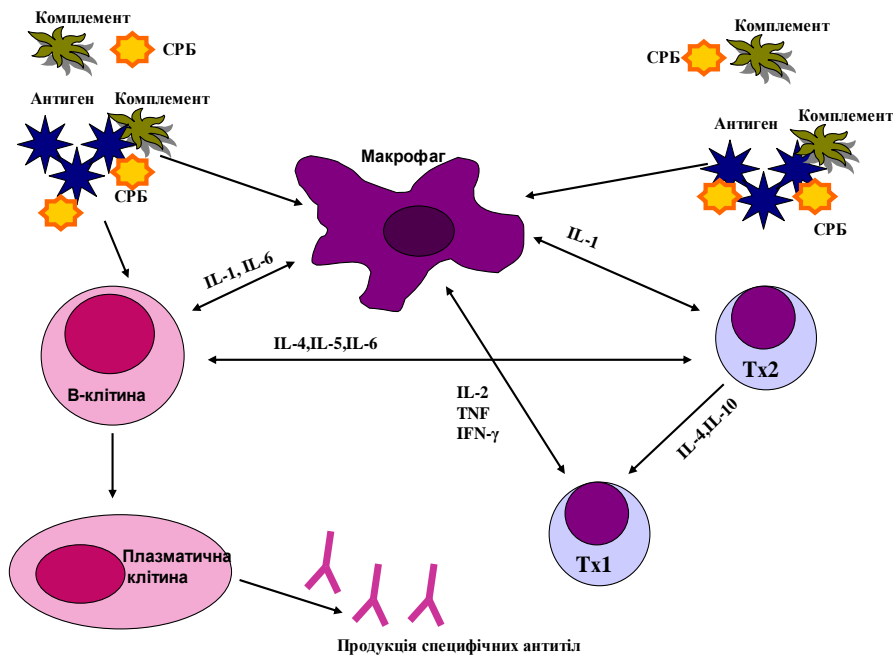


Механізми участі комплементу в імунологічних реакціях

Внаслідок активації комплементу може призвести не тільки до знищення бактеріальних і паразитарних і пухлинних клітин шляхом ушкодження клітинної мембрани, але і за допомогою багаточисельних рецепторів до компонентів комплементу (на фагоцитах) може „притягнути” останні до місця інфекційного ураження і сприяти фагоцитозу бактерій.

Комплемент при гнічує преципітацію імунних комплексів шляхом індукції розчину вже преципітованих комплексів і сприяє їх видаленню.

Рис. Взаємодія вродженої та набутої імунної відповіді при вторгненні антигену.



Рецептори до різних субкомпонентів системи комплементу мають також еритроцити (фіксують на собі імунні комплекси і забезпечують їх транспортування в печінку і селезінку, а також їхню елімінацію), тучні клітини і базофіли, клітини гдідкої мускулатури, дендритні клітини селезінки і лімфовузлів, В-лімфоцити, деякі субпопуляції Т-лімфоцитів і клітини натуральних кілерів(НК). Ці рецептори забезпечують тривале депонування антигенних комплексів в дендритних клітинах і активну взаємодію цих антигенпрезентуючих клітин (АПК) і В-лімфоцитів. В результаті цієї взаємодії посилюється проліферація антигенспецифічних В-лімфоцитів і їх диференціювання у довгоживучі малі В-лімфоцити – клітини імунологічної пам'яті.

Вроджені або природжені дефекти синтезу білків системи комплементу і їх рецепторів проявляються схильністю до гнійних інфекційних захворювань, інфекціям, викликаних бактеріями та схильністю до розвитку аутоімунних захворювань. Підвищенна активність білків системи

комплемента, пов'язана з вродженим чи набутим дефектом синтезу інгібітора компонента C1 системи комплемента (в крові підвищена активність C3a- і /або C5a-компонента), проявляється розвитком псевдоалергічного ангіоневротичного набряку.

Таким чином, з позицій імунології, система комплементу являє собою комплекс сироваткових білків, які здатні до самоорганізації і опосередкуванню реакцій гуморальної відповіді.

Номенклатура

Насьогодні відомо, що система комплемента складається з 9 основних білків і 3 інгібіторів.

Система комплемента (номенклатура)

- **Білки класичного шляху активації і комплексу, який лізує мембрану, позначені номером і вступають в реакцію активації в наступній послідовності: C1q, C1r C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9.**

Дана система активується за принципом ферментативно-каскадної реакції з утворенням розчинних і нерозчинних ферментів і комплексів, які здібні викликати різні біологічні ефекти (см.вище). Компоненти, які входять до складу системи комплементу позначаються *прописною* (великою) літерою **C** з порядковими номерами від 1 до 9. Субодиниці і фрагменти, які утворюються при розщепленні компонентів комплементу позначаються порядковими номерами з малими літерами (наприклад, **C2a**, **C3b**). Активовану форму комплементу, яка має ферментолітичну активність, позначають штрихом зверху над позначенням компонента комплементу з його субкомпонентами (наприклад, **C1ⁱ**). Якщо активований компонент комплементу позбавляється активності, тоді для позначення цього явища додається літера **I** (наприклад, **C3ⁱ**). Місце синтезу компонентів комплементу наведено в табл.

....

Таблиця - _7.5.1_____ **Місце синтезу компонентів комплементу**

Компонент	
C1 q	Моноцити/ макрофаги, фібробласти, астроцити, легені
C1r/s	Моноцити/ макрофаги, фібробласти, астроцити
C2	Моноцити/ макрофаги, фібробласти, печінка, селезінка, кістковий мозок, легені
C3	Моноцити/ макрофаги, жирова тканина, печінка, шкіра , легені, астроцити
C4	Моноцити/ макрофаги, фібробласти, печінка, селезінка
C5	Макрофаги
C6	Печінка
C8	Печінка, кишківник, нирки, селезінка, легені
C9	Печінка
Фактор В	Моноцити/ макрофаги, фібробласти, ентероцити, жирова тканина, астроцити, шкіра, печінка
Фактор D	Моноцити/ макрофаги, жирова тканина
Фактор I	Моноцити/ макрофаги, клітини ендотелію , печінка
Фактор H	Моноцити/ макрофаги, клітини ендотелію , печінка, шкіра

Пропердин	Моноцити/ макрофаги
-----------	---------------------

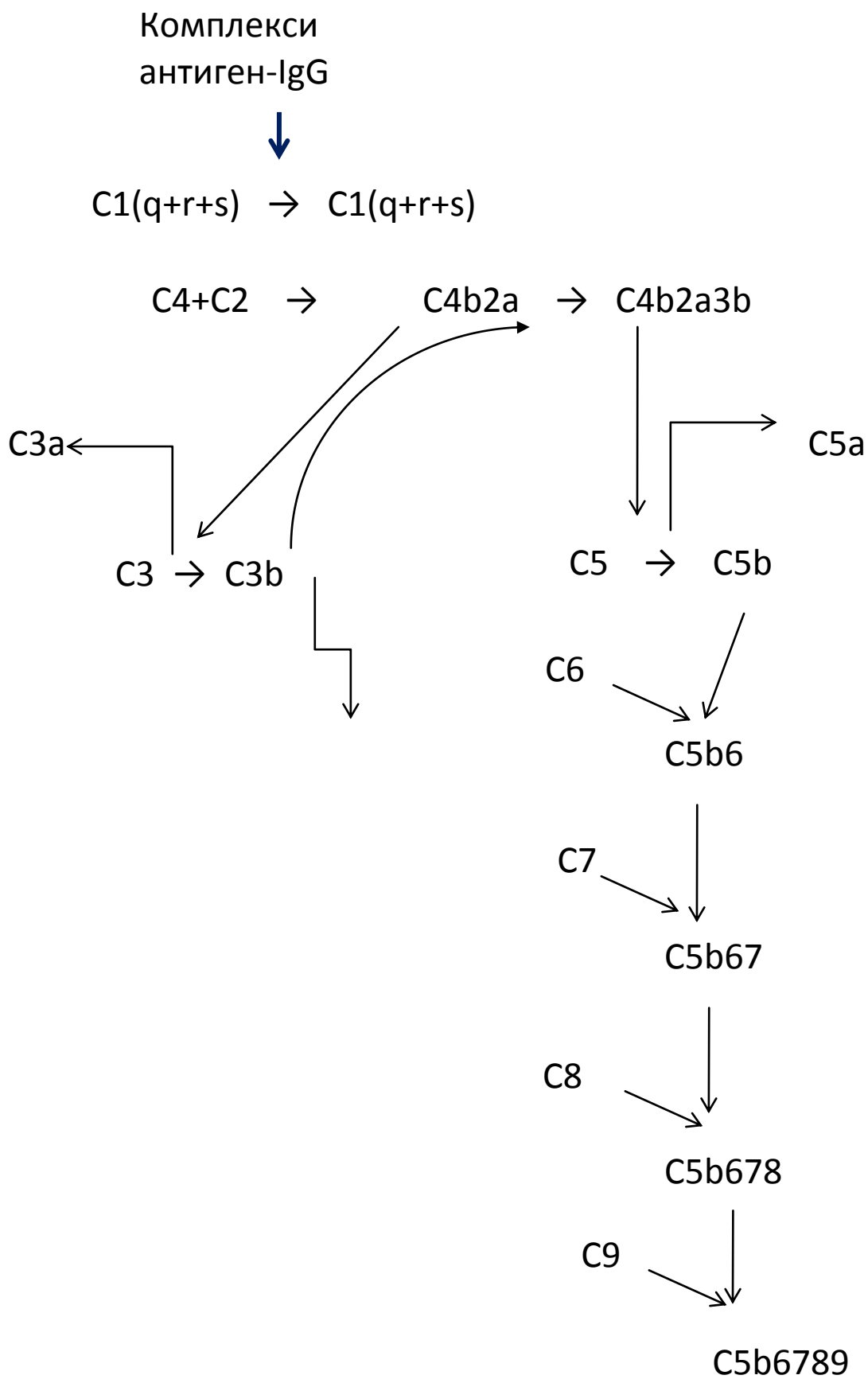
Компоненти комплементу циркулюють в крові в неактивному стані. Активація системи комплементу може відбуватися двома шляхами – класичним або імунним, і альтернативним, або пропердиновим.



Які ж відмінності існують в активації системи комплементу класичним шляхом від альтернативного?

- Для активації системи комплементу за класичним шляхом необхідно утворення специфічних імуноглобулінів (IgG, IgM) і імунних комплексів, що потребує певного часу.
- Класичний шлях активації починається з перших (ранішніх) компонентів комплементу, зокрема з C1, якій складається з трьох субкомпонентів (C1q, C1r, C1s), і далі C4, C2, C3.

Схема 1. Класичний шлях активації комплементу



Система комплементу активується за каскадним типом: при активації попереднього компонента відбувається його розщеплення. Один з компонентів залишається на поверхні клітини, яка приймає участь в утворенні імунного комплексу, а другий компонент є розчинним і переходить в рідку фазу, тобто в сироватку крові. Той компонент, який залишився на поверхні клітини – на імунному комплексі, надбає властивості ферменту і здібність впливати на наступні компоненти комплементу шляхом їх активації. Для активації системи комплементу імунним комплексом необхідно, щоб в склад останнього входило не менш ніж дві молекули **IgG**, або одна молекула **IgM**. Велику активність мають також три ізотипи молекул **IgG** – **IgG₁**; **IgG₂**; **IgG₃**. Активація системи комплементу відбувається в умовах зв'язування C1q зі специфічним сайтом в регіоні Fc фрагменту імуноглобулінів. Для **IgG** це є **CН2-домен**, а для **IgM** це є **CН4 домен**, який входить до **Fc** фрагменту імуноглобулінової молекули.

Активація починається з першого субкомпонента комплементу C1q, який фіксується на Fc фрагменті імуноглобулінів і який при цьому зазнає конформаційних змін, що дає можливість для фіксації до нього **C1r**, який каскадно набуває можливість фіксувати і активувати C1s. Утворенню активного C1 перешкоджає C1 інгібітор. Він, по суті, здійснює контроль за активністю, з якою активується комплемент за класичним шляхом. Це є дуже важливим, оскільки, наприклад, при вродженому дефіциті (на рівні кількості або функції) C1 інгібітора розвивається хвороба – ангіоневротичний *отек*.

Як результат фіксації і активації C1 утворюється активний комплекс із складових частин C1, який набуває властивість активувати C4. Активований C4 розпадається на два фрагменти: C4a, який переходить в розчинний стан, і C4b, який залишається на поверхні мембрани клітини, яка входить в склад імунного комплексу і набуває властивості ферменту –естерази, який, в свою

чергу, має здібність активувати компонент C2. Утворений активований C4b в присутності іонів магнію зозчеплює компонент C2 на два фрагменти C2a і C2 b. Потім C2a приєднується до C4b і утворюється нова речовина, яка має ферментні властивості – **конвертаза 3-го компонента комплементу класичного шляху активації.**

Далі, утворена C3 конвертаза (C4b2a), розщеплює C3 на C3a і C3b. Потім C3a переходить до розчинного стану, а C3b є ключовим як для класичного так і для альтернативного шляхів активації комплементу, тобто в даному місці відбувається поєднання обох шляхів активації і далі цей процес відбувається одним шляхом. На цьому етапі також діє інактиватор C3b, який запобігає надмірної активації C3 комплементу.

Активованій C3b зв'язується з комплексом C4b і C2aі перетворюється на новий фермент – конверт азу 5-го компонента комплементу. З цього моменту починається зборка термінальних (кінцевих) компонентів комплементу C5 – C9 , що призводить до утворення мембраноатакуючого комплексу (МАК).

Утворенню активного C1 перешкоджає C1 інгібітор. Він, по суті, здійснює контроль за активністю, з якою активується комплемент за класичним шляхом. Це є дуже важливим, оскільки при вродженому дефіциті (на рівні кількості або функції) C1 інгібітора розвивається хвороба – *ангіоневротичний отек.*

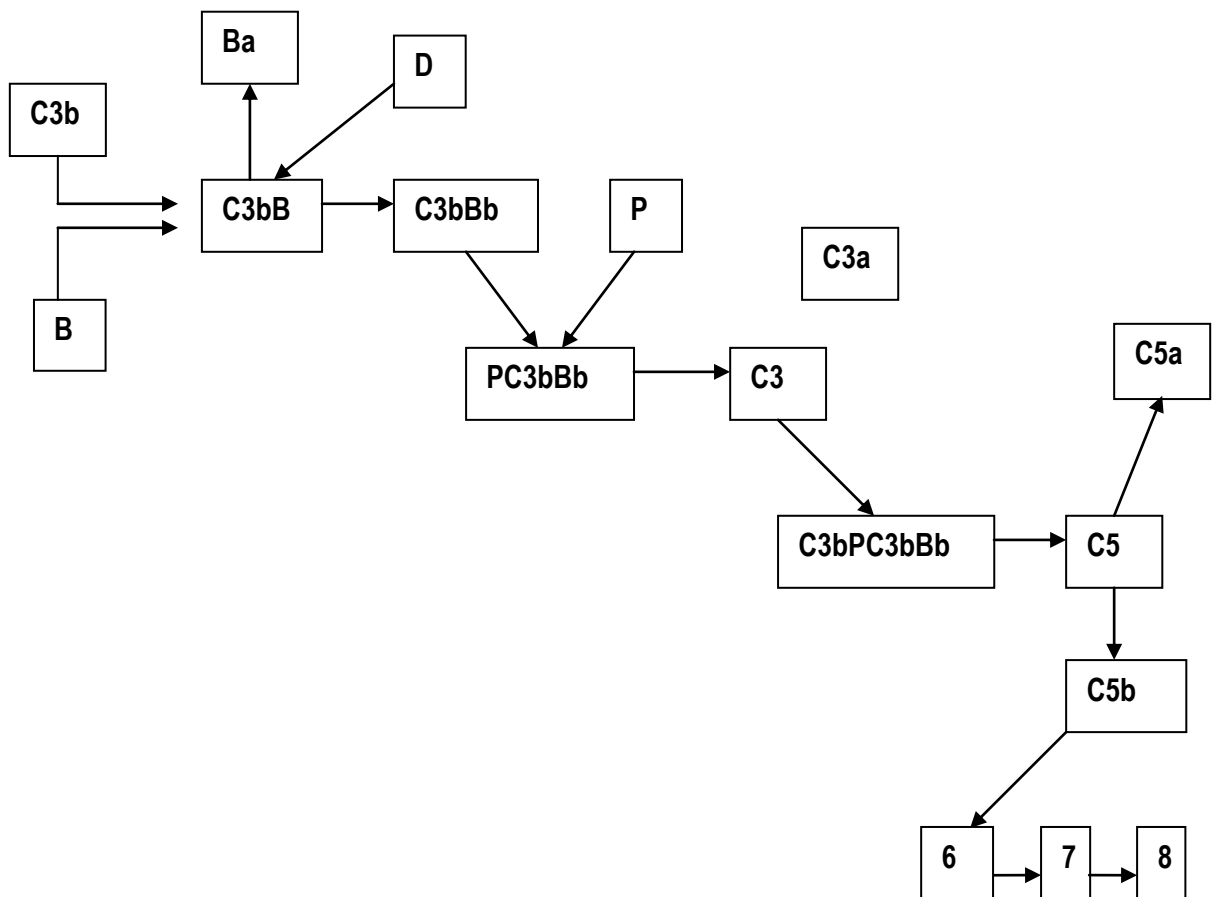
Альтернативний шлях активації комплементу

- Для активації системи комплементу не потрібно утворення імунних комплексів, тобто не витрачається час на продукцію імуноглобулінів.

- Альтернативний шлях не потребує участі перших трьох компонентів комплементу і реакція відбувається одразу ж після дії антигенів. При цьому активаторами альтернативного шляху можуть

бути бактеріальні полісахариди, віруси, пухлинні клітини, а також агреговані імуноглобуліни.

Рис. 2 Альтернативний шлях активації комплементу.



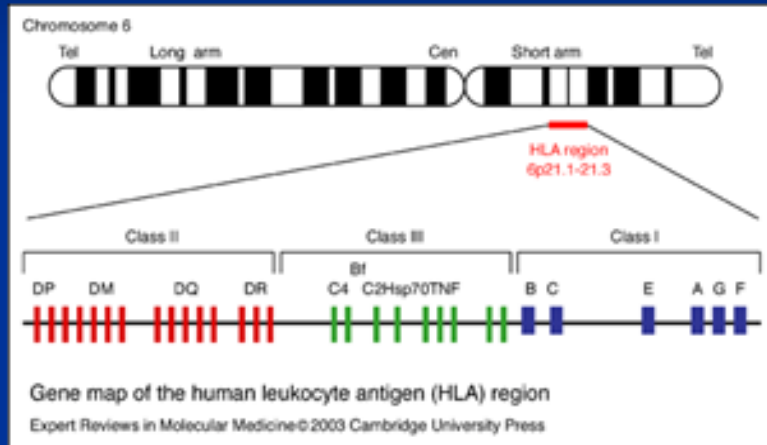
В активації перших етапів альтернативного шляху приймає участь пропердинова система, яка представлена в організмі групою білків – фактори В і D. Фактор D знаходиться у вигляді активного ферменту, субстратом для якого є фактор В. Розщеплення останнього під впливом фактору В супроводжується утворенням активного фрагменту – фактора Bb. Але даний фактор не здійснює протеолітичну дію на неактивний фактор В. Він здатний на протеоліз лише після зв'язування фактору В з активованим фрагментом комплементу C3b, який утворюється в організмі внаслідок

перманентного розщеплення C3. Тільки після зв'язування активованого C3b комплекта, який присутній в організмі в невеликій кількості, з фактором В, фактор D може здійснювати протеолітичну дію на утворений комплекс. При цьому фактор В розщеплюється на фактор Ba, який переходить в розчинний стан і Bb, який в комплексі з C3b, набуває властивості фермента – **конвертаза 3-го компонента комплекта альтернативного шляху активації** (схема). Тобто, в організмі існує дві C3 конвертази: одна для класичного шляху активації C4b2a, інша, C3bBb. Даний білок є нестійким тому білок (P) пропердин з'єднується з C3bBb, стабілізує цей комплекс і забезпечує його довгострокове функціонування по відношенню до C3 альтернативного шляху активування. PC3bBb активує C3 з наступним активуванням C5-конвертази і надалі іде утворення мембраноатакуючого комплексу (МАК). Активація термінальних компонентів комплекта при утворенні МАК відбувається таким же чином як і при класичному шляху активації.

Генетика

Вивчення генетичної структури системи комплекта базувалось на даних про поліморфізм білків даної системи і було започатковано на основі дослідження спадкових гетеро- і гомодефіцитів, а також дисфункції білків і алотипової мінливості. Було встановлено, що за **генетичною характеристикою деякі гени системи комплекта розміщені в межах групи генів системи МНС, або тісно зчеплені з нею, контролюють компоненти комплекта C4 і C2, а також фактор В, який знаходиться скоріше у плазмі крові ніж на поверхні клітин. Гени комплекта розміщені на 6-й хромосомі (рис.) між генами головного комплексу гістосумісності I і II класів і віднесені до генів МНС класу III.**

Схематическое изображение расположения генов системы HLA на 6-й хромосоме



Гени III класу відповідають також за синтез компонентів системи комплементу, фактора некроза пухлин-альфа і -бета, ферментів, які приймають участь в синтезі гормонів. В останні роки в світовій літературі представлені роботи по картуванню генів системи комплементу на рівні кДНК методом блотінгу по Саузерну з застосуванням зондів для C2, C4A, C4B і фактора В, що дало змогу підвищити дослідження ступеню гетерогенності даних білків. Встановлено, що компонент C4 кодується двома генами C4A і C4B, що мають близько 35 алельних різновидів. Компоненти C3, C4, C5 мають подібну структуру.

Таблиця. 7.5.2 Генетичні варіанти компонентів комплементу і їх поширеність (цит.за В.К.Позуром)

Компонент комплементу	Кількість генетичних варіантів	Частота „звичайних” алотипів у нормальних європеїдів
1	2	3
Другий (C2)	3	C (звичайний) 0,95 B (основний) 0,04 A (кислий) 0,01
Четвертий (C4)		

C4A	13	C4A 2 0,080 A 3 0,695 A 4 0,055 A 5 0,005 Q0* 0,110
C4B		C4B1 0,760 B2 0,105 Q 0 0,135
Третій (C3)	> 20	S (повільний) 0,77 – 0,99 F (швидкий) 0,06 – 0,22
П'ятий (C5)	3	I (звичайний) 0,93 II (незвичайний) 0,07 Рідкісний 0,01
Шостий (C6)	8	A (кислий) 0,56 – 0,601 B (лужний) 0,35 – 0,38 Рідкісний 0,015 – 0,05
Сьомий (C7)	3	Звичайний 0,989 Рідкісний 0,011
Восьмий (C8)	5	Кислий 0,649 – 0,700 Лужний 0,246 – 0,348 Кислий (A1) 0,003 – 0,054
Фактор B	11	S (повільний) 0,437 – 0,890 F (швидкий) 0,110 – 0,512 Рідкісний 0,013 – 0,051
Фактор D	2	Звичайний 0,98 Рідкісний 0,02
ІНГ C1	2	Нормально функціонуючий 0,85 (у хворих ВСО) Дисфункціональний 0,15 (у хворих ВСО)
Фактор I	2	B 0,89 A 0,11
Фактор H	3	1 0,69 2 0,30 3 0,01
1	2	3
C4 - bp	2	A 0,96 B 0,04
CRI	4	S F F

*Q0 – нуль-алель

успадкування генетичних відхилень білкових компонентів відбувається за аутосомно кодомінантним типом, що відповідає принципам успадкування алелей інших генетичних систем сироваткових білків і крові. Для підтвердження спадкового дефекту проводять сімейний аналіз, що дає можливість співставлення білкового дефекту у інших членів сім'ї у дослідженої особи і визначити який саме дефіцит компонентів комплементу має місце – гомозиготний чи гетерозиготний. При гомозиготному дефіциті певних компонентів комплементу рівень його не визначається за відсутністю гемолітичної активності. При гетерозиготному дефіциті за одним із компонентів (C1, C2, C3, C4) спостерігається зниження активності на 50% від норми на тлі нормального рівня усіх інших компонентів. Частота гетерозиготного дефіциту C2 в популяції європейців складає близько 1%. За механізмом асоціативного зв'язку дефіциту компонентів комплементу з захворюваннями слід відмітити, що він є тотожним з механізмом асоціацій генетичних алелей системи HLA I і II класів і тісно пов'язаний з патологіями, патогенетичний субстрат яких складають порушення в імунному гомеостазі. Так, гомозиготний дефіцит конкретного компоненту комплементу часто асоціює з імуноревматичними захворюваннями (гломерулонефрит, системна червона вовчанка, анафілактична краснуха, зворотня гнійна інфекція та інш.) За молекулярною структурою компоненти комплементу характеризуються наступним чином:

C1 компонент представлений трьома білками **C1q C1r C1s**.

C1q компонент має глікопротеїнову природу і складається з 18 поліпептидних ланцюгів А, В, С – по шість ланцюгів кожного. За структурою **C1q** компонент має шість сферичних голівок, кожна з яких має Ig зв'язуючу ділянку. Для активації **C1q** компонент має зв'язатися з двома

молекулами IgG, або з однією молекулою IgM. Даний комплекс здатний активувати **C1r**. Ген **C1q** локалізований на 1-й хромосомі.

C1r компонент – поліпептид, активується **C1q компонентом**, в результаті чого відбувається розщеплення його на важкий та легкий ланцюги. Даний компонент має високу гомологію з компонентом **C1s**.

C1s компонент – одноланцюговий поліпептид. Його активна форма здатна розщеплювати C4 і C2 компоненти.

C4 компонент – складається з α , β і γ ланцюгів. За умов активації системи C1-компонент відщеплює від α -ланцюга фрагмент з ММ 9000, завдяки чому утворюється **C4 α -компонент**, а залишковий білок є **C4 β** компонентом. Фактори 1 і **C4 β r** відщеплюють в α -ланцюзі **C4 α -компонент** (ММ 47000) і в результаті цього залишається білок з ММ 147000, який являє собою інтактні β і γ ланцюги, до яких приєднані за рахунок дисульфідних зв'язків α_3 і α_4 ланцюги. C4 компонент комплементу може існувати в двох формах: C4A і C4B. Ці форми є продуктом різних алелей. C4A білок переважно здатен зв'язуватись аміногрупами, а білок C4B – з гідроксильними групами. Методом ізоелектричного фокусування в гелі з наступною імунофіксацією ідентифіковано 13 алелей C4A і 22 алеля C4B компонентів комплементу.

C2-компонент являє собою білок з ММ 90000-102000. При дії C1s він розпадається на два фрагменти: **C2 α** і **C2 β** . Визначено три алельні форми C2-компонента: **C2C** (складає 95%) і **C2B** (складає 4-5%) і **C2A** (форма яка зустрічається виключно рідко). C2C тісно зчеплена в **BS-фактором**, **C4A3**, **C4B1**, **HLA B7**; **HLA-DR2**. Встановлено, що для європеїдної популяції характерним є дефіцит C2 компонента комплементу. Більш ніж 50% осіб гомозиготних за дефіцитом C2 хворіють на системну червону вовчанку.

C3-компонент має дволанцюгову білкову молекулу з ММ 185000. Під впливом C3-конвертази α -ланцюг розщеплюється на **C3 α** (анафілатоксин) і **C3 β** фрагменти. Фактор 1 сумісно з фактором Н відщеплює від C3 β

фрагмента - фрагмент C3f, в результаті чого залишковий фрагмент стає неактивною субстанцією C3b від якої в наступному під впливом фактора ! разом з фактором CR1 або H може відщеплюватись фрагмент C3dg, залишаючи компонент **C3c**. Під впливом трипсину або еластази **C3dg** фрагмент розщеплюється до **C3d** і **C3dg** або **C3e** компонентів.

Описано більше 18 генетичних алотипових варіантів **C3**. В популяції європеїдів визначаються два варіанти **C3** компонента (**C3S** і **C3F**), які поширені з різною частотою. Встановлено асоціативні зв'язки з певними захворюваннями (табл.). Гомозиготний дефіцит **C3** зустрічається дуже рідко. Як правило, він асоційований з рецидивуючими інфекціями, які викликані пневмококами і стрептококами. При гетерозиготному дефіциті рівень **C3**-компоненту складає близько 50% від норми.

C5-компонент являє собою дволанцюговий (α і β) білок, в якому α -ланцюг має ММ 115000. Під впливом **C4b2a3b** розщеплюється на два біологічно активних фрагменти: **C5a** і **C5b**. Фрагмент **C5a** є сильним хемотаксичним фактором – анафілатоксином, який фіксується на тучних клітинах, що призводить до викиду гістаміну та інших біологічно активних амінів, сприяє підвищенню проникливості стінок судин і скороченню гладких м'язів. β -ланцюг має ММ 57000. Його **C5b** фрагмент є ініціатором ним білком для утворення термінального комплексу комплемента і здатний зв'язувати **C6** і **C7** компоненти. В результаті такої активації формується тримолекулярний комплекс **C5bC7**, до якого приєднуються гідрофобні ділянки мембран. Встановлено, що клітини гомозиготних за **C5**-дефіцитом індивідів не здатні до хемотаксису. Гетерозиготні за **C5**-дефіцитом особи містять **C5** компонента 50% від норми.

C6 - компонент являє собою одно ланцюговий глікопротеїн з ММ 128000. Він має здатність до протезної активності. Визначено 8 алотипів **C6**. За даними деяких дослідників гени алотипів **C6** зчеплені з геном **C7**. Сироватка крові з дефіцитом **C6** не має бактерицидної активності. За популяційним

поширенням дефіцит за **C6** зустрічається частіше у негроїдній расі ніж у білої расі.

C7-компонент є гетеро полімером, який здатний приєднуватись на мембрані до C5bC6, і в результаті чого утворюється димер C5-7. Визначено три алотипи C7, але жодний з них не асоційований з будь яким захворюванням.

C8-компонент являє собою трьох ланцюговий білок з ММ 152000, який має здатність за рахунок β -ланцюга приєднуватись до мембранозв'язаного комплексу C5-7, що сприяє формуванню мембранних каналів діаметром 30Å . Це, в свою чергу, сприяє підвищенню проникливості мембрани для низькомолекулярних речовин. Комплекс C578 каталізує зв'язування і вбудову в мембранну поверхню близько двох десятків молекул C9, які пронизують наскрізь ліпідну мембрану і утворюють лійкоподібний канал діаметром 100Å , через який досить вільно проходять солі та інші низькомолекулярні речовини. Це сприяє підвищенню осмотичного тиску, в результаті чого клітина набрякає, лопається і гине. Визначено 5 алотипових варіантів C8, для яких також не встановлено вірогідних асоціативних зв'язків з патологічними процесами. Дефіцит окремих ланцюгів C8 компоненту комплемента частіш всього знижує функціональну активність C8. В панміктічній популяції поширення алотипів є досить рівномірним. Дефіцит β -ланцюга притаманний європейській популяції, тоді як дефіцит α і γ ланцюгів характерно для негрів і іспанців.

C9 - компонент є одно ланцюговим білком з ММ 71000, який розчеплюється α -тромбіном на гідрофобні і гідрофільні фрагменти. C9 може існувати в мономерній і полімерній формах. Вважається, що такі властивості пов'язані з здатністю C9 проникати через ліпідні шари мембрани, полімеризувати її, в результаті чого утворюються трансмембранні канали. Полімеризація C9 призводить до формування нової антигенної специфічності. Антитіла до C9 реагують з C9RP білком, який відіграє

важливу роль в лімфоцитозалежному лізісі клітин, оскільки саме ці антитіла інгібують цитотоксичність натуральних кілерів (NK клітин).

Фактор В є глікопротеїном з ММ 95000. Він має протеазну активність і приймає участь в активації альтернативного шляху. За присутності і дії фактору С3b і під дією фактору D він розщеплюється на два фрагменти: Ва і Вb. Фрагмент Ва, який переходить в розчинний стан, є хемотаксичним фактором для нейтрофілів. Фрагмент Вb активує макрофаги і сприяє їх прикріпленню і розплануванню на поверхні клітин. Фактор В утворює магній-залежний комплекс з С3b або з С3b-подібним білком S і під впливом фактора D утворюються С3 і С5 конвертази. С3 конвертаза каталізує активацію С3 компонента, перетворюючи його у С3b, який потім, дає початок алотипам фактора В.

Пропердин Р є тетрамерним білком з ММ 22000. Він активується в результаті контакту з С3bВb, який в свою чергу, змінює конформаційну структуру молекули пропердину. Активований пропердин зв'язується з С3b і сприяє розвитку альтернативного шляху активації комплементу, стабілізуючи існуючу конвертазу. Відомості про алелі пропердину в світовій літературі відсутні. Представлені окремі дані відносно асоціаційного з-в'язку дефіциту пропердина з рецидивуючими інфекціями.

Фактор D являє собою серинову протейназу трипсинового типу, яка приймає участь в активації комплементу за альтернативним шляхом. Має ММ 25000. В кровотоці дорослої людини знаходиться в ферментативно активній формі. Фактор D має високу гомологію з трипсином, але має здатність до високої специфічності. Разом з фактором В за присутності магнію перетворює S-С3b в С3 конвертазу, після чого відбувається ферментативне розщеплення фактору В. Алотипові варіанти фактору D невідомі.

Інгібітор C1 – належить до класу регуляторних білків, які приймають участь в активації комплементу і в процесах коагуляції. Він є інгібітором сери нових протеїназ і пригнічує дію C1r і C1s, калікреїна, фактора X_{1a} плазміна і фактора Хагемана. Алотипи даного білка невідомі.

Фактор J – є сери новою протеїнкаіназою, яка в присутності C4 розщеплює α -ланцюг C3b компонента на три фрагменти. За молекулярною структурою фактор J складається з двох ланцюгів з ММ 50000 і 38000 відповідно. Він також може здійснювати функції кофактора C4bp при розщепленні C4b. Дефіцит фактора J асоційований з рецидивуючими інфекціями.

Фактор H - локалізований на 1-й хромосомі, відомий як стимулятор дії фактора J на C3b компонент. Крім того він вважається конкурентом фактора в зв'язування саме цього компонента. Фактор H є кофактором фактора I, що розкладає C4b і C3b. Завдяки цьому імунні комплекси вже при транспортуванні еритроцитами розкладаються фактором I.

C4bp – являє собою багатоланцюговий глікопротеїн, який має не менш 7 ланцюгів.

Він зв'язує C4b і тим самим здійснює контроль за утворенням C3 конвертази класичного шляху активації комплементу. Встановлено, що **C4bp** конкурує з **C2a** за сайт зв'язування **C4b** з фактором J. Існує декілька алотипів даного білка.

Рецептори комплементу

Рецептори комплементу представлені глікопротеїновими структурами, які розміщені на поверхні різних типів клітин біологічної системи, якою є організм людини і здатні взаємодіяти з компонентами комплементу або їх фрагментами, виконуючи регуляторну функцію як для системи комплементу так і для клітин. Наскільки важливою є функція регуляції системи комплементу? Відомо, що комплемент має властивості до утворення каналів у клітинній мембрані, індукції фагоцитозу і дегрануляції

мастоцитів на тлі виділення активних біологічних факторів, що складає певну загрозу для організму з боку можливості ураження власних клітин і тканин, що свідчить про необхідність постійного контролю з боку різних механізмів регулювання його активності. Регулюючі механізми можна розділити на ті, що зв'язані з клітинними мембранами і на ті, що діють у тканинних рідинах, зокрема у лімфі. **Регулюючі фактори, які присутні в клітинних мембранах представлені рецепторами комплементу.**

Таблиця – 7.5.3 ____ Клітинні рецептори до компонентів комплементу та деякі мембранні білки, які зв'язують комплемент.

Рецептор	Мол. Маса	Ліганд	Тип клітин
C1q		C1q	Тромбоцити, В-ЛФ, фібробласти, нуль-клітини, пліморфнофункціональні лімфоцити
C3a		C3a C4a	Тучні клітини, макрофаги, Е-лімфоцити (ПМЛ)
СК1	205 000- 250 000	C3b iC3b C4b	Еритроцити, ПМЛ, моноцити, макрофаги, дендритні клітини, клітини Лангерганса, Лімфоцити
Ск2	145 000	iC3b C3dg C3d	Нейтрофіли, моноцити, макрофаги, НК-клітини
Ск3	270 000	iC3b	Тромбоцити, НК-клітини, моноцити, великі гранулярні лімфоцити
C3e		C3e	Більшість лімфоцитів,
Н	150 000	Н	В-лімфоцити, моноцити, макрофаги, гранулоцити
C5a		C5a	Мастоцити, нейтрофіли, моноцити, макрофаги
gp45-70	45 000-70 000		Тромбоцити, моноцити, В-лімфоцити, Т-лімфоцити

CR1 (CD35) рецептор, який ще називають **C3bR** рецептором, наявний в різній концентрації на багатьох клітинах. Наприклад на одному еритроциті вміщується 500-600, на нейтрофілі – 5 – 40 тисяч, на лімфоциті – 3-40000. Кількість цих рецепторів зростає при активації клітини. Активуючими факторами можуть бути як хемотаксичні фактори, так і зв'язування **FcR** рецепторами нейтрофіла антитіл IgG, що оточують дану молекулу. Активація спричиняє не лише збільшення кількості **CR1** і **CR3**, але і перетворення їх з рецепторів, які здатні лише до зв'язування оточених комплементом молекул в рецептори, завдяки яким відбувається фагоцитоз.

Фагоцитоз через **CR1** стимулюється також фібронектином і ламініном. **CR1**, як і **CR2** і **CR3** також бере участь у захопленні дендритними клітинами антигенів, які містяться в комплексах.

Незважаючи на те, що на одному еритроциті **CR1**-рецепторів небагато, враховуючи кількість самих еритроцитів, вони становлять 85-90% всіх **CR1** наявних у крові. Рецептори, які присутні на еритроцитах виконують важливу роль видалення з кровообігу імунних комплексів, що містять комплемент, які могли би відкладатись у нирках і спричиняти їх ушкодження. Прилягання оточених комплементом імунних комплексів або бактерій до еритроцитів має назву імунної адгеренції.

CR1 є рецептором до **C3b** компонента, або **C4b**, збільшує швидкість руйнування **C3**-конвертаз класичного та альтернативного шляхів і таким чином інгібує активацію комплементу в цілому. **CR1** рецептор має ММ від 160000 до 290000. Описано чотири алотипи **CR1**-рецептора.

CR2-рецептор - є глікопротеїном, який експресується на В-клітинах і стимулює їх проліферацію. **CR2-рецептор** здатний зв'язувати **C3dg**, **C3d** і вірус Епштейна-Барра. При захворюванні на системну червону вовчанку має місце знижений вміст даного рецептора на В-лімфоцитах. Перекважно наявний на В-лімфоцитах, дендритних клітинах і клітинах оболонки горла.

Він стимулює активацію В-лімфоцитів через молекули CD19, CD81 (TAPA-1), з яким зв'язується у клітинній мембрані. Відомо, що деякі антигени у поєднанні з компонентами комплементу, що розпізнають CR2-рецептор, стають в 10000 разів імуногеннішими. CR2 є рецептором для вірусів Епштейна Барра, що сприяє ураженню цих клітин.

CR3 – рецептор (CD11b/ CD18b) є мембранним глікопротеїном з ММ 270000. Цей рецептор специфічно зв'язує **C3b** компонент, приймає участь у IgG-залежному фагоцитозі бактерій. Окрім в участі у фагоцитозі солекул або клітин, які зв'язують компоненти комплементу, має властивість безпосередньо зв'язувати деякі бактерії. Даний рецептор зв'язується послідовністю **RGD (Arg – Gly-Asp) в iC3b**, а також в деяких інших білках, наприклад у фібриногені і фібрині і в деяких поверхневих молекулах (**ICAM-1**), що присутні на клітинах епітелію. **CR3** присутній також на К-клітинах, де функціонально полегшує антитіло залежну клітинну цитотоксичність.

C1qR – рецептор експресується на поліморфно-ядерних лімфоцитах, 0- клітинах, моноцитах і тромбоцитах, а також на фібробластах. Через **C1q – рецептор** клітини проявляють атитілозалежну і антитілонезалежну клітинну цитотоксичність. Даний рецептор зв'язує також колективи і бере участь у фагоцитозі.

C3a – рецептор експресується на Т-лімфоцитах, тучних клітинах і макрофагах. Приєднання C3a і C4a компонентів супроводжується виділенням інтиерлейкінц-1 і вазоактивних амінів, простагландинів, через що пригнічується імунна відповідь.

C3e – рецептор експресується на поліморфно-ядерних лімфоцитах і є специфічним до C3e компонента комплементу. Сааме через нього кістково-мозкові лейкоцитинакопичують і секретують лізосомальні гранули, які містять ферменти.

H – ***рецептор*** експресується на поліморфно-ядерних лімфоцитах, В-лімфоцитах і моноцитах. Приєднання до рецептора фактора Н призводить до виділення фактора J , синтезу ДНК і бластоутворенню.

C5a – ***рецептор*** є стимулятором антитіло утворення в системі in vitro, а також факторів запальних реакцій, зокрема лейкотриєнів. Даний рецептор міститься в моноцитах і поліморфно-ядерних лейкоцитах.

Ap 45-70 ***рецептор*** – являє собою білок, який має ММ 15000-70000. Ідентифікується на моноцитах, Т-, В-лімфоцитах, тромбоцитах. Він є кофактором фактора **J** в умовах деградації **C3b** і **C4b**.

табл.7.5.4. Алотипи системи комплементу та асоціації з захворюванням.

Комплемент	Алель	Асоціація із захворюваннями
C2	B,C B	Дефіцит 21-гідроксилази Інсулінозалежний цукровий діабет
C4	A4, B2 AQ0, B3 A2, B2 B2, 9 AQ0 AQ0, BQ0 BQ0 F1	Дефіцит C2, множинний склероз Дефіцит 21-гідроксилази Відкладений дефіцит 21-гідроксилази Ревматоїдний артрит , ГН, діабет СЧВ ПСПЕ Склеродерма Лепроматозна лепра („монголоїдна популяція”)
C3	F F F F F f	Ревматоїдний артрит Атеросклероз МППН (тип II), парціальна ліподистрофія СЧВ Кістозний фіброз Артрит і ГН
Фактор В	F F FS S F1 F1 F 0,55	Дитячий ідіопатичний нефротичний синдром Запалення очного нерва Стеаторея Анкілозуючий спондиліт Мембранозний ГН Інсулінозалежний цукровий діабет Дисфункціональний фактор В

Фізіологічна функція системи комплементу.

Система комплементу є однією з найважливіших систем імунного гомеостазу, яка представлена неспецифічними факторами резистентності і є невід'ємною складовою реалізації гуморальної імунної відповіді. Дана система належить до факторів природженого імунітету, оскільки фактори комплементу не мають властивості розпізнавання антигенів, а при активації за класичним шляхом активується антитілами. Сама назва системи походить від властивостей доповнення ролі антитіл.

Вище ми вже розглядали, що в межах імунної системи існують специфічні і неспецифічні механізми реалізації імунної відповіді. Неспецифічні механізми називають природженими (innate). Філогенетично вони розвинулися раніше, чому і є менш досконалыми, але діють значно швидче механізмів набутого імунітету, тобто створюють першу лінію імунологічної оборони організму. В цих механізмах окрім системи комплементу беруть участь фагоцити (як макрофагит так і гранулоцити), лізоцим, інтерферони, а також клітини, які здатні проявляти спонтанну цитотоксичність.

Специфічні механізми філогенетично є молодшими. За цими механізмами повний розвиток імунної відповіді вимагає певного часу, але вони є високоселективними і реагують з високою точністю до визначеного відмінного за специфічністю агента. До них належать антитіла, синтезовані В-лімфоцитами, та Т-лімфоцити з рецепторами, які зв'язують відповідний антиген. При пролонгованому контакті з антигеном розвивається бурхлива високоспецифічна вторинна імунна відповідь,

оскільки наш організм вже запам'ятав перший контакт з даним антигеном. На кожному етапі існує тісна кооперація на рівні взаємодоповнення специфічних і неспецифічних механізмів імунологічного реагування.

Тобто система комплементу інтегрально відображає тісний взаємозв'язок між специфічними механізмами імунітету та природженими факторами захисту.

Система комплементу відповідає за певні ефекторні механізми імунної відповіді. Сумісно з регулюючими факторами він охоплює групу близько 30 білків сироватки і тканинних рідин. Більшість білків активується у певній послідовності в ланцюговій реакції комплексами антиген-антитілої їх ефект переважно стосується клітинної мембрани. Ми також розглядали види такого ефекту і наведені дані свідчать про те, що активація системи комплементу призводить до утворення великої кількості біологічно активних компонентів. Важливу роль відіграє система комплементу в патогенезі хвороби імунних комплексів, оскільки сприяє локалізації і елімінації антигену. При цьому накопичення мілкодисперсних імунних комплексів на базальних мембранах мікроциркуляторного русла створює умови для довгострокової активації системи комплементу, призводить до відкладення імунних комплексів на мембранах і розвитку запалення. Система комплементу є невід'ємною складовою імунного гомеостазу, як з позицій функції вродженої неспецифічної резистентності, участі у вторинній імунній відповіді. Існують інші функції комплементу, полягають, наприклад, у вивільненні з мастоцитів і базофілів преформованих медіаторів анафілаксії. Вони також стимулюють синтез метаболітів арахідонової кислоти. Насьогодні вважається, що активація класичного шляху комплементу за рахунок манозозв'язуючого білка є невід'ємною умовою неспецифічного захисту імунної системи, оскільки за відсутності останнього можуть розвиватися різні порушення в захисних реакціях організму. Наприклад, у післяродовому періоді, коли кількість материнських

імуноглобулінів у дитини буде знижуватись, він стає сприятливим до різного роду інфекцій, оскільки сам спектр антитіл є обмеженим і рівень імуноглобуліну G, який виконує роль опсоніну і має здатність активувати комплемент є низьким. Якщо в цей період у дитини буде низьким і рівень манозозв'язуючого білка, то з'являється додатковий ризик формування різних інфекційних ускладнень. Встановлено ще один первинний дефект в системі комплементу, який має проявлятися у дітей інфекційних ускладнень. Цей дефект визначено у вигляді недостатності двох з чотирьох функціонуючих генів C4 комплементу, тобто недостатності класичного шляху активації комплементу. У людей білої раси у 8% випадків визначено такий дефект в системі комплементу. Оскільки продукти генного локусу **C4b** чотири рази активніші ніж білки, які асоційовані з генним локусом **C4a**, то гомозиготний дефіцит за білковим продуктом C4b локусів буде реалізованим у дітей у вигляді інфекційних ускладнень.

Таким чином, система комплементу не тільки являє собою ланку неспецифічного захисту організму людини від бактеріальних і вірусних інфекцій, але і є важливим ланцюгом в формуванні специфічного захисту – імунної відповіді, оскільки запальні реакції також ініціюються і підсилюються компонентами комплементу. Тобто структурам даної системи мають медіаторні функції, здійснення яких відбувається через специфічні рецептори до комплементу, які локалізовані на поверхні клітин.

Література:

- 20.М. Якобисяк. Імунологія/Переклад з польської за ред.. проф.. В.В. Чоп'як. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
- 21.Кульберг А.Я., Беркун Ю.Б. Сывороточный IgG как ингибитор лектинов:новый подход к изучению функционального воздействия факторов

- естественного и приобретенного иммунитета // Иммунология. - 1998. - №1.- С.7-10.
- 22.Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Эволюция каскада комплемента: ранние этапы// Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4, № 1. С. 11-21.
23. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
- 24.Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и алергология. – М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.: ил.
- 6.Позур В К . Імуногенетика /

VIII Трансплантаційна імуногенетика

Історично перші згадки про органну трансплантацію відносяться до IV - III сторіч до нашої ери, коли в Індії було розроблено хірургічну техніку відтятих носів (кари за крадіжку), що і було описано в Shishruta Samhuta. Приблизно в той же час у Китаї лікар Tsin Yue-Jen зробив першу трансплантацію серця двом солдатам на тлі тогочасної анестезії – знечулення під впливом великої кількості вина. У Європі першими органними трансплантологами вважаються святі близнюки Kosma і Damian, які ще в IV столітті н.е. пересадили в Римі набожному церковнику ногу, але пізніше вони загинули за це мученицькою смертю і саме поняття пересадки органів на кількасот років було заборонено. Впровадження трансплантації органів до сучасної медицини стало можливим завдяки, з одного боку, відкриттю законів тканинної сумісності, з іншого боку - удосконаленням хірургічної техніки. Тепер трансплантація стала необхідним ланцюгом при лікуванні недостатності нирок, печінки і серця. В світовій практиці впроваджується трансплантація сегментів підшлункової залози хворим на цукровий діабет.

Залежно від генетичної відмінності між донором і реципієнтом, розрізняють види трансплантації:

- Аутологічний (аутогенний) – донор і реципієнт є однією і тою ж особою;
- ізогенний (сингенний) між ідентичними особами одного виду (монозиготні близнюки);
- алегенний – між генетично різними особами одного виду;
- ксеногенний – між особами різних видів;

Серед ксеногенних трансплантатів розрізняють трансплантати „сумісні” (конкордатні) - між спорідненими видами , наприклад, серед приматів і „несумісні” (дискордантні), коли донор і реципієнт походять з генетично віддалених видів (наприклад, свиня і макака).

Поширене застосування трансплантації кісткового мозку (ТКМ) та стовбурових клітин периферичної крові (ТСКПК) при лікуванні життєзагрозливих гематологічних, онкологічних, спадкових та імунологічних захворювань є кульмінацією більш ніж чотирьох декад випробувань великої кількості дослідників різних країн світу.

Велика кількість трансплантацій виконуються щорічно у всьому світі. Достатньо сказати, що Європейська асоціація по трансплантації крові та кісткового мозку (ЄВМТ) повідомила про здійснення на протязі 2007 року 19341 трансплантацій, з яких було 6456 алогенних і 12885 аутологічних процедур. Значно поширилась кількість країн, де застосовують трансплантацію кісткового мозку в терапії хворих. Під час організації спільноти „Євротрансплант” ЄВМТ 1973 році, налічувалось лише вісім центрів, які запроваджували цей метод лікування у п'яти країнах. Зараз членами ЄВМТ є 500 трансплантаційних центрів з більш ніж 30 країн, в тому разі і дві українських установи, які виконують ТКМ та ТСКПК.

Перші спроби трансплантувати живі гемопоетичні клітини від одного індивідуума іншому виконувалися на початку 1950 року, незважаючи на значний скептицизм тогочасної наукової громади. І тільки після демонстрації факту, що кістковий мозок може бути трансплантований і що рівень виживаності хворих може бути значним, наступним логічним кроком було призначення трансплантації як терапії вибору. Загальні результати трансплантації кісткового мозку продовжували поліпшуватись із покращанням відбору пацієнтів, розвитком удосконалених методів типування тканин, можливістю застосовувати потужні антимікробні препарати, прогресом методів інтенсивної терапії та профілактики реакції „трансплантат проти хазяїна”. Насьогодні вже окреслені і затверджені основні правила трансплантації, дотримання яких сприяє клінічній ефективності методу, яка в великій мірі залежить від клініко-діагностичного моніторингу в перед- і післятрансплантаційному періоді,

від опцій лікування та прогнозу можливих післятрансплантаційних ускладнень. У цьому аспекті важливим є рівень диференційної діагностики, зокрема визначення цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів пухлинних клонів, серологічних та молекулярних маркерів вірусної інфекції, яка є великою загрозою для імунокомпроментованих осіб – реципієнтів. У світовій асоціації трансплантологів використання сучасних молекулярних біотехнологій є необхідною умовою, яка сприяє підвищенню ефективності даного виду терапії.

ТКМ та ТСКПК сьогодні використовується при цілому переліку захворювань з широкими коливаннями у результатах, відповідно до типу хвороби, її стадії та виду трансплантації. При деяких захворюваннях трансплантація є найбільш ефективним доказаним методом лікування (наприклад, деякі лейкої та важка апластична анемія), в той час як для інших хвороб (наприклад, таласемія) трансплантаційний метод є тільки певним можливим засобом лікування.

Тільки шляхом ретельного вивчення і довгострокового нагляду за пацієнтами може бути підтверджена ефективність (або неефективність) новітніх підходів до терапії.

Яка ж суть стоїть за визначеннями ТКМ та ТСКПК ? Під здійсненою трансплантацією мають на увазі приживлення у певному індивідумі гемопоетичних стовбурових клітин після внутрішньовенної інфузії клітин кісткового мозку, або клітин периферичної крові, які вилучені із організму самого індивідуума (аутологічна трансплантація), або із організму іншого індивідуума (алогенна трансплантація).

Головною метою трансплантації стовбурових кровотворних клітин(СКК) є відновлення гемопоетичної системи. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин призводить до довгострокового

приживлення клітин, що імплантуються, на відміну від гемотрансфузій, позитивні результати якої мають певний час. Сьогодні гемопоетичні стовбурові клітини для клінічного застосування отримують з кісткового мозку, периферичної крові або пуповинної крові (кордової). Вони можуть бути отримані від придатного спорідненого або неспорідненого донора для алогенної трансплантації, чи від самого пацієнта для аутоотрансплантації. При лікуванні онкологічних захворювань ці клітини застосовуються після мієлоаблативної хіміотерапії для досягнення конкретних цілей: подолання обмежуючої гематологічної токсичності курсу протипухлинної хіміотерапії; елімінації пухлинних клітин, що не піддаються впливу звичайних доз цитостатиків при аутоотрансплантації; додаткового забезпечення протипухлинної імунної реакції при алогенної трансплантації.

Стовбурові клітини з кісткового мозку, насамперед для алогенних трансплантацій, одержують під загальним наркозом шляхом багаторазових пункцій. Достатня для трансплантації кількість стовбурових клітин периферичної крові може бути зібрана тільки за допомогою відповідних мобілізаційних заходів із застосуванням хіміотерапії та/або ростових факторів. **Виділяють СКПК з організму донора за допомогою спеціального програмованого лейкоцитозферезу.** Клітини, отримані з периферичної крові в порівнянні з клітинами кісткового мозку мають певну перевагу - вилучення цих клітин у донора- реципієнта не є травматичним, вони сприяють більш швидкому відновленню гемопоезу реципієнта після мієлоаблативної терапії, зменшується ризик повторної контамінації хворого пухлинними клітинами з трансплантату і економічно сама маніпуляція є більш вигідною.

Залежно від генетичної відмінності між донором і реципієнтом розрізняють два види трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин:

Аутологічна – донор і реципієнт є однією особою;

Алогенна – днор і реципієнт є різними особами (спорідненими або неспорідненими).

Оскільки кожна людина за генетичним набором антигенних детермінант визначені ступені генетичної сумісності донора і реципієнта за антигенами головного комплексу гістосумісності:

- Ідентичний близнюк – днор і реципієнт ідентичні не тільки за локусами HLA, але і за усіма іншими генетичними системами крові;

- HLA- сумісний сиблінг – днор і реципієнт сумісні за системою HLA, але є імовірність несумісності за локусами інших генетичних систем крові;

- Донор і реципієнт -частково несумісні, є спорідненими особами або не мають споріднених з'язків.

Оскільки молекули МНС є головним антигеном, який ініціює імунологічну відповідь на трансплантат, вважається, що максимальна сумісність за системою HLA є запорукою найкращих результатів лікування.

Дійсно, це положення підтверджується фактами ефективності трансплантаційної терапії як при органної трансплантації, так і при трансплантації СККК. Оскільки при органної трансплантації більшість пересадок проводиться від кадаверних донорів (трупні органи), то шанс на підбір донора ідентичного за антигенами HLA дуже малий. Тому застосовується стратегія підбору пари з найменшою кількістю несумісних антигенів (*mismatch*), а не підбору донора і реципієнта із найбільшою кількістю сумісних антигенів. При трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, в тому числі і кордової крові, застосовується принцип максимальної сумісності за системою HLA, з урахуванням предсенсibiliзації організму реципієнта до антигенів еритроцитарних систем і до антигенів гістосумісності.

Наводимо стандартний протокол імуногенетичного обстеження донора (реципієнта) для трансплантації СКПК і ТКМ .

ІМУНОГЕНЕТИЧНЕ ЛАБОРАТОРНО- ДІАГНОСТИЧНЕ ОБСТЕЖЕННЯ ПАЦІЄНТА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КІСТКОВОГО МОЗКУ

№	Назва обстеження	Строки проведення обстеження в дотрансплантаційний період
1.	Серологічне типування HLA антигенів II класу (локуси A,B,C)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії.
2.	Серологічне типування HLA антигенів II класу (локуси DR,DQ)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії.
3.	ДНК типування HLA антигенів I класу (локуси A,B,C)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії.
4.	ДНК типування HLA антигенів II класу (локуси DRB1,DQB1,DQA1)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії.
5.	Визначення фенотипу за еритроцитарними системами ABO, Rh-Hr, MN, Ss, Kell, Duffy, Kidd	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії.
6.	Визначення предсенсибілізації до антигенів еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів	Під час первинного обстеження та в період проведення гемотрансфузій

Рисунок 8.1 - Лабораторно-діагностичне обстеження пацієнта для трансплантації кісткового мозку

Як видно з наведеного протоколу обстеження, необхідним є визначення предсенсибілізації до антигенів різних генетичних систем крові. Виникає питання, навіщо так ускладнювати підготовку реципієнта до процедури? Ще в 1973 році роботами Terasaki було проілюстровано, що

попередні гемотрансфузії при органній трансплантації парадоксальним чином виправляли результати трансплантаційного лікування. Навіть проводилась підготовка реципієнта до трансплантації шляхом переливання хворому крові від донора органу. Але на сьогодні, коли є великий вибір імуносупресивних посередників і є небезпека інфікування інфекційними збудниками цей шлях стає все менш популярним. При пересадці гемопоетичних стовбурових клітин крові, навпаки, предсенсібілізація до еритроцитарних і лейкоцитарних антигенів є провокатором розвитку імунологічних реакцій при після трансплантаційної гемотерапії, що впливає на приживлення трансплантата. Цей факт добре проілюстрований на прикладі повторної трансплантації шкіри від одного і того ж донора, коли після другої пересадки трансплантат відторгається швидче. Цей факт спричинив появу в трансплантаційній медицині нового підходу, коли провадять „від сіяння” потенційних реципієнтів, які вже були сенсібілізовані антигенами даного донора. Сама сенсібілізація може відбуватись за рахунок попередній трансплантацій, гемотрансфузій, вагітностей і в результаті лікування гемопрепаратами. З метою виключення наявності специфічних анти- HLA антитіл, безпосередньо перед пересадкою з сироваткою кожного реципієнта проводиться лімфоцитотоксичний тест з лімфоцитами донора і з панеллю лімфоцитів, що містить не менше 20 образців лімфоцитів. Відсоток реактивності сироватки реципієнта з панеллю (panel reactive antibody PRA) є мірою його сенсібілізації антигенами HLA. Реципієнти з PRA вище 50% - в 5 разів довше чекають на відповідного донора ніж десенсібілізовані хворі.

Постає запитання, сумісність за якими локусами МНС людини має найбільше значення для приживлення трансплантата? Дві найбільш потужні бази даних гістотипованих осіб – американська (United Network For Organ Sharing) і європейська (Collaborative Transplant Study), які містять інформацію про 150000 реципієнтів, надали переконливі докази про найкращі результати сумісності за локусами HLA-DR і HLA B. Сумісність за

локусом А має менший вплив на відторгнення трансплантата, а сумісність за локусом С значення не має.

За матеріалами світової спільноти трансплантологів по пересадці трупних нирок встановлено, що сумісність за системою HLA-DR і –В локусів дає 65 -70% шансів на щонайменше десятирічне функціонування трансплантата, період півжиття трансплантата становить приблизно 20 років, в порівнянні для живих HLA –ідентичних донорів трансплантата цей термін складає до 24 років. Присутність одного несумісного антигену у локусі HLA-А; В; -DR зменшує ймовірність десятирічного функціонування трансплантата приблизно до 40 – 50%, а тривалість його життя до 10 -12 років. Якщо існує більша кількість несумісних антигенів, то шанси десятирічного виживання зменшуються до 30 -35%, а тривалість півжиття до 7 -9 років. Аналіз віддалених результатів пересадки нирки свідчить, що несумісність навіть за одним антигеном має відчутний вплив на успіх трансплантації.

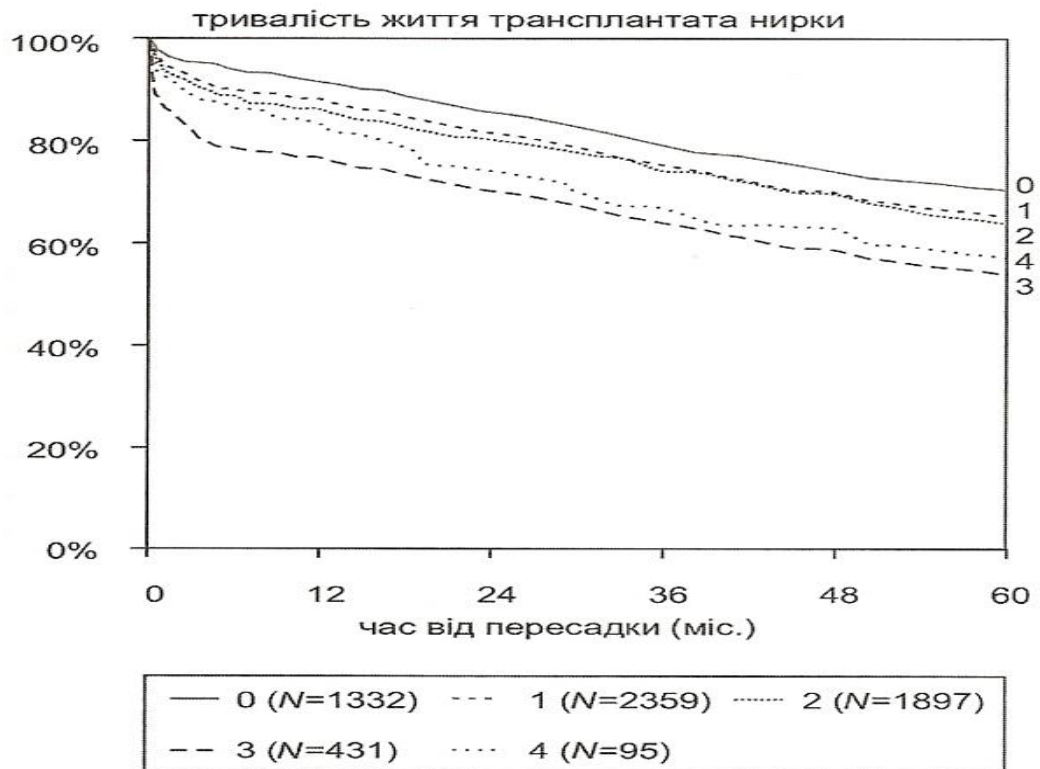


Рисунок 8.2 - Тривалість життя алогенного трансплантата нирки в залежності від впливу кількості несумісних антигенів HLA-DR і-B (дані Євротранспланту).

Ретельний підбір пар донор-реципієнт за системою HLA зменшує частоту гострих відторгнень впродовж першого року після трансплантації, а також зменшує ризик виникнення хронічних ускладнень.

Вважається, що несумісність за певними антигенами особливо негативно впливає на долю трансплантата. Визначено декілька таких (табу) „заборонених” комбінацій антигенних специфічностей. Відомі також комбінації з несумісними антигенами, які практично не впливають на подальшу долю трансплантата, і які називають „допустимими” (permissible mismatch). Пояснення цього явища може бути наступним: молекула МНС людини на своїй поверхні має 4-5 регіонів, які містять певні епітопи, що саме розпізнаються як антигени. Реципієнт з певним **HLA** генотипом може

розпізнавати деяки з них як сильні імуногени (ефект табу), інші – як слабкі імуногени (допустима несумісність).

Пресадка інших органів: серця, печінки, підшлункової залози виконується без підбору реципієнтів за системою **HLA**, дотримується тільки підбору за системою АВО. Але ретроспективний аналіз ефективності органної трансплантації свідчить що ретельний підбор з урахуванням системи гістосумісності збільшує шанси на довго тривалість життя трансплантата.

При органній трансплантації як правило застосовуються серологічні методи гістотипування, які на сьогодні не має високої роздільної здатності. Так, було відмічено, що навіть при ідеальній сумісності за антигенною специфічністю певний відсоток гістосумісних нирок на приживлюється з імунологічних причин за рахунок, так званих, мінорних (слабких) антигенів, які визначаються при аналізі DNA методами.

В той же час при трансплантації кісткового мозку селекція за повним набором алелей HLA-C є абсолютно необхідною і, більш того, має велике значення. Практично така ж сама ситуація має місце і для антигенів класу II. Вище вже було наведено, що для ефективної трансплантації органних трансплантатів абсолютно достатня селекція на рівні визначення антигенів HLA класу II або DRB1-специфічностей, які визначаються при генотипуванні методом низького спектру специфічностей (загальна кількість таких специфічностей не більше 18). Напроти, при селекції донорів кісткового мозку неспорідненого походження є необхідним підбір донора на рівні окремих алельних варіантів генів HLA, загальна кількість яких на сьогодні перевищує 2000 (матеріали 14-й Європейської конференції по гістосумісності, Франція, 2000 р.).

Є достатньо підстав для припущення, що при первинній пересадці органних трансплантатів має місце пряме розпізнавання чужерідних HLA-антигенів класу II, на відміну від трансплантації кісткового мозку, коли має

місце розпізнавання пептидних мотивів алельних варіантів, які, як правило, відбуваються при непрямому варіанті розпізнавання. Дана різниця має принципове значення для прикладної трансплантології. І якщо для ефективного підбора трансплантата кісткового мозку, або ГСКПК необхідно мати базу даних на мільйони HLA-генотипованих донорів, то при органної трансплантації для підбора HLA-гістосумісного донора кількість реципієнтів в листку очікування (в даному випадку один донор скринуються на листку очікування реципієнтів, а не навпаки, як при трансплантації кісткового мозку) може не перевищувати 1000 осіб.

Вище ми вже розглядали, яка ж суть стоїть за визначеннями ТКМ та ТСКПК. Зупинимось більш ретельно на імунологічних принципах алогенної трансплантації ТСКПК оскільки трансплантація КМ виконується все рідше.

Алогенна трансплантація стовбурових гемопоетичних клітин проводиться з метою реконструкції імунної і кровотворної систем при наступних захворюваннях:

- *Гострі і хронічні лейкемії*
- *важкий комбінований імунодефіцит*
- *апластична анемія*
- *вроджені хвороби кісткового мозку*
- *незворотнє ураження кісткового мозку внаслідок застосування*

полі хіміотерапії як лікувального засобу.

За винятком дітей, з вродженими імунодефіцитами, реципієнт кісткового мозку вимагає інтенсивної підготовки для трансплантації з метою знищення його власної кровотворної системи і імунореактивності для створення мікросередовища в яке будуть засілятися донорські частково комітовані і імунокомпетентні клітини, а також для запобігання відторгнення трансплантата.

Підготовка реципієнта полягає у введенні асоціації мієлотоксичних алкілюючих препаратів (циклофосфамід), одночасно з імуносупресивними

середниками або опроміненням всього тіла. У випадку пухлинних захворювань такий підхід проводиться з метою знищення пухлинних клонів, розсіяних в різних тканинах організму.

Кістковий мозок дорослої людини містить материнські клітини гемопоєзу, лімфопоєзу, а також дозрілі Т-лімфоцити. Після відповідного приготування реципієна і саме трансплантації донорських клітин всі елементи імунної системи (реципієнт-донор) повинні знаходитися в рівновазі. Перевага відповіді реципієнта може призвести до відторгнення кісткового мозку, домінування елементів донора – до розвитку хвороби „трансплантат проти господаря” (graft versus host disease – GVHD).

Ймовірність ризику відторгнення трансплантату зростає паралельно з генетичними відмінностями між донором і реципієнтом за HLA системою головного комплексу гістосумісності, оскільки молекули комплексу приймають активну участь в імунологічних реакціях.

Таблиця 8.1 - Участь молекул I и II класів МНС в деяких імунних реакціях

Функциональна активність	Клас I	Клас II
Інтенсивність відторгнення алотрансплантата	++++	++
Індукція утворення антитіл	++++	++++
Стимуляція СКЛ	+	++++
Ініціація РТПГ	++	++++
Презентація антигена для цитотоксичних Т- клітин	++++	-
Презентація антигена для хелперних Т- клітин	-	++++

Процес відторгнення залежить від активності Т-лімфоцитів, а також НК-клітин.

Розрізняють гостру і хронічну хвороби GVHD. Гостра виникає впродовж 100 днів після пересадки трансплантата і з'являється у половини пацієнтів. Фактори ризику виникнення захворювання представлені у таблиці.

Таблиця 8.2 - Чинники ризику виникнення хвороби „Трансплантат проти господаря”.

Гостра хвороба GVH	Хронічна хвороба GVH
Велика кількість Т-лімфоцитів кісткового мозку	
Несумісність HLA	Несумісність HLA
Трансплантація від жінки чоловікові	Трансплантація від жінки чоловікові
Похилий вік донора і реципієнта	Похилий вік донора і реципієнта
Попередні вагітності у донора	
Трансплантація без застосування імуносупресії	Перенесена після пересадки гостра хвороба GVH (більше двох разів)
Інфікуванням вірусом герпесу в анамнезі	Переливання лейкоцитів донора.
Застосування високих доз опромінення	

Основу хвороби складають імунологічні механізми: алореактивні Т-лімфоцити, що походять з пересадженого КМ, або СГКПК, інфільтрують в тканини господаря, проявляючи безпосередньо цитотоксичний ефект.

На ендотеліальних клітинах у задіяних органах з'являються молекули HLA II і адгезивні молекули. У ендотелії ідентифікуються головні

лімфоцити з рецептором $TCR\alpha\beta$ і фенотипом $CD3^+CD45RO^+$, але в патогенезі також відіграють роль $CD4^+ CD8^+$. Ймовірно важливим для виникнення хвороби є посилене виділення цитокінів у тканинах активованими лімфоцитами. Визначається значний ріст концентрації в плазмі $INF-\gamma$, $GM-CSF$, TNF , $IL-1,- 4,- 6$ (так звана цитокінова буря), причому частина з продукованих цитокінів виділяється активованими лімфоцитами донора (клітини NK). Подразником, що стимулює продукцію цитокінів є також ураження тканин в процесі підготовки до трансплантації, а також можливе після трансплантації інфікування. Про безпосередню роль цитокінів у патогенезі GVHD свідчать результати їх лікування специфічними антагоністами, оскільки ефективною профілактикою GVHD є застосування антитіл, що блокують $TNF-\alpha$.

Віддалені симптоми пересадки стовбурових гемопоетичних клітин

НЕ дивлячись на відновлення роботи кровотворної системи у після трансплантаційному періоді певний час спостерігаються розлади в імунізації. Часто розвивається стан набутого імунodefіциту, що проявляється у недостатньому імунному реагуванні на неоантигени і в інфекційних ускладненнях. Механізми цих розладів остаточно не виявлені, але те що виникають певні труднощі в „навчанні” підсажених імунікомпетентних клітин (Т-лімфоцитів) в новому середовищі є безперечним. Відома також явище активації специфічних і неспецифічних суп ресорних лімфоцитів. Хронічна хвороба „Трансплантат проти господаря” виникає у 20 – 30% хворих, після трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, головним чинником у виникненні якої є перенесена GVH. Хронічна хвороба спричиняє гематологічні розлади і рецидивуючий імунodefіцит.

Реакція „трансплантат проти лейкої” – означає реакцію клітин донора на антигени, що знаходяться на клітинах новоутвору. Важають, що існує незалежно від GVH складова реакції GV L, за яку можуть відповідати

НК-клітини.

Індукція трансплантаційної толерантності.

В експерименті можна достатньо легко викликати стан толерантності до алоантигенів. У клінічній практиці це явище, коли у реципієнтів після трансплантації, на тлі припинення застосування імунодепресанів, не відбувається відторгнення трансплантата спостерігається нечасто.

Визначені наступні механізми можливої толерантності на алоантиген:

1. ***Клональна анергія*** – контакт γ -лімфоциту з клітиною, що має антиген, котрий розпізнається його рецептором, але позбавленою молекул, які дають другий сигнал активації, що спричиняє стан, названий анергією. Клональна анергія може бути основою толерантності на трансплантат, пов'язаної з поняттям мікрохимеризм, коли спостерігаються у реципієнта імунокомпетентні клітини особистої специфічності і специфічності донора.
2. ***Клональна делеція*** – у ході розвитку імунної системи ауто реактивні Т-лімфоцити елімінують з тимусу. Існують передумови стверджувати, що клональна делеція відбувається в інших тканинах поза тимусом і може спричиняти толерантність на антигени донора.
3. ***Перевага активації Т-лімфоцитів хелперів 2*** – це явище було виявлено в експериментальних дослідженнях. Цитокіни, що виділяються лімфоцитами *Th2*, гальмують проліферацію і активацію цитотоксичних лімфоцитів шляхом безпосередньої дії на клітини.
4. ***Супресія.*** У носіїв трансплантованих органів описано виникнення специфічних в неспецифічних суп ресорних лімфоцитів. Гальмуючий вплив на галогенний трансплантат можуть викликати антитіла, які зв'язують алоантигени на поверхні клітини, не активуючи комплементу.

5. *„Імунне привілеювання.* Єдиними місцями в нашому організмі, де галогенні і ксеногенні трансплантати не піддаються відторгненню, або, принаймі час їх життя є подовженим, називають привілейовані імунні місця. До них відносяться: передня камера ока, печінка, яєчко, мозок, хрящ, щитовидна залоза, наднирники і плацента.

Насьогодні імунні механізми, що зумовлюють дефіцит імунних реакцій на трансплантат детально не вивчені. Як клінічний протокол трансплантації, що індукує толерантність пропонується пересадка органа з одночасним введенням до стовбурових клітин кісткового мозку реципієна генів, що кодують алоантигени донора.

Успіхи в дослідженні функціональної активності HLA –системи в останні роки пов’язані з відкриттям у 1996-1997 роках кілер-імуноглобулінподібних рецепторів (Killer-ctll Smmunoglobulin-like receptors – KIR) на натуральних кілерах (NK). Головна характеристика клітинної популяції NK клітин полягає в тому, що вони проявляють свою кілерну функцію по відношенню до пухлинних клітин, вірусів і алогенної тканини, без попередньої її сенсibiliзації.

Структура, генетична позиція.

Лейкоцитарний рецепторний комплекс, якій вміщує **KIR** –гени, розміщений на 19 хромосомі людини і займає регіон в 150000 пар нуклеотидів. Система є поліморфною, оскільки кожний з **KIR** генів існує у формі декількох алелей. Побудова **KIR** знайшла своє відображення в номенклатурі, тому що антигени, подібно до системи HLA мають екстрацелюлярну частину (домени), які розміщені на поверхні клітин і невеликої трансмембранної ділянки і інтрацелюлярного(цитоплазматичного) ланцюга амінокислотних залишків, які розміщені всередині клітини (рис.).

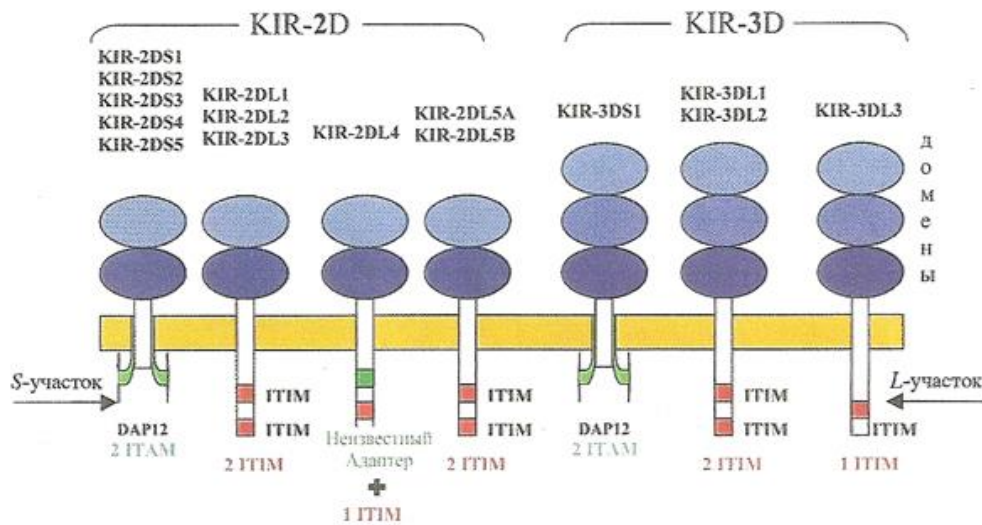


Рисунок 8.3 - Побудова KIR-рецепторів (Kirk A.D., 2008).

Кількість доменів, які являють собою імуноглобулінові регіони може бути 2 або 3 ((KIR2D; KIR3D) інтрацелюлярна ділянка може бути довгою (L), або короткою (S). Довгий цитоплазматичний регіон вміщує одну або дві інгібуючих ділянки (Immune Tyrosine- based Inhibitory Motifs - ITIM), які генерують блокуючий сигнал. Короткий цитоплазматичний регіон за участю сигнальної молекули DAP12 генерує активуючий сигнал (Immune Tyrosine- based Activating Motifs - ITAM). Позначення генів складається з 4 груп знаків: в першій позиції розміщується назва гена, далі кількість доменів, в третій позиції – „довжина цитоплазматичної ділянки” і наприкінці арабська цифра позначає порядковий номер гена. Наприклад KIR2DL1. На рис представлено склад KIR-системи з відомими на сьогодні генами і кількістю алелей.

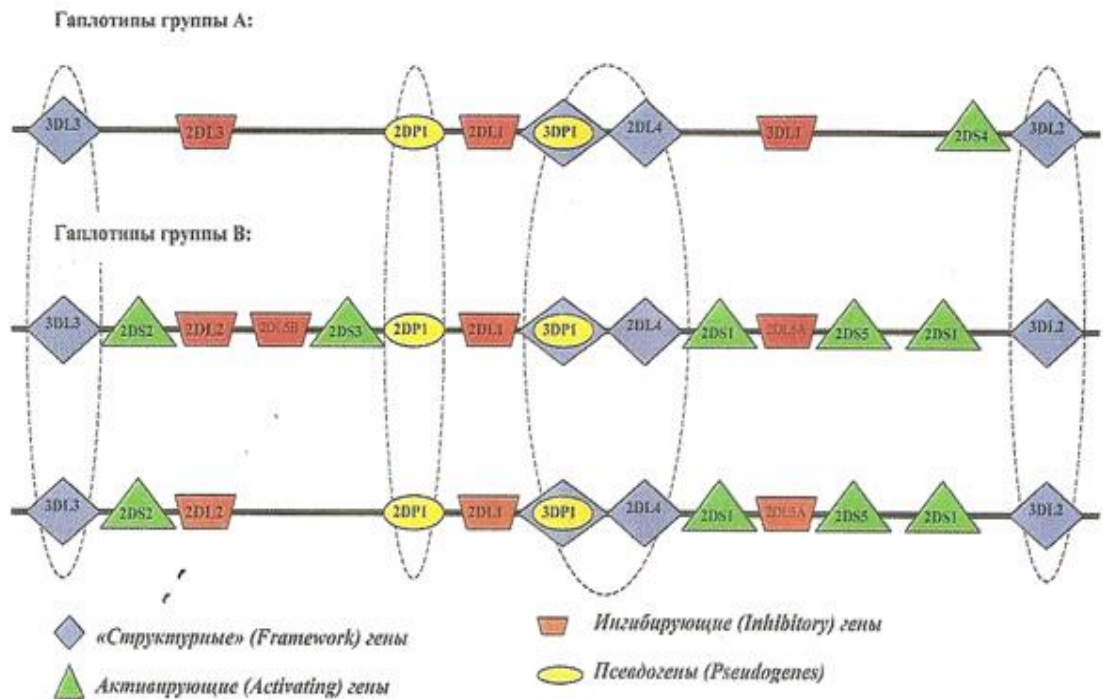


Рисунок 8.4 - KIR-гаплотипы групи А і В.

Найбільш поліморфними є гени KIR-DL, які існують в декількох десятків алелей: KIR2DL1 – 42; 3DL3 – 35; 2DL4 – 22; 3DL2 - 17 алелей. Інші KIR- гени існують у формі від 3 до 9 алелей. Гени DL вважаються інгібуючими, гени DS – активуючими. Білки KIR мають довжину від 306 до 456 амінокислотних залишків. На довжину білка впливає кількість імуноглобуліноподібних регіонів і довжина цитоплазматичного регіону. Домени в білках KIR, як 2D так і 3D складаються з 24 амінокислотних залишків. „стовбура частина”, на якій розміщені домени складається з 24 амінокислотних залишків. Трансмембранний фрагмент більшості KIR, за виключенням KIR2DL1 і KIR2DL2, у яких він є коротшим за рахунок відсутності (делеції) трьох пар нуклеотидів в 7-у екзоні, складається з 20 амінокислотних залишків; цитоплазматична частина вміщує від 23 до 96 амінокислотних залишків.

Гени мають гаплотипи двох варіантів: - А і В, які мають загальні риси, а також відмінності у вміщенні L і S генів. З центромірного кінця кожний

гаплотип обмежений генами 3DL3, а з тіло мірного - 3DL2. Це є „структурні” гени. Вони „обмежують” весь регіон розміром 100000 пар нуклеотидів. Таку структурну функцію виконує псевдоген 3DP1 і 2DL4, які розміщені в центрі регіону. „Структурні” (framework) присутні в усіх гаплотипах. Два регіони між структурними генами заповнені функціональними генами- активуючими і інгібуючими. Відмінність гаплотипів групи А від гаплотипів групи В полягає в кількості функціональних генів. Гаплотип А побудован з 1 активуючого гену 2DS4 і різних комбінацій 4 інгібуючих - 2DL1, 2DL3, 3DL1, 3DL2. Гаплотипи В, навпаки, вміщують більше активуючих генів 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 3DS1 – і можуть вміщувати інгібуючі гени, які не представлені на гаплотипах групи А, наприклад - 2DL2. Насьогодні відомо 20 варіантів гаплотипів В.

Зв'язок з HLA-антигенами 1 класу.

Білки KIR в естрацелюлярному регіоні мають імуноглобуліноподібні структури (домени) завдяки яким можуть зв'язуватись з антигенами, в тому числі і з антигенами 1 класу. HLA антиген є лігандом для KIR, а як слідство цього і NK клітини проявляють свою функціональну активність.

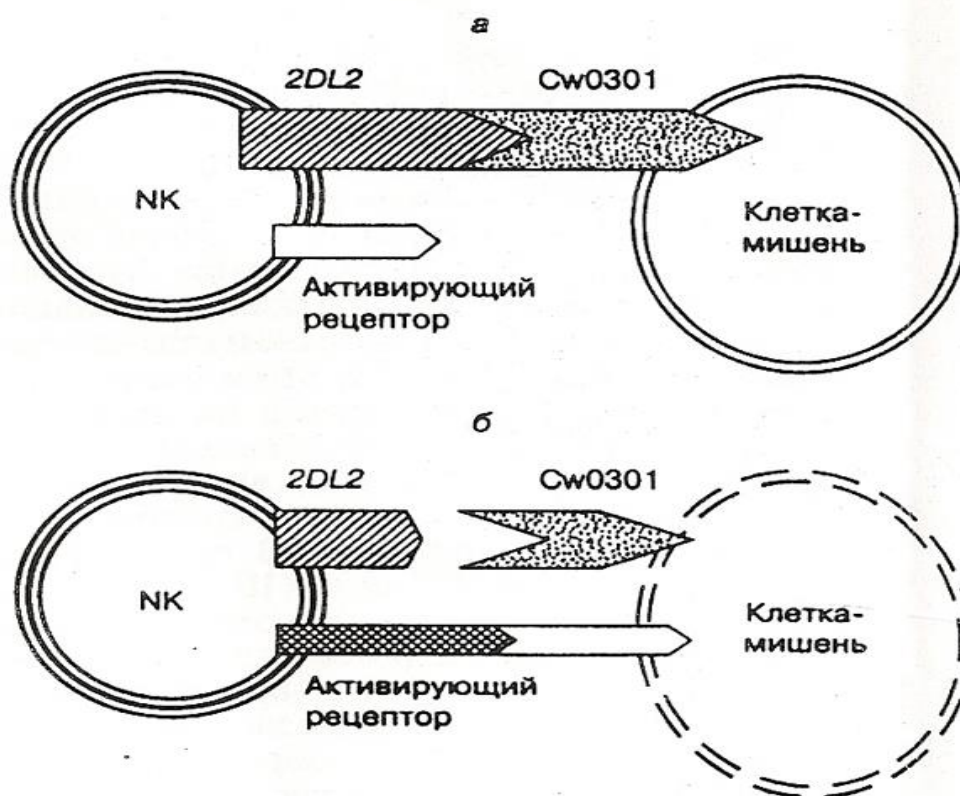


Рисунок 8.5 - Механізми лігандування і алореактивності НК.

А. немає кіперного ефекту, тому що блокується активність НК шляхом взаємодії 2DL2 з HLA-Cw0301. *В.* НК ефект э, цитотоксична активність не заблокована, тому що KIR2DL1 не має спорідненості до HLA-Cw0301.

Роль KIR в прогнозуванні ефективності трансплантації.

Імунореактивність НК, яка залежить від механізму взаємодії KIR+ HLA-ліганд, по-різному визначає вектор дії НК на основні мишені.

Якщо в результаті інгібіції НК-активності відбувається прогресія пухлинного процесу і вірусної інфекції, тоді для будь-якого трансплантату інгібіція НК- є позитивним фактором, тому що знижує ризик відторгнення. Мабуть причина неоднозначності такого впливу KIR на заключний етап

трансплантації слід шукати у протирічному проявленні одного і того ж механізму.

Визначають наступні види KIR несумісності:

1. Несумісність між донором і реципієнтом за KIR при повної сумісності за системою HLA.

2. Несумісність між донором і реципієнтом за KIR+ HLA ліганд, яка потенційно передбачає алореактивність NK.

3. Несумісність між KIR і HLA лігандом в межах одного організму.

Тобто, поведінка NK проти мішеней при можливості або неможливості утворення зв'язки KIR+ HLA ліганд.

Несумісність між донором і реципієнтом за KIR генами.

Дослідження, які проводили в 2003 -2005 роках в кількох французьких трансплантаційних центрах у хворих на гостру мієлоїдну лейкемію і хворих на гостру лімфобластну лейкемію в умовах трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин від HLA ідентичних донорів, були проаналізовані KIR фенотипи 174 пар донор-реципієнт. Визначені невідповідності в наявності у них активуючих KIR генів призводило до підвищення частоти реакції „трансплантат проти господаря”, а розходження за інгібуючими KIR генами призводило до зниження загальної виживаності. Автори зробили висновок, що несумісність між донором і реципієнтом за будь-якими KIR генами (як активуючими так і інгібуючими) погіршує вихід трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин у хворих на гострі лейкемії. Дослідження турецьких авторів підтвердило дані висновки на основі трансплантації від HLA ідентичних сиблінгів при урахуванні сумісності за системою KIR.

Розходження за KIR-генами між донором і реципієнтом можуть вливати дві ситуації:

- коли KIR- репертуар реципієнта є „включеним” в репертуар донора, тобто у донора більша кількість KIR- генів ніж у реципієнта; при цьому активність імунної системи

- реципієнта направлена у бік розвитку відторгнення.
- коли KIR- репертуар донора є „включеним” в KIR репертуар реципієнта; при цьому варіанті активність імунної системи направлена на розвиток РТПГ.

Роботи голандських авторів показала, що в більшості випадків проявлялась хронічна форма РТПГ. ***Несумісність між донором і реципієнтом за комплексом KIR+ HLA ліганд.***

Антигени локусу **HLA Cw** досить довго вважалися незначними в реакції відторгнення при несумісності між донором і реципієнтом. Насьогодні встановлено, що несумісність за специфічностями даного локусу погіршує виживаність трансплантата. Одним з механізмів даного ефекту вважається алореактивність НК, опосередковану через зв'язування KIR+ HLA C ліганд, що склало підґрунтя для розгляду цього комплексу в цілому.

Методи ідентифікації KIR-рецепторів. Для визначення KIR-фенотипу дослідженого ДНК застосовують полімеразну ланцюгову реакцію з сиквесспецифічними праймерами. Суть даного метода полягає в визначенні специфічних ділянок ДНК, які є відповідними до алелей KIR локуса на хромосомі 19, в регіоні, який кодує лейкоцитарний рецепторний комплекс.

Таким чином, з кожним роком спектр трансплантаційних антигенів збільшується. З одного боку, це сприяє більш ретельному підбору пар донор-реципієнт. З іншого боку – визначає нові механізми імунологічного реагування на алотрансплантат, що в свою чергу, відкриває нові напрямки наукових досліджень в аспекті подолання імунологічної несумісності при алотрансплантації. В цьому аспекті є важливим подальший розвиток вивчення імуногенетичних механізмів трасплантаційної індукції і толерантності, можливість модифікації клітин донора методами генної інженерії, що сприяє надії про перспективність даного наукового і практичного напрямку, оскільки

са́ме трансплантаційна терапія часто є єдиним шансом на життя людини.

HLA-система і репродуктивна функція людини.

Гени головного комплексу гістосумісності виконують значну роль в репродукції людини і тварин. На початковому етапі ця роль не проявляється у відношенні людини, однак досить відома у тварин. Так, миші, щури та інші тварини розпізнають своїх сексуальних партнерів з числа сородичів і здійснюють диференціювання між ними за допомогою молекул HLA. Подібне диференціювання здійснюється за допомогою одорантів – специфічних речовин, які вибірково переносять в сечу тварин антигенами HLA I класу. Ця функція системи HLA забезпечує зменшення інбридингу (спосіб розмноження тварин шляхом постійного парування братів і сестер, при якому досягається генетична ідентичність тварин) популяції тварин, оскільки наявність аналогічних особистим антигенам HLA класу I є табу для сексуального контакту між тваринами. Нюхова здатність людини як виду значною мірою поступається тваринній, тому в популяції людей цей механізм дуже послаблений або повністю відсутній, що сприяє зростанню проявів інбридингу особливо в ізольованих популяціях. Подібне явище має місце в етнічних, або в кастових групах. Наприклад, в королівських сім'ях, де протягом декількох поколінь укладались близько родинні шлюби, з'являлись гомозиготні нащадки за генами, пов'язаними із спадковими вадами розвитку, що призводило до зростання кількості спадкових захворювань та вроджених вад.

На сьогодні, близько родинні шлюби заборонені церквою та державою. Однак, оскільки нюх людини недостатньо ефективний в оцінці HLA-сумісності з потенційним партнером по шлюбу, в деяких випадках шлюби

вкладаються між жінкою і чоловіком частково або повністю HLA-ідентичними. Теоретична вірогідність такого співпадіння дорівнює 1 на 1000 000, однак на практиці подібні випадки трапляються значно частіше. Однією з причин такого явища є те, що навіть велика популяція має значну кількість людей, в генотипі яких окремі гени HLA чи їх групи знаходяться в гомозиготному стані. Таким чином, достатньо, щоб в HLA-генотипі гетерозиготного партнера був присутній один з HLA-антигенів, які знаходяться у гомозиготному стані у другого партнера. Виходячі із законів спадковості (HLA-система успадковується за кодомінантним принципом) HLA-антигенів, одна половина HLA-набору дитини спадкується від батька, а друга – від матері; результатом є ідентичність матері і плоду за антигенами, які присутні у генотипі матері в гомозиготному стані. Функціональна активність система HLA спрямована на елімінацію гомозиготних нащадків, і хоча медичні заходи у деяких випадках можуть „долати противодію”, зазвичай HLA-гомозиготні індивіди мають підвищений ризик розвитку патологічного процесу.

В еволюції репродуктивної системи – від відкладання яєць до живородіння – основною проблемою завжди було запобігання імунного відторгнення ембріона організмом матері. Одним з рішень цієї проблеми є формування плаценти – анатомічного та імунологічного бар'єру між організмом матері і ембріона.

З материнськими тканинами межує шар плаценти – це клітини трофобласта з унікальними імунними властивостями, зокрема, властивістю пригнічувати утворення цитотоксичних Т-лімфоцитів, що перешкоджає відторгненню. Інвазивний ріст трофобласта забезпечує формування та розвиток плаценти, що сприяє імунологічному захисту ембріону в організмі матері.

Плід - це специфічний приклад алогенного трансплантату, який успадковує половину батьківського батьківського антигенного набору. Існує багато адаптаційних механізмів, які є причиною „виживання” плоду в умовах фізіологічної вігінності. До них належать:

1. В середовищі матки проходять значно ослаблені імунні реакції.
2. Розділення ембріонального-материнського кровообігу, при незначному (у фізіологічних умовах) проникненні клітин в обох напрямках.
3. Специфічна будова трофобласту з некласичними антигенами гістосумісності (із слабковираженою спроможністю презентації антигену) і факторами, які зумовлюють протидію трофобласту на дію цитотоксичних антитіл і комплексів антиген-антитіло разом з комплементом.
4. Імунна відповідь матки, яка призводить до виділення захисних щодо плоду факторів.
5. Переведення до- і післяімплантаційних супресорних клітин в ендометрій.

Специфічну антигенну будову тканин трофобласту представлено в таблиці__.

Таблиця 8.3 - Експресія антигенів тканинної сумісності і білків, які захищають трофобласт людини від імунної відповіді

Антиген	Позахоріонічний цитотрофобласт	Синцитіотрофобласт	Цитотрофобласт
HLA, клас I			
HLA-A, -B	—	—	—
HLA-G	++	—	—
HLA, клас II			

HLA-DR, DQ, DP	—	—	—
Білки, які модулюють систему компліменту			
MCP (CD46)	++	++	—
DAF (CD55)	++	++	+
Протектин (CD59)	+	+	+

Як видно з наведеної таблиці, на тканинах трофобласту не експресуються білки, необхідні для презентації антигену, тобто класичні молекули МНС першого та другого класу. На позахоріонічному трофобласті підлягають експресії некласичні молекули МНС I класу, HLA-G з обмеженим поліморфізмом і як наслідок, з обмеженою можливістю презентації антигену. Відомо, що молекули HLA-G блокують дію NK-клітин (NK-клітини не діють на клітини, які мають на своїй поверхні Молекули МНС I класу). Тому HLA-G може бути лігандом, який ліквідує цитотоксичний ефект NK-клітин. Крім цих елементів, без сумніву, привертає увагу комплекс захисних від дії системи комплементу білків. **Білок MCP прискорює інактивацію фактора C3b, а фактор DAF запобігає формуванню конвертаз C3 і прискорює їх розпад; к свою чергу CD59 гальмує утворення комплексу, який атакує оболонку, і його проникнення в клітину оболонку.**

Стосовно ролі HLA в репродукції, слід зазначити, що несприятливі наслідки навіть часткової HLA-сумісності проявляються на різних термінах вагітності. Однією з акушерських патологій, де доведена несприятлива роль HLA-сумісності матері і плоду, є імунозалежний спонтанний викидень. Для цієї патології характерні багато чисельні викидні у жінок, всебічне обстеження яких не дозволяє виявити будь-яких клінічних підстав для

викидня. Слід зазначити, що більшість з цих жінок мали нормальну вагітність у шлюбах з іншими партнерами.

Одна з гіпотез виникнення спонтанного викидня предбачає існування „блокуючих антитіл”, які розпізнають ембріональні поверхневі антигени, успадковані від батька. Ці антитіла мають обмежену здатність зв'язувати комплемент і огортають поверхню трофобласта, не пошкоджуючи, а навпаки, захищаючи його від атаки реактивних лімфоцитів, направлених проти антигенів батьківського походження. Присутність в сироватці, так званих, „блокуючих антитіл” запобігає розвитку реакції змішаної культури лімфоцитів (mixed lymphocyte culture – MLC), ініційованої лімфоцитами батьківського походження. Вважається, що відсутність блокуючого фактора може виникнути внаслідок присутності спільних антигенів HLA у батьків. Через часткову або повну HLA-ідентичність батьків не відбувається індукція захисної реакції матері від плоду, тобто модуляція власної (потенційно шкідливої) імунної відповіді на алотрансплантат, яким у певному значенні є плід. Багаточисельні повідомлення свідчать про тенденцію до існування спільних алелів у подружніх пар, в яких жінки мають спонтанні викидні. Фактором ризику для спонтанних викиднів є одночасне існування спільних алелів у регіонах першого та другого класу системи HLA, в межах даної пари. **Існують також данні, які свідчать, що у випадку повторення викиднів потрібно шукати зміни не стільки в межах самої системи MHC, скільки в генах, зчеплених з MHC.**

Отже, трофобласт не може мати експресії антигенів HLA, хоча інші дослідження вказують на роль так званого комплексу TLX – відповідник системи тканинної сумісності для трофобласта. Згідно з цією теорією, якщо мати і батько мають однаковий набір антигенів TLX, тоді ембріон не вичляє достатньої імуногенності для індукції захисної імунної відповіді організму матері. В обох концепціях принципом профілактики спонтанних

викиднів є стимуляція захисних факторів у сироватці крові матері, котрі блокують реактивність материнських лімфоцитів, скерованих проти алотрансплантата.

Іншою акушерською патологією, при якій проявляється роль антигенів HLA в репродукції, є так звана переношена вагітність.

В дослідження було встановлено, що в організмі жінки з переношеною вагітністю на відміну від жінок з фізіологічним перебігом вагітності повністю відсутні цитотоксичні Т-лімфоцити, активність яких була б спрямована проти клітин чоловіка. При цьому у значному відсотку випадків була встановлена ідентичність між подружжям за антигенами HLA. Таким чином, сумісність партнерів, яка в ряді випадків призводила до HLA-сумісності між матір'ю і плодом, не дозволяла активуватися Т-ефекторам, які приймають активну участь в процесі фізіологічних пологів.

Таким чином, система HLA у людини, утративши функцію вибору сексуального партнера, „намагається” захистити її від появи HLA-гомозигот, оскільки, саме високий ступінь HLA-поліморфізму є необхідною умовою для виконання в повній мірі імунорегуляторних функцій системою HLA.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть ступені генетичної сумісності донора і реципієнта за антигенами головного комплексу гістосумісності.
2. Які існують види KIR несумісності.
3. Охарактеризуйте механізми можливої толерантності на алоантиген.
4. З якою метою проводиться алогенна трансплантація стовбурових гемопоетичних клітин .
- 5 Охарактеризуйте участь молекул I и II класів MHC в імунних реакціях при галогенній трансплантації.

Література:

25. М. Якобисяк. Імунологія/Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
26. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
27. Клиническая иммунология и аллергология Г. Лолор-младший, Т. Фишер, Д. Адельман (ред.) Перевод с английского: М. В. Пашенков, Н. Б. Гамалея. Редакторы перевода: к. м. н. Е. Н. Образцова, В. М. Нечушкина, Москва, «Практика», 2000, 452с.
28. Abu-Elmagd KM, Costa G, Bond GJ, Wu T, Murase N, Zeevi A, Simmons R, Soltys K, Sindhi R, Stein W, Demetris A, Mazariegos G. Evolution of the immunosuppressive strategies for the intestinal and multivisceral recipients with special reference to allograft immunity and achievement of partial tolerance.// *Transpl Int.* – 2008. – V.24, N. 10.
29. Turgeon NA, Kirk AD, Iwakoshi NN. Differential effects of donor-specific alloantibody.// *Transplant Rev (Orlando).* – 2008. - V.23, N.10.
30. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, Passweg J, Roosnek E. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans.// *Semin Immunopathol.* – 2008. – V. 24, N.10.
31. Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG. Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance.// *Transplantation.* – 2008. – V.86, N.7. – P.889-894.

ІХ Генетичні системи крові і можливі імуногенетичні механізми асоціації з захворюваннями.

Виключно всі імуногенетичні системи крові являють собою біологічні маркери. Невдовзі після відкриття поліморфізму еритроцитів на рівні генетичної системи АВО були проведені дослідження в аспекті можливості асоціативного зв'язку з конкретними захворюваннями. Перші спроби не дали вагомих результатів, але деякі асоціації були встановлені. Наприклад між групою крові О і виразкою дванадцятипалої кишки, а також між раком шлунку і групою крові А. Окрім того були встановлені багато чисельні випадки зчеплення генетичних факторів, зокрема виявили, що ген еліптоцитозу є зчепленим з локусом резус-фактора, а деякі інші гени, які визначають спадкові захворювання, пов'язані з Х-хромосомою (локус Хg). Дослідження останніх років в даному напрямку на основі сучасних біотехнологій дозволили не тільки виявити певні асоціативні зв'язки антигенів системи АВО з захворюваннями, але і визначити можливі механізми такої асоціації. Група крові А/В, або пов'язані з нею антигени Н, Lewis, Іі, більш інтенсивно експресуються на ендотеліальних епітеліальних клітинах (ротова порожнина, пищевод, шлунок, тонкий і товстий кишковик, бронхопульмональна і уrogenітална системи), де значно частіше виникають пухлини у людини. Вважається, що зміни в групі крові на рівні попередника, при зв'язуванні з антигенами визначають основні, пов'язані з пухлиною зміни гліколізування і багато з них призводять до змін туморасоційованих карбогидратних антигенів. Делеція або редукція А і В епітопів при пухлинах у людини є предметом багаторічних досліджень. Суттєвим внеском в даний напрямок наукових розробок була серія досліджень при ракових пухлинах шлунку. Пізніше було встановлено, що делеція А і В антигенів корелювала зі ступенем малігнізації і метастатичного потенціалу пухлин шлунково-кишкового тракту, легенів, карциноми роту. Дослідження делеції/редукції А

антигену при первинній карциномі легенів у пацієнтів з групами крові А або АВ показали, що у А⁻ пацієнтів виживанність менш, ніж у А⁺. Однак, делеція В антигену не корелює так чітко як антиген А з виживанністю пацієнту. Тобто, при первинній карциномі легенів делеція А і В високо корелювала з виживанністю пацієнта. За механізмом даного процесу встановлено, що саме делеція А і В антигенів викликає посилення малігнізації пухлин людини.

За механізмом супресії -експресії експресії А/В в пухлинах встановлено, що експресія vs. делеції А/В антигенів чітко корелює з активністю А і В трансферазами, але без гідролісної активності. Відмінності в промоуторної активності відображають відмінності в АВО гені: посилення активності 43 bp тандемного повторення одиниці розміщеної між -3899 і -3618 помітно знижена в А⁻ в порівнянні з А⁺ клітинами. Крім того, в А⁻ в порівнянні з А⁺ клітинами показан більш високий рівень метилування ДНК в регіоні промоутера, а метильована ДНК може впливати на (інгібувати) транскрипцію А гену разом з іншими факторами. Саме які фактори транскрипції залучені в супресію: А або В – залишається нез'ясованим. Таким, чином вже на рівні дослідження поліморфізму еритроцитарних систем крові отримані перспективні дані відносно асоціативного зв'язку з захворюванням і відносно механізмів цього асоціативного зв'язку.

Можливості визначення генетичних ознак сприйнятливості до конкретних патологічних станів значно підвищились з відкриттям головного комплексу гістосумісності, генів “іmunної відповіді”, визначенню ролі системи HLA в генетичному контролі іmunореактивності організму людини, розшифровці механізмів взаємодії маркерів HLA з імунокомпетентними клітинами, механізмів тканинної сумісності.

Поліморфізм системи HLA сприяв вивченню даної системи з позицій своєрідного механізму захисту від чужерідних агентів в організмі, в тому числі мікробного і вірусного походження. От чому з появою типових

сироваток почався інтенсивний пошук взаємозв'язків між антигенами HLA і хворобами. В зв'язку з чим були сформувані гіпотези, які пояснюють механізми можливої асоціації системи HLA з хворобами, зв'язок генів HLA з іншими генами в реалізації такого асоціативного зв'язку.

Рецепторна теорія. Згідно цієї теорії, антигени можуть бути своєрідними рецепторами для патогенних вірусів, до яких вони можуть прикріплюватися і пошкоджувати клітину. Моделлю для перевірки цієї гіпотези послужив вплив вірусу на нормальні фібробласти і соматичні гібридні клітини. Відомо, що під час соматичної гібридизації клітин людини-миша відбувається поступова втрата хромосомних клітин людини, частково хромосоми С6, на якій розміщені гени HLA. Початкові фібропласти людини чутливі до полівірусу П, Коксаки В3 і вірусу Ехо, а клітини миші резистентні до них. Після схрещування клітин реплікація вірусу мала місце як до втрати антигенів HLA, так і після неї. Ще одним фактом, який протирічить рецепторній теорії є те, що деякі віруси, наприклад віруси корі, можуть викликати захворювання у будь якої людини. Більшість дослідників вказують на те, що в якості таких рецепторів виступають молекули антигенів Ікласу. А. Svejgaard L.Ryder пропонували один із можливих механізмів зв'язку між антигенами HLA і ендокринними захворюваннями, виходячи з гіпотези за якою деякі молекули антигенів на поверхні клітин, або в розчинному стані мають структурну схожість з рецепторами для певних лігандів, наприклад, гормонів і виконувати конкуруючу роль в процесі нормальної взаємодії гормон – рецептор. Незважаючи на те, що афінитет між лігандами і рецепторами більше виражений ніж між лігандами і молекулами HLA, велика кількість лігандів зв'язується саме з HLA антигенами, тому ще останні присутні на всіх клітинах, а специфічні рецептори лише на клітинах-мішенях. Таким чином, захворювання може розвинутися в результаті патологічного зв'язування гормонів з HLA антигенами

Теорія молекулярної мімікрії. Мікроорганізми в процесі еволюції набувають в структурі своїх оболонок детермінанти, які призводять до зниження імунологічної відповіді макроорганізму на вплив мікробу або вірусу. В результаті останні можуть безперешкодно проникати всередину організму і викликати патогенну дію. Здатність збудника хвороби маскуватися під антигени макроорганізму отримала назву антигенної, або молекулярної, мімікрії. З метою встановлення перехресно реагуючих антигенів були вивчені різні види мікробів. Спеціальними тонкими серологічними методами вдалося встановити, що деякі мікроби, наприклад клебсієли, понижують титр специфічної активності сироваток проти антигену HLA-B27, що надалі найбільш вірогідно пояснило формування захворювань, асоційованих саме з цим антигеном. В дослідженнях групи вчених доказано, що культуральні фільтри *Klebsiella* вміщують фактори, які здібні специфічно модифікувати HLA-B27 позитивні лімфоцити здорових осіб, що призводить до формування фенотипу, який притаманний хворим особам, хворим на анкілозуючий спондиліт. Вірогідно, що антиген B27 у здорових осіб за структурою має відмінності у осіб з захворюванням. Змінени таким чином молекули антигенів вже не можуть виконувати транспортні функції, і, можливо, комплекс HLAмолекула+бактеріальний антиген активує цитотоксичні Т-клітини, які мають тропність до кістково-п'єднувальній тканини. Асоціативний зв'язок спостерігається не тільки з антигеном специфічності HLA-B27, але і з іншими перехресно реагуючими антигенами (B7; B22; DB27; Bw41; Bw42). Можливо молекули всієї перехресно реагуючої групи мають загальну детермінанту, яка приймає участь саме в якості рецепторів при захворюваннях.

Якщо дотримуватися теорії мімікрії, то можна говорити про домінуючий характер наслідування генів, які відповідають за сприйняття до хвороб. Сімейні дослідження підтвердили дане припущення.

Модифікація антигенів HLA вірусами. Допускають, що в певних умовах вірус здатен модифікувати, тобто змінювати, антигени HLA. В результаті підвищується чутливість клітини до токсину чи непластичних змін. Внаслідок модифікації антигенної структури HLA можуть підлягати дії імунокомпетентних клітин хазяїна, тобто не розпізнавати їх як свої власні, що спостерігається при включенні вірусного геному на рівні HLA або його дії на РНК. Це явище може мати місце лише при вибірковій локалізації вірусу в тканинах, наприклад вірусу гепатиту В у печінці. Цю гіпотезу поки не можна спростувати, але і довести не є можливим.

Зв'язок генів HLA з генами імунної відповіді. В дослідженнях, проведених на мишах, було показано, що гени системи H-2 (аналогічно системі HLA у людини) зчеплені з генами імунної відповіді. Гени цієї області контролюють здатність індивідууму до розвитку імунної відповіді на вплив різних штучних і природних антигенів. Причому ця відповідь дуже чітко корелює з H-2 гаплотипами. Лінії мишей з гаплотипом H-2b виявилися здатними давати імунну відповідь на штучний поліпептид, в той час як у тварин з гаплотипом H-2k відмічений низький рівень відповіді. Виникає питання: детермінують гени H-2 імунну відповідь самі або залежать від інших генів, зчеплених з ними? В результаті тонких генетичних експериментів було встановлено, що система H-2 прямо не відповідає за розвиток імунної відповіді. Виявилось, що у мишей ця властивість присутня у генів, які розміщені в області Irb поблизу H-2. Результати досліджень, отриманих в експерименті на тваринах, можливо перенести на людину лише по аналогії, оскільки на той час у людини гени імунної відповіді поки не відкриті, хоч і були непрямі докази цього. Для виявлення Iг-генів у людини було використано сибс-метод. Міркування авторів були ґрунтовані на тому, що при введенні вакцин ідентичним по HLA сибсам повинна спостерігатися імунна відповідь однакової сили. Це дало б можливість доказати, що Iг-гени знаходяться на тій же хромосомі, що і антигени системи HLA. Однак підтвердження було

одержано лише при введенні вакцини проти вірусу корі, в той час як при імунізації іншими вакцинами чіткої закономірності не було встановлено.

Докази зчеплення генів імунної відповіді з антигенами HLA і їх роль в детермінуванні чутливості до хвороби були одержані під час дослідження хворих алергією. Була виявлена висока степінь кореляції між антигенами HLA-B7, Bw22, B40 і B27, які відносяться до однієї перехресно реагуючої групи, і алергічним захворюванням, при якому гіперчутливість проявляється як підвищене утворення анти-IgE-антитіл.

У 70-х роках була отримана значна кількість свідств зв'язку між схильністю до цілого ряду захворювань і генами системи HLA. Еволюція цієї системи, її поліморфізм проходив шляхом мутацій в геномі, які закріплювались в результаті еволюційного відбору як корисна генетична ознака.

Згідно теорії „генетичної селекції” Фішера, генетичний поліморфізм тоді зберігається в популяції, коли сприяє її *виживаності*. Практично унікальне поліморфне представництво антигенів даної системи у тканинах (антигени тільки чотирьох локусів можуть дати 50 млн. Комбінацій) і визначає біологічну індивідуальність людини і забезпечує видалення із організму „чужерідного” агента (хвороботворні організми і змінені особисті клітини).

Враховуючи значну участь ГКГС в імунних реакціях, більшість дослідників вважає, що найбільш сильні асоціації будуть зустрічатися при неопластичних процесах і інфекційних захворюваннях. Однак, в подальшому було встановлено, що найбільш виражені асоціації притаманні для порівняно рідко поширених захворювань, для яких характерні загальні ознаки: нез'ясована етіологія і патогенез, більш виражена сімейна концентрація, полігенне або поліморфне успадкування, порушення клітинного і гуморального імунітету.

L. Lamm розрізняє два види зв'язку HLA з захворюваннями: *генетична зчепленість і генетична асоціація*. Про генетичну зчепленість іде мова, коли „патологічний” ген має істинне зчеплення з HLA комплексом. При

цьому, в кожному разі коли спадкується гаплотип, спадкується і „патологічний” ген. У випадках зчепленості з HLA комплексом ми маємо можливість прогнозувати ризик реалізації захворювання уже в антенатальному або в ранньому постнатальному періодах. Але за даним принципом можна прогнозувати обмежене коло захворювань. Наприклад дефіцит ферменту 21-гідроксилази, абсолютна недостатність C2 і C4 компонентів комплементу, гемохроматоз. При даному захворюванні(5) було встановлено підвищення частоти антигену A3(69% проти 31% в нормі). Дослідження поширеності антигенів приданих захворюваннях при сімейному аналізі свідчить про підвищену поширеність гаплотипів HLA-A11,B27,Cw2 при наявності малих аномалій метаболізму заліза, а гаплотип HLA-A3,B14,Cw5- маркером підвищення адсорбції заліза з їжи. Повний комплекс клінічних ознак гемохроматозу спостерігається лише при наявності зазначених гаплотипів.

Значно частіше спостерігається асоціативний зв'язок маркерів HLA з захворюваннями. Часткове пояснення такого зв'язку дає сама структура короткого плеча 6 хромосоми, де окрім локусів HLA-A, B, C, DR знаходяться локуси другого і четвертого компонентів комплементу, В-фактора пропердину, супероксиддисмутази (СОД), і, можливо Ig Іа гени. Відомо, що гени, які кодуєть антигенні специфічності відповідні до класів антигенів: перший клас кодує серологічно визначаємі антигени HLA-A, B, C), які стимулюють імунну відповідь при галогенній несумісності. Другий клас генів детермінує антигени які теж виявляють серогоічними методами, але насьогодні загальноприйнятим є визначення їх специфічності молекулярно-біологічними методами, тобто на рівні геномної ДНК, оскільки вони присутні на В-клітинах, виключно на активованих Т-клітинах, сперматозоїдах і і епідермальних клітинах. В цю групу входять гени, які забезпечують проліферативну відповідь, залучаються в міжклітинну взаємодію і визначають силу імунної відповіді на певні антигени. Не можна не згадати виключно важливу роль антигенів даної системи в рестрикції імунної відповіді. HLA-антигени визначають кооперацію між різними субпопуляціями імунокомпетентних клітин лімфоцитів-макрофагів: комплекс антигенів II класу

в сполученні з чужерідним білком розпізнається макрофагами, які передають цю інформацію ідентичним лімфоцитам-хелперам. Потім Т-хелпери стимулюють генерацію Т-лімфоцитів кіллерів, які діють тільки на ті мишені, які є ідентичними за антигенами I класу. Третій клас генів вмикає регуляторні і структурні гени, які кодують білкові компоненти C2B C4 і V β -пропердиновий фактор. Поліморфізм генів головного комплексу гістосумісності класу III може бути зв'язаний з схильністю до діабету I типу. Ці гени кодують компоненти C2 і C4 комплементу і пропердиновий фактор B. Так, в гаплотипі A1, B8, DR3, DQ2, асоційованих з підвищеним ризиком розвитку ІЗСД, знайдено алель C4A0null. В південних регіонах Європи більш ранній вік дебюту захворювання пов'язано з іншим варіантом гаплотипу DR3, DQ2, котрий асоційований з A30, B18 і BfF1. В Північній Європі даний варіант мало розповсюджений, однак найчастіше зустрічається гаплотип A2, B15, Cw3, DR4 і містять алель C4B3, яка в свою чергу являється раритетний в інших гаплотипах.

Багаточисельні дослідження встановили факт як позитивної так і негативної асоціації антигенів HLA з різними захворюваннями за етіологією і патогенезом: захворювання ендокринної системи онкогематологічні і онкологічні захворювання захворювання сугавів, інфекційно-алергічні захворювання і інші. В загальній кількості досліджено близько 40 нозологічних одиниць. Число антигенів, які мають найбільш виражені асоціації з даними захворюваннями не так багато – серед антигенів локусу A (A1, A2, A3, A9, A10, A19), серед антигенів локусу B (B5, B7, B8, B15, B27, B35). При цьому антиген може бути маркером для невеликого кола захворювань (HLA-A3- позитивні асоціації -хронічний мієлолейкоз; міастенія; негативні асоціації псоріаз), або бути імуногенетичним маркером для багатьох захворювань (HLA-B7 – шістьма нозологічними формами, HLA-B8 д десятьма нозологічними формами).

Насьогодні велика увага приділена гіпотезі, згідно якої схильність до захворювань в усьому її поліморфному прояві визначається імунологічною реактивністю організму, яка, в свою чергу, контролюється I γ - генами. В даному випадку локуси HLA, зчеплені з I γ -

генами будуть виступати у ролі свідків асоціативного зв'язку алелей локусів Ir через функціональні зв'язки імунної системи з патологією. Так, певними дослідженнями було встановлено, що ген DR3 асоційований з геном, який інгібує швидкість деградації антигену в макрофагах. Інтенсивність деградації знаходиться в зворотньому зв'язку з силою гуморальної відповіді. Насьогодні багаточисельні дослідження присвячені саме вивченню генів імунної відповіді на рівні асоціації генотипової специфічності з патологічним процесом, патогенетичним субстратом якого є поорушення в імунному го меостазі. Виходячи з позицій, що гени HLA, здійснюють контроль за імунологічною відповіддю, в першу чергу локуси HLA-DR, сприйнятливість до захворювання може бути пов'язана саме з функцією Ir- генів. Так, підвищена імунна відповідь може призводити до продукції антитіл, які перешкоджають розвитку клітинного імунітету до даного патогену.

Перехід досліджень системи HLA на молекулярно-генетичний рівень дозволив по-новому розглянути механізми асоціативного зв'язку системи HLA з патологічними станами організму з урахуванням провідного механізму регуляції імунної відповіді. Так, молекули МНС приймають стабільну форму і відповідно трьохмірну конфігурацію тільки після того, як в зв'язуючий сайт її складки встроюється пептид. Тільки після цього молекула МНС здібна мігрувати на поверхню клітини, де вона і виконує свої функції. Можливість аналізувати амінокислотні послідовності всіх алельних варіантів антигенів HLA, навіть на рівні специфічності, структуру пептидів, які саме визначають специфічність різних чужерідних агентів, в тому числі і хвороботворні, дозволяє заздалегідь визначити відповідність тих чи інших імунодомінантних пептидів тим чи іншим участкам молекули МНС. Таким чином, можна заздалегідь спрогнозувати генетичну відповідь, або її відсутність на конкретний агент. Таку позицію добре ілюструють дані про те, що пептид вірусу герпеса зв'язується з гаплотипом HLA DQA1 0501/DQB1 2001, але не HLA DQA1 0201/DQB1 201. Різниця між ними в ланцюгу

DQA1 складає 15 амінокислотних залишків. [46]. Даний факт в свою чергу надає можливість прогнозувати відповідь індивіду на вакцинацію проти хворотворного агенту (8) і передбачити наскільки ця відповідь буде фізіологічною. Тобто, даний механізм дає можливість прогнозувати ризик розвитку цілого рідус захворювань

Можливим механізмом реалізації асоціативних зв'язків HLA антигенів з захворюванням вважається *дефіцит деяких компонентів комплементу в організмі хворого*. В таких випадках можливо, що регуляція імунної відповіді і схильність до захворювання виникають саме в цьому зв'язку. Наприклад, у хворих на розсіяний склероз встановлено, що низький рівень C3 і фактора Вf взаємозв'язані з HLA-B8, а у хворих з нормальним рівнем комплементу підвищена частота антигену В27(8 стаття).

Ще один з припустимих механізмів реалізації імуногенетичної асоціації антиген-захворювання може полягати в тому, що антиген визначає специфіку функціональних властивостей клітин організму, від яких залежить індивідуальна чутливість організму до патогенного фактору. До можливих механізмів відносять також зв'язок HLA з антигенами ембріональної диференціації. Дослідження комплексу гістосумісності мишей H-2 показало, що гени, які контролюють ембріональну диференціацію і онтогенез, розміщені дуже близько до них і, відповідно, знаходяться в стані нерівноважного зчеплення з H-2. Ця генетична область позначена символом T/t. Молекулярна маса і структура продуктів генів цієї області дуже подібні з HLA. Теоретично можливо, що деякі хвороби можуть виникати внаслідок порушення ембріогенезу, що контролюється T/t. В результаті цього алелі, зчеплені з антигенами HLA, будуть відображати різницю в їх розподіленні. Прикладом є взаємозв'язок між HLA-Dw7 і тестикулярною тератокарциномою. Комплекс T/t контролює виразність ембріонального антигену F9, який виявляється на тератокарциномі мишей і людини.

Вище вже було зазначено, що існує два види зв'язку HLA з захворюваннями: генетична детермінованість (зчепленість) і генетична асоціація. В першому випадку "паталогічний ген має правдиве зчеплення з HLA комплексом, тобто локалізується на тій же хромосомі, що і гени HLA комплексу. Найчастіше зв'язок HLA і захворювань проявляється в формі асоціацій: сильні, помірно виражені, слабо позитивні, слабо негативні, чітко негативні, різко негативні. В цих випадках можна говорити лише про схильність до патології. Причому один і той же ген може мати сильний зв'язок з одним захворюванням і слабкий зв'язок з іншим.

Багаточисельні дослідження свідчать про те, що сильні або помірні асоціації антигенів з захворюванням виявляються рідко. Переважна кількість асоціацій є слабкою. Разом з тим, саме слабкі асоціативні зв'язки тканинних антигенів визначені для практично усіх паталогічних процесів. Тобто саме слабкі асоціації є задіяними для визначення ступеню ризику виникнення більшості захворювань на основі комплексного обчислення всього спектру досліджених специфічностей.

Пояснення достатньо невеликої кількості сильних асоціацій антиген-захворювання може бути пояснено еволюційним відбором осіб з низьким імунологічним потенціалом до патогенних факторів. Тобто поширеність таких антигенів в популяції буде невисокою. З іншого боку, біохімічна побудова організму людини повинна забезпечувати їй достатню резистентність до усіх паталогій. Тому тканинні структури, які не забезпечують ці умови будуть еліменовані із антигенного фонду популяції разом зі структурами, які не несуть і протективної функції. Тому, на сьогодні є чітко встановленим фактом відповідність певним імуногенетичним структурам характерної побудови біохімічної структури клітин. Так, висловлене припущення, що концентрація Mg в еритроцитах є контрольованою генетично за рахунок комплексу H-2 у мишей і HLA у людини. Низький рівень Mg корелює з антигеном B35, з особливостями

синтезу системи імуноглобулінів. Низький рівень Mg є причиною латентної тетанії, а носії у фенотипі антигену В35 частіше хворіють на тиреоїдити, мають аутоімунні розлади в імунному гомеостазі.

Не можна не зазначити, що ступінь імуногенетичного ризику формування захворювання пов'язаний з гомозиготністю за антигенами гістосумісності. Так, визначено певне зниження у довгожителів поширеності гомозиготних осіб по генам локусів HLA- A і B, що можна пояснити принципом загального закону імуногенетики – коли гомозиготні особи мають менше резистентність до негативних чинників оточуючого середовища. Цей закон підтвердив також сімейний аналіз осіб з гіпо- або апластичною анемією. Також встановлено, достовірне підвищене поширення гомозиготних осіб серед батьків, діти яких були хворі на гематологічні захворювання. Також гомозиготність по локусам системи HLA- є передумовою виникнення толерантності до терапії, в тому числі при застосуванні трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ми.

Основними підходами вивчення зв'язку між антигенами HLA і різними хворобами являється популяційний і сімейний аналіз.

Популяційний аналіз дає можливість виявити частоту поширення генів в певній популяції, розрахувати частоту гаплотипів, фенотипів в межах локусу, а також степінь нерівномірного зчеплення, тобто гаметну асоціацію, між генами різних локусів, розміщених на одній і тій хромосомі.

Популяційний аналіз зв'язку антигенів HLA захворюваннями як правило проводять шляхом типування груп здорових людей і хворих з чітко встановленою нозологічною формою і наступного порівняння генних частот або частот антигенів.

Сімейний аналіз дає можливість виявити або відхилити спадкову схильність до того чи іншого захворювання, встановити гаплотипи хворих, показати зв'язок генів HLA один з одним або з іншими генами, вивчити частоту рекомбінацій і характер успадкування генів, які відповідають за

сприйняття захворювання, а також дослідити характер передання генів від батьків до хворих і здорових сибсів (сегрегаційний аналіз).

Про наявність спадкової схильності судять по збільшенню випадків хвороби в родовах і родинах, а також по виявленню у хворих родичів одного й того ж генетичного маркера. Генетичні маркери одного й того ж захворювання в різних родинах можуть бути різними.

Гаплотипи хворих досліджують на підставі даних тканинного типування обох батьків або сибсів. При наявності у батьків гомозиготності по 1-2 антигенам або спільності антигенів HLA встановити гаплотипи іноді не являється можливим. Встановлена велика група хвороб, в певному ступеню асоційованих з окремими антигенами і гаплотипами (набором антигенів). Крім того, виявлені популяційні і етнічні особливості асоціацій HLA комплексу з захворюваннями. Результати досліджень розповсюдження HLA-антигенів в різних популяціях дозволили виділити основні моменти, які характеризують людство як в цілому, так і окремі людські раси. Було показано, що для основних популяцій, що населяють землю, антигени, представлені в усіх расах, мають для певних етнічних груп різну фенотипові частоту. Вказані положення дозволяють зробити важливий для імуногенетики висновок про необхідність поведінки досліджувань по вивченню асоціацій між HLA-системою і різними патологічними станами в межах певної популяції.

Оригінальний підхід до вивчення зв'язку антигенів HLA з виникненням інфекційних захворювань використав де Фріс зі співав. Автори типували європейську популяцію голландців, які переселились більше 2000 років назад на інший континент у супінам. Як відомо, після переселення більша частина з них захворіла брюшним тифом або жовтою лихоманкою і загинула. В популяції голландців, котра мешкає в цій області на теперішній час, виявлено значне збільшення частоти зустрічання антигенів HLA-B13, -B17, -Bw38, -Bw50, а також антигену HLA-Aw30, котрий тісно зчеплений з антигенами HLA-B13 і HLA-B17. Низька частота зустрічання характерна для антигенів HLA-B7 і HLA-B12.

Автори провели порівняння даної популяції з основною популяцією в Голландії. Розрахунок різниці між генною частотою, що спостерігалась, в основній і популяції, яка досліджувалася, проводили по спеціальній формулі. В результаті було висунуте припущення, що особи, в яких у фенотипі містились антигени HLA-B7 і HLA-B12, найбільш сприймали тифозну бацилу або вірус жовтої лихоманки. Навпаки, з антигенами HLA-B13, -B17, -Bw38 асоціювалась резистентність до цих збудників хвороби. При вивченні зв'язку антигенів HLA з менінгококовою інфекцією було обстежено 50 дітей, які перенесли менінгіт в різний на момент дослідження. Паралельно гістотипували 50 дітей менінгококкцемією і 28 з менінгоковим назофарингітом. Проведенні серологічні дослідження показали відхилення в розподіленні деяких антигенів HLA в порівнянні з контрольною групою. Характерним для всіх варіантів хвороби, викликаного менінгококом, було зростання частоти зустрічання антигену локусу В-HLA-Bw16. При ізольованому менінгіті з підвищеною частотою зустрічався також антиген HLA-B12: 34% в порівнянні з 13,3% в контрольній групі.

Висунуто припущення про те, що область генів головного комплексу гістосумісності між локусами ВАТ1 і HLA-B містять гени, які відіграють важливу роль в розвитку ІЗСД. Всередині цієї області охарактеризовано декілька нових генів, названих PERB, але їх роль в розвитку патології до сих пір не з'ясована. Для гена фактору некрозу пухлини (TNF α), який знаходиться по сусідству, також описано поліморфізм, специфічний до певних гаплотипів і пов'язаний з рівнем синтезу TNF α і, як наслідок, з продукцією інтерлейкіна-1 (IL-1). Запропонована раніше модель про вплив посиленого синтезу цих цитокінів на схильність до ІЗСД не підтвердилась, так як не було показано якого-небудь незалежного зв'язку поліморфізму гену TNF α з діабетом.

Гени HLA-DP розміщуються ближче до центромери, чим гени HLA-DP, і, мабуть, не являються факторами ризику розвитку захворювання. Між локусами DQ і DP відсутня яка-небудь помітна нерівновага по зчепленню. Між цими локусами знаходяться гени білків, які приймають участь у внутрішньоклітинному транспорті антигенних пептидів (гени TAP1 і 2) і в цитоплазматичному процесінгу пептидів (гени LPM2 і 7). Висунута гіпотеза про важливість цих генів в патогенезі ІЗСД. Продукти алелей TAP і специфічні молекули класу I можуть утворювати функціонально важливі комплекси, які

відповідають за транспорт ендogenous пептидів, що зв'язані з молекулами класу I. Алелі генів класу I і локусу TAP знаходяться в рівновазі по зчепленню з алелями локусу HLA-DQ. Однак достовірні розходження в розподіленні алелей локусу TAP у хворих ІЗСД і у здорових індивідів можуть виникати також і з причини відомого зчеплення між локусом DQ і схильністю до ІЗСД. Комбінація алелей TAP2*0201 і DQB1*0602 проявляє захисний ефект по відношенню до ІЗСД, але при цьому між локусами HLA-DQ і TAP не знайдено нерівноваги по зчепленню.

Експерименти на лініях клітин, дефіцитних по генам головного комплексу гістосумісності, показали, що презентація цитоплазматичних антигенів молекулами класу II залежить як мінімум від продуктів експресії ще одного локусу, який знаходиться серед генів головного комплексу гістосумісності класу II. Цей локус не ототожнюється з генами TAP, LMP1 і LMP7. Пізніше було доведено, що дана клітинна фракція може бути приписана продуктам локусу DM. Білкові продукти цього гена містять потенційну ділянку зв'язування антигену, характерну для молекул класу II, однак відомі поліморфні області гену DM на відміну від генів HLA-DQ не розміщені в зонах, що відповідають за формування даної ділянки зв'язування.

Крім поліморфізму кодуєчи областей різних генів, поліморфні ділянки регуляторних областей також можуть бути зв'язані зі схильністю до захворювання. Даний зв'язок може бути опосередкований різними рівнями експресії окремих алелей до змін спорідненості цих ділянок до білків, що зв'язуються. Хотілось би відмітити, що гени HLA утягнуті не тільки в розвиток діабету 1-го типу. Відмічено їх зв'язок з інсулін незалежним (ІНСД) діабетом (тип 2). Мабуть, в популяціях європеїдів з максимальним ризиком ІНСД зв'язані лише молекулярні варіанти DQ а-ланцюгів Arg52+/Arg52+, на відміну від ІЗСД, в схильність до якого важливий внесок роблять і продукти гену DQB1. У білих американців також відмічена схильна роль до діабету 2-го типу генотипу HLA-DR4. У корінних новозеландців (маорі) високий ризик ІНСД асоційований з антигенами групи HLA-B40 (гени класу I), але не з генами класу II. У негрів США, хворих ІНСД і резистентних до інсуліну, достовірно показано більш високий вміст фенотипів HLA-DQW6, A33, DR2, DR9 і BF-S, що серологічно виявляються, в порівнянні з контролем. Зв'язок між генами HLA

класу II і ІНСД показаний і в російській популяції, хоча він і менш виражений, чим при діабеті 1-го типу.

Дуже важливим для розвитку даного напрямку стало припущення

W. Bodmer и J. Boomer про те, що на формування HLA-профілю європеоїдної популяції в значній мірі вплинули середні вікові епідемії таких захворювань як чума, віспа, холера та інші. Як наслідок цього серед осіб, які пережили епідемії великий відсоток мав певний HLA-генотип, в першу чергу, генотип HLA-A1, -B8, -DR3. Даний генотип, за припущенням дослідників, забезпечує більш високу резистентність до інфекційних захворювань і, на сьогодні є генетичним маркером європеоїдної популяції. Слід відмітити, що дане припущення знайшло підтвердження на прикладі недавніх спалахів черевного тифу в Сурінамі, коли серед європеоїдів, які вижили, значний відсоток склали особи з гаплотипом HLA-A1 B8 DR3. Водночас з цим W. Bodmer промовив справедливе припущення, що реалізація даного ефекту могла бути пов'язана тільки з асоціаціями між конкретними HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами і імунною відповіддю. Зважаючи на те, що толерантність до самих різних інфекційних агентів була пов'язана з одними і тими же гаплотипами HLA, було запропоновано припущення, що такого роду асоціація з HLA може бути пов'язана не тільки з самою генетично обумовленою відповіддю на конкретний інфекційний агент, але і з ланками імунної відповіді, які приймають участь в його реалізації. В сучасній імуногенетиці достатньо добре вивчені і визначені асоціації між окремими HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами з певними факторами імунного статусу, наприклад, з кількістю і функціональною активністю CD4⁺, CD8⁺, ЕКК, фагоцитуючої функції нейтрофілів і іншими.

Таблиця 9.1 - Приклади статистично достовірних кореляцій між системою HLA і захворюваннями.

Хвороба	HLA	Відносний ризик
Анкілозуючий спондилоартрит	B 27	90,1
Целиакія	DR3	73,0
Синдром Рейтера	B 27	35,9
Підгострий тироїдит	B 35	16,8
Синдром Гудпасчера	DR2	15,9
Природжена гіперплазія наднирників	B 47	15,4
Герметичне запалення	DR3	13,5
Ідіоматичний гемохроматоз	A3	9,3
Хронічний активний гепатит	B8	9,2
Хвороба Аддісона	DR3	8,8
Псоріаз	B13	8,7
Міастенія	B8	4,4
Ревматоїдний артрит	DR4	3,9
Цукровий діабет I типу	DR3	3,8
Хвороба Грейвса-Базедова	DR3	3,7

Підводячи підсумок характеристикі можливих механізмів асоціації імуногенетичних чинників можна зазначити, що завдяки високому поліморфізму системи HLA стала можливою висока комплементарність імунодомінантних сайтів молекул багаточисельних інфекційних збудників і конкретних антигенів гістосумісності, що, в свою чергу, стало ефективним фактором збереження людини як виду в умовах постійно змінного генетичного різномайття мікроорганізмів.

Питання для самоконтролю:

1. Чи пов'язана ступінь імуногенетичного ризику формування захворювання з гомозиготністю за антигенами гістосумісності.
2. Чи можливо виникнення хвороб внаслідок порушення ембріогенезу, пов'язаного з HLA антигенами ембріональної диференціації.
3. Назвіть можливі механізми реалізації асоціативних зв'язків HLA антигенів з захворюванням.
4. Що таке генетична зчепленість і генетична асоціація.
5. Охарактеризуйте рецепторну теорію механізму HLA взаємозв'язку з захворюванням.

Література

1. Иммуногенетика человека и биобезопасность/ М. А. Пальцев, Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев. – М.: Медицина, 2007. – 143 с.
2. Bodmer W.F. Models and mechanisms for HLA and disease association. // J.Exp.Med. - 1980 - №152 - p353-357.
3. Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Ассоциированная с HLA предрасположенность к заболеванию и некоторые механизмы ее реализации.// Вестник АМН СССР.-1988, №5.-с. 30-38.
4. Бондаренко А.П. HLA и болезни. М. – 1999. – 105 с.
5. 10. Шабалин В.Н., Серова Л.Д. Клиническая иммуногематология. М.,- 1988. – 312 с.
6. Schenken-Brunner H. Yuman blood groups. Chemical and biochemical basis of antigen specificity, 2000. – 636 p.
7. Антигены эритроцитов и особенности противoinфекционной резистентности / Жибурт Е.Б., Серебрянная Н.Б., Иванова А.И., Трофименко Э.В. и др. //Гематология и трансфузиология. - 1997. - Т.42, №1. - С.3-4.

8. Mourant A., Kopes A., Domaniewska-Soberak. Blood groupe and Diseases. Oxford: Oxford University Press, 1977. – 306 p.
9. Певницкий М.А. Статистическая оценка ассоциации HLA-антигенов с заболеваниями. Вестник АМН СССР 1988;7:48-51.
10. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. - Киев: Здоров'я, 1990. - 200 с.

Розділ X

Імуногенетичні аспекти радіаційної генетики.

Відомо, що формування фізіологічного статусу індивіду в умовах впливу несприятливих екологічних чинників визначається декількома взаємодіючими механізмами серед яких певне місце посідають генетично детерміновані процеси, пов'язані з генетичною схильністю організму до патології. На фоні несприятливих екзогенних чинників одна та сама комбінація генетичних факторів може виступати як в ролі ініціаторів, так і протекторів розвитку патологічних явищ.

Ми розглянемо цей аспект на моделі реалізації пострадіаційних ефектів у осіб, що зазнали впливу комплексу факторів Чорнобильської катастрофи. Оскільки в даному випадку переважаючим фактором є радіаційний, то досліджували можливість реалізації захворювань, які причинно пов'язані з іонізуючим опроміненням. До таких перш за все відносять тиреоїдну та онкогематологічну патології, патогенетичним субстратом формування яких є порушення в імунному гомеостазі, а серед генетичних чинників схильності до патологічного процесу, безумовно, провідне місце посідає головний комплекс гістосумісності людини.

В умовах радіаційного опромінення також важливим є аспект досліджень ймовірності індукуючого впливу радіаційного чинника на реалізацію спадкової схильності до формування патологічного процесу, який може бути причинно пов'язаний з опроміненням. При цьому треба враховувати, що з радіаційним чинником в дозах, що провокують розвиток гострої променевої хвороби, а також з хронічним опроміненням, якого зазнали контингенти, які мешкають на забруднених територіях, українська популяція не стикалась, тобто у відношенні останнього не було відбору в процесі еволюції. Будь який алель, розповсюджений раніше в популяції з-за селективних переваг, або дрейфу, в зміненій екологічній обстановці може стати індуктором реалізації генетичної схильності.

Одною з можливих причин формування індивідуальної чутливості індивіду до радіаційного чинника може бути генетична детермінованість радіочутливості біологічної системи. Дослідження в цьому напрямку, як правило проводилось з позиції вивчення прямої дії опромінення на генетичну інформацію на рівні цитогенетичних і молекулярно-генетичних порушень в клітині і як слідство, реалізацію пострадіаційних ефектів на рівні систем і організму в цілому. Не менш цікавим є протилежний підхід, зокрема вплив генетичної інформації на ступінь реагування різних систем організму при дії радіаційного опромінення. В цьому аспекті, згідно законам класичної імуногенетики **кожний індивід отримує при народженні набір генетичної інформації про схильність до формування, або толерантності до конкретних захворювань, представлених на генетичних системах крові.**

Даний розділ ми присвятили саме імуногенетичному аспекту радіочутливості організму і ризику реалізації пострадіаційних ефектів на рівні соматичної патології на основі дослідження поліморфізму імуногенетичних чинників, як субстрату формування радіобіологічних ефектів.

Імуногенетичні маркери радіочутливості організму

Відомо, що радіаційне опромінення перш за все впливає на критичні до радіаційного чинника системи, зокрема на імунну систему на рівні імунокомпетентних клітин. Саме ці порушення складають підґрунтя формування і реалізації розладів на рівні гемопоезу і імунопоезу, які в подальшому і виконують функції чинників ризику реалізації мультифакторіальної соматичної патології. Світові дані і дані, які були отримані в НЦРМ АМН України свідчать про високу індивідуальну відмінність чутливості до впливу радіації на рівні різних систем організму. В даному випадку українські вчені розглядали таку індивідуальну

відмінність з позицій імуногенетичного детермінування радіочутливості біологічної системи, яку представляє організм людини, коли у осіб, які мали тотожний радіологічний анамнез і зазнали опромінення в однакових дозах від 0,45 –2,0Гр, пострадіаційні ефекти проявлялися по-різному: в одних випадках спостерігався кістково мозковий синдром, в інших лише транзиторна реакція імуно- і гемопоезу на опромінення. Безумовно, єдиною адекватною моделлю для дослідження імуногенетичного детермінування радіочутливості організму є модель гострої променевої хвороби I ступеню (дози опромінення 0,45 –2,0Гр), коли кістковомозкової синдром міг реалізуватись, або ні, як в опозитній групі досліджених з аналогічним радіаційним анамнезом, але непідтвердженим діагнозом ГПХ.

Порівняльний аналіз розподілу антигенів гістосумісності локусів А, В, Сw, Dr у реконвалесцентів ГПХ, в опозитній групі і в контрольній популяції відповідної геногеографічної зони (Центрально-Українська зона) свідчить про вірогідне підвищення в групі реконвалесцентів ГПХ антигенів специфічностей HLA-A10; HLA-A28; HLA-B16; HLA-B38; HLA-B35; HLA-DR3; HLA-DR4; (Рис. 1) и вірогідну асоціацію з ризиком реалізації даної радіаційної патології, що дозволяє віднести їх до імуногенетичних маркерів підвищеної радіочутливості організму. За концентрацією і коефіцієнтом асоціації з в обстежених групах, антигенні серотипи HLA-B15; HLA-DR2; віднесені до маркерів з протективною функцією.

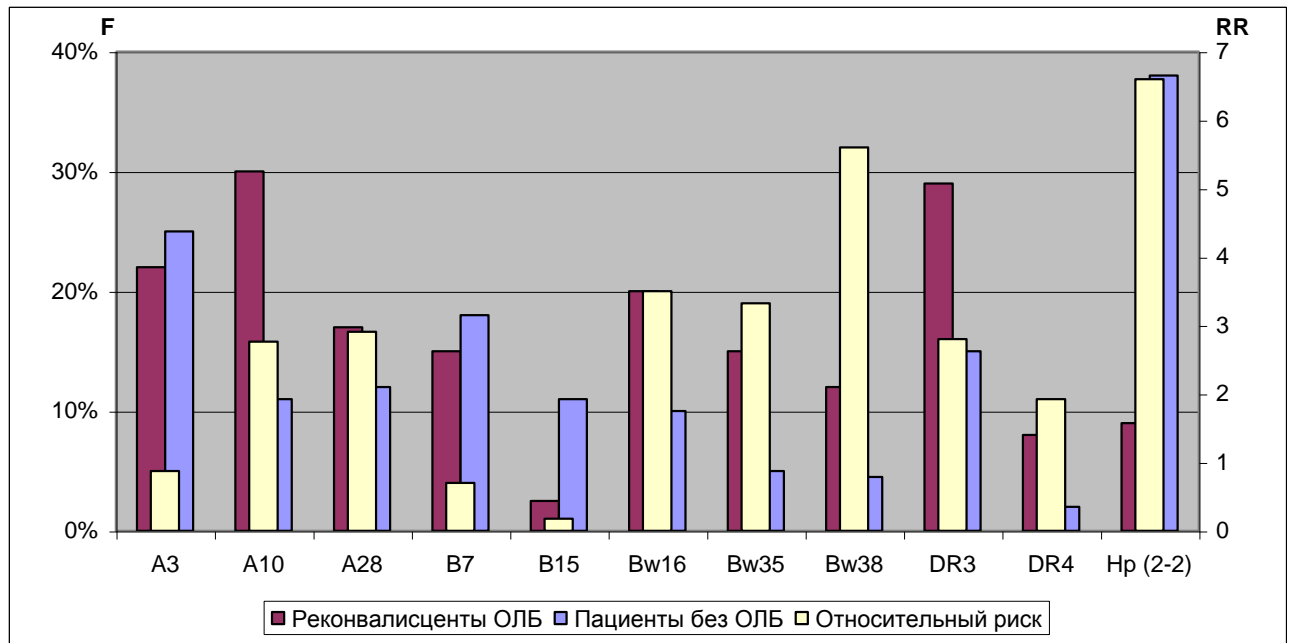


Рисунок 10.1 - Вірогідні HLA-асоціації з ризиком розвитку радіаційної патології (ГПХ)

Аналіз асоціативного зв'язку гострої променевої хвороби з носійством певних гаплотипів і фенотипів (HLA-A/A; HLA-A/B; HLA-A/DR; HLA-B/DR; RHLA-B/DQ) свідчить про високу поширеність саме антигенних композицій, до складу яких входять ізольовані специфічності – маркери радіочутливості. Разом з тим, спостерігається перерозподіл значень коефіцієнта асоціації RR в залежності від сполучень антигенів.

Аналіз асоціативного зв'язку гострої променевої хвороби з носійством певних гаплотипів і фенотипів (HLA-A/A; HLA-A/B; HLA-A/DR; HLA-B/DR; RHLA-B/DQ) свідчить про високу поширеність саме антигенних композицій, до складу яких входять ізольовані специфічності – маркери радіочутливості. Разом з тим, спостерігається перерозподіл значень коефіцієнта асоціації RR в залежності від сполучень антигенів.

Даний факт свідчить про складні взаємовідносини між антигенними детермінантами в межах локусу і системи в цілому за наявності синергизму і антагонизму між певними антигенами в реалізації механізмів асоціації з розвитком патологічного процесу.

Найбільш виражені синергічні взаємовідносини характерні для сполучень антигенів HLA-A1.128; HLA-A10.28; HLA-A1.1; HLA-B8,w16; HLA-A10,B13; HLA-A10,B38, HLA-DR3.4, коли значно підвищується коефіцієнт асоціації RR; - антагонистичні – для сполучень антигенів HLA-A10,B16; HLA-A1,B16; HLA-A1,B16; HLA-B16,21; HLA-B13,DQ1; HLA-B16,DR3, коли, або значно знижується чисельні значення коефіцієнта, або при достатньо високому RR губиться ступінь вірогідності. (рис. 10.2).

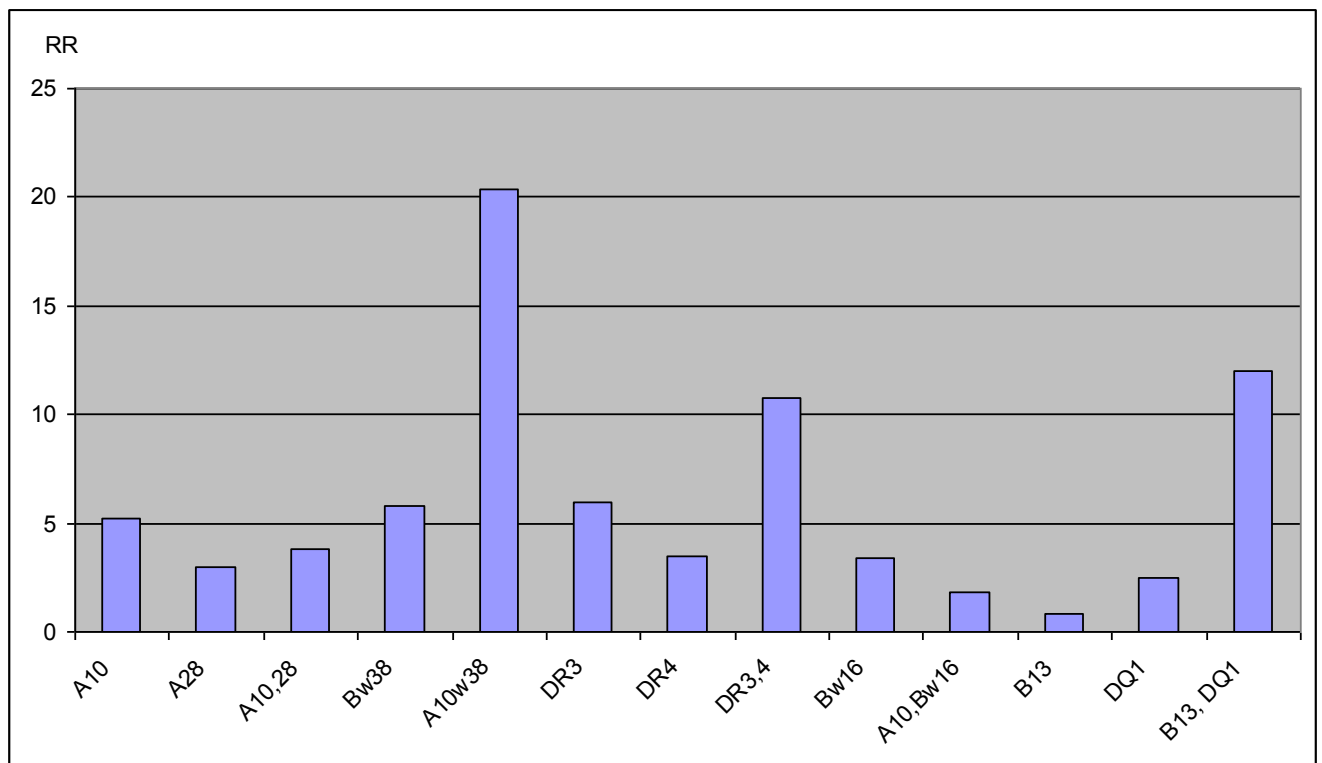


Рисунок 10.2 - Деякі синергічні і антогонистичні взаємозв'язки антигенів гістосумісності

При цьому в синергічні і антогонистичні взаємовідносини можуть вступати антигени, які ізольовано вірогідно асоційовані з підвищеною радіочутливістю організму.

При співставленні отриманих даних зі світовими даними відносно HLA асоціаціях з захворюваннями були визначені у переважної більшості опромінених осіб (88%) в фенотипах антигени, які є відповідальними за схильність до гематологічних захворювань. До таких відносять антиген A2, який вірогідно частіше ідентифікований у хорих на гіпопластичну анемію, антигени B5 и B35, асоційовані з хронічним лімфолейкозом, антиген B8, - з мієлобластною формою гострого лейкозу. Вивчення антигенного поліморфізму інших генетичних систем крові, зокрема генетичних систем білків Hр, свідчить про вірогідне підвищення концентрації фенотипу Hр2-2 (37,34% проти 8,33%), RR – 6,67, що відповідно світовим даним популяційно-генетичних досліджень, асоційований з підвищеною чутливістю організму до впливу будь-якого шкідливого екологічного фактору (18,19,20).

Розподіл генетичних систем еритроцитів у реконвалесцентів ГПХ у співставленні з опозитною групою не виявив вірогідних відмінностей в системі ABO, але була визначена певна залежність поширеності антигенів від ступеню тяжкості захворювання, тобто від ступеню опромінення. Зокрема, в групі хворих ГПХ II - III ступеню в 2-3 рази вище частота фенотипу 0 на тлі зниження концентрації антигена B. В деяких випадках спостерігалась соматична модифікація антигенів групи ABO при носійстві антигену A, що проявилось в значному зниженні серологічної активності на рівні специфічності (1987-1988 рр.) і її нормалізації 1989 році.

Для ізольованого АВО фенотипа не виявлено вірогідної асоціації з розвитком гострої променевої хвороби. Але в сполученні з алелями системи HLA коефіцієнт RR підвищувався виключно для фенотипу А, тоді як для фенотипів О і В характерні антогонистичні взаємовідношення, і як слідство, зниження коефіцієнту асоціативного зв'язку. У випадках, коли тенденції направлені до проявлення позитивних асоціацій з ГПХ, антигенні сполучення, як правило, вміщували HLA- маркери підвищеної радіочутливості.

Розподілу антигенів систем Rh-Hr, MNS, Kell, Duffy, Kidd у реконвалесцентів ГПХ суттєво не відрізнявся при співставленні з опозитною і контрольною групами. Вірогідних асоціацій для цих систем з розвитком радіаційної патології не визначено. Але і в даному випадку, співвідношення з антигенами головного комплексу гістосумісності вносить свої корективи відносно оцінки імуногенетично опосередкованої реалізації пострадіаційних ефектів на рівні організму людини.

Найбільш виражені полісистемні асоціативні зв'язки з променевою хворобою встановлені для HLA алелей в укупності з с фенотипами Hr і MN (табл.10.1)

Таблиця 10.1 - Фенотипичні композиції антигенів різних генетичних систем крові в асоціаціях з радіаційною патологією (ГПХ).

Композиція	Частота зустрічаємості (%)		Відносний ризик	Хкв.
	Контроль	ГПХ		
O(I);Rh+	30	18.87	0.54	1.564
B(III);Rh+	12.50	24.53	2.28	2.113
O(I);Hr1-1	16.67	5.66	0.30	1.669

O(I);Hp2-2	1.20	7.55	1.36	4.926*
A10;Hp2-2	1.12	6.60	4.30	4.675*
B15;MN	4.17	1.08	0.85	4.450*
A10;MN	0.64	4.72	1.21	2.177
A28;MN	0.08	3.77	1.16	2.934
Bw16;Hp2-2	0.80	2.83	1.12	3.695*
DR2;Rh+	10.00	2.00	0.67	4.74*
DR3;MN	0.20	10.87	1.56	2.35

Аналіз взаємодії між алогенними системами лейкоцитів і еритроцитів свідчить про наявність конкурентних взаємовідносин в реалізації схильності до патологічного процесу.

Таким чином, ступінь внеску ізольованих генетичних систем крові в формування радіочутливості організму людини неоднозначні. За значимістю вони розташовані у слідуєчому порядку: **HLA (DR, DQ, B, A, C), Hp, MN, ABO, Rh-Hr.** Для систем **Kell, Daffy, Kidd** асоціативі зв'язки не вірогідні.

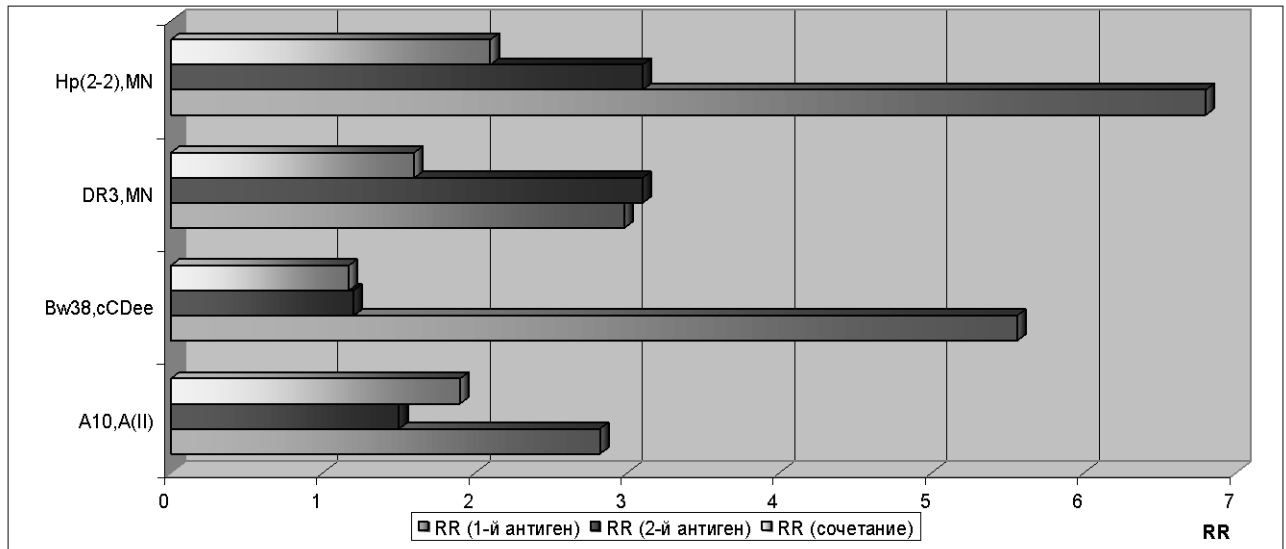


Рисунок 10.3 - Характер взаємовідношень різних генетичних систем крові при радіаційному опроміненні

Складність функціональних взаємовідношин генетичних систем крові свідчить про недостатність обчислення коефіцієнта асоціації ізольованих антигенів з захворюванням, яке не відображає реального місця індивіду в групі ризику реалізації генетичної схильності до патології. Розробка методу обчислення «сумарного» коефіцієнта ризику значно підвищила ступінь вірогідності імуногенетичного аналізу, оскільки на об'єктивну оцінку ступеня генетичної схильності суттєво впливає як кількісний так і якісний склад фенотипових характеристик індивіду, сукупність яких по суті, і визначає місце індивіду в групі ризику реалізації патологічного процесу.

Імуногенетичний аналіз за ізольованими антигенами є недостатнім, оскільки має широкий діапазон коефіцієнтів схильності RR (від 1,0 до безкрайності) і по суті визначає тільки факт присутності генетичної схильності. Тому перші спроби визначення «сумарного коефіцієнта ризику» RRs і нормування значень коефіцієнту ризику дало можливість включити в поняття асоціативного зв'язку з патологічним процесом **оцінку ризику реалізації генетичної схильності**. Оптимальні математичні підходи до статистичного аналізу імуногенетичного прогнозування за повним набором генетичних алелей в межах однієї системи і в межах різних генетичних систем крові ще не розроблені.

Зроблена спроба застосувати в якості величини сумарного відносного ризику прийнято чисельне значення нормованої величини «відношення правдоподібності»: для не схильних в інтервалі від 0 до 1,0 і для генетично схильних в інтервалі відт 1,0 до 10,0. Згідно принципам класичної імуногенетики, чим вище коефіцієнт асоціативного зв'язку, тим вище можливість реалізації генетичної схильності. Дані, отримані в НЦРМ АМН України свідчать про те, що в умовах дії негативних екзогенних чинників, зокрема радіаційного це правило порушується. Так, розподіл відсотку опромінених індивідів досліджених груп за коефіцієнтами сумарного ризику в залежності від чисельних значень свідчить, що в групі пацієнтів з непідтвердженим діагнозом ГПХ більший відсоток осіб знаходиться в діапазоні RRs - 0.5 – 1.0, менший – 1.0 – 5.0 (рис.10.4).

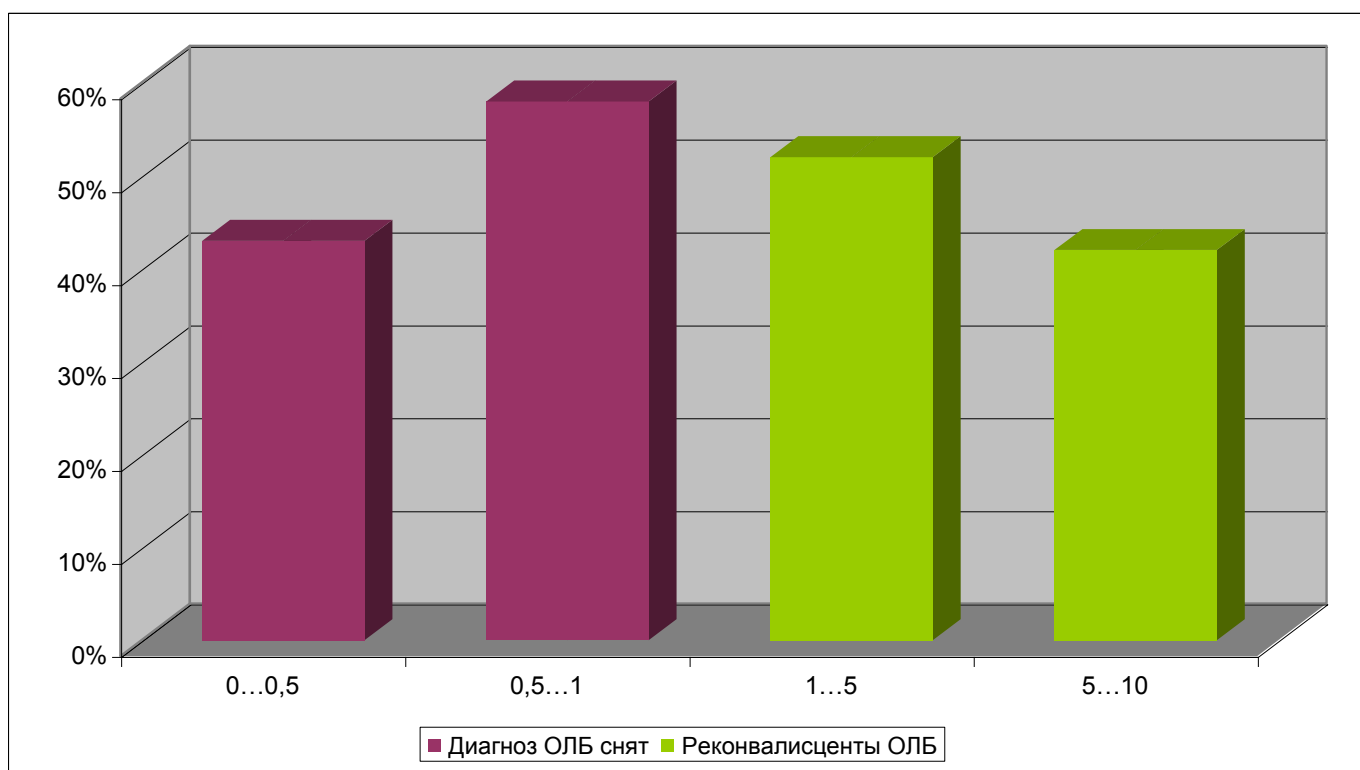


Рисунок 10.4 - Розподіл осіб, опромінених в дозі вище 0.75Гр. за коефіцієнтами сумарного ризику (RRs) генетичної схильності до ГПХ.

В групі реконвалесцентів ГПХ більший відсоток осіб розміщується в діапазоні значень RRs – 1.0 – 5.0, менший – в діапазоні RRs – 5.0 – 10.0. Дане положення було перевірено і підтверджено при порівнянні неопроміненої популяції і популяції реконвалесцентів ГПХ з однаковими імунологічними дисфункціями в імуноглобуліновому спектрі – вірогідним

зниженням концентрації IgA. Тобто має місце факт підвищення порогу чутливості імуногенетичних параметрів при радіаційному опроміненні, що сприяє реалізації генетичної схильності при більш низьких коефіцієнтах ризику. **Таким чином, в умовах дії шкідливих екологічних чинників, зокрема радіаційного змінюється традиційна залежність генетичних асоціацій, що свідчить про наявність певної індукції з боку радіаційного чинника в реалізації генетичної схильності до конкретного патологічного процесу.**

Імуногенетичні чинники і ризик реалізації пострадіаційних ефектів на рівні соматичної патології у опроміненних осіб.

Дослідження ризику реалізації радіоіндукованої соматичної патології у опроміненних контингентів внаслідок аварії на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення свідчать про певні закономірності формування патологічного процесу на рівні окремих ланок імунопоезу і гемопоезу. Разом з тим, в певних випадках реалізація патології відбувається поза встановлених закономірностей, що свідчить про можливість інших механізмів формування пострадіаційних ефектів.

В даному випадку ми розглядаємо окремо можливість внеску імуногенетичної компоненти в реалізацію радіоіндукованої тиреоїдної і онкогематологічної патологій, як патологій, які причинно можуть бути пов'язані з опроміненням.

Ретроспективний аналіз ризику формування тиреоїдної патології, зокрема, хронічного тиреоїдиту у реконвалесцентів ГПХ I ступеню показав, що в 1988 році захворювання було верифіковано у 13,59% осіб, в 1993 р. - у 27,76% досліджених, із яких 68,2 % мали у фенотипі маркери

генетичної до тиреоїдної патології (HLA-A19; HLA-A1;HLA-B22; HLA-DR5). Це свідчить про наявність механізму реалізації генетичної схильності до захворювання в умовах радіаційного опромінення.

Встановлено також, що генетичні маркери радіочутливості суттєво підвищують ризик реалізації пострадіаційних ефектів як на рівні соматичної патології, яка причинно пов'язана з опроміненням, так і на рівні імунного гомеостазу (таблиця 3).

Таблиця 10.5 - Вірогідні асоціації HLA-маркерів з хронічним тиреоїдитом і порушеннями в імунному статусі при опроміненні.

Імунологічні параметри	Антигени та їх сполучення	Коефіцієнт відносного ризику (RR)	
		Реконвалесценти ГПХ	Неопроміненні
1	2	3	4
CD4+ знижена кількість клітин	HLA-B8	0,29	0,56
	HLA-B21	7,54*	2,46
	HLA-DR2	5,44	5,00
	HLA-DR7	2,86	1,50
	HLA-A2,B7	3,58	2,85
	HLA-A9,10	4,28	2,50
	HLA-B7,DR2	3,85	3,00
	HLA-DR7,0(I)	3,28*	1,34
CD8+ підвищена кількість клітин	HLA-DR3	2,30	1,50
	HLA-A28	3,24	1,90
	HLA-A1,B21	2,86	2,00
	HLA-B21,0(I)	6,55*	3,44
	HLA-B21,DR3	7,20*	2,86
	HLA-B21,cCDee	4,20*	5,64
CD4/8 знижений коефіцієнт	HLA-A10	3,54	2,86
	HLA-B7	4,28*	2,86
CD3+ знижена кількість клітин	HLA-DR3	3,54	3,54
	HLA-DR3,7	7,23*	3,54
	HLA-B8	0,53	0,41
	HLA-A2	0,42	0,38
	HLA-A10	0,61	0,52
CD19+ підвищена кількість клітин	HLA-B8,DR3	3,46*	1,34
	HLA-B8, DR7	7,20*	3,16
	HLA-B35,DR3	2,96*	0,56
Хронічний тиреоїдит	HLA-A19	5,59	4,18
	HLA-A19;B38	7,06	3,24
	HLA-DR5	3,60	3,60

Примітка: * - $p < 0,05$ в порівнянні з опозитною групою

Ретроспективний аналіз реалізації віддалених пострадіаційних ефектів, обумовлених впливом аварії на Чорнобильській АЕС, свідчить також про маніфестуючий прояв вторинних імунологічних дисфункцій, підвищення частоти автоімунних ендокринних захворювань і зростання кількості радіаційно обумовлених злоякісних пухлин щитоподібної залози серед опромінених контингентів. При цьому групу підвищеного ризику складають діти та підлітки, оскільки невеликі розміри та вища ніж у дорослих функціональна активність щитоподібної залози у дітей, що робить її більш схильною до розвитку радіоіндукованої патології. Саме фізіологічний стан щитоподібної залози привертає увагу у зв'язку з наявністю переконливих доказів щодо недостатньої компенсації функції залози на початкових стадіях збільшення і в зв'язку з цим, можливості подальшого формування стійкої тироїдної патології. Генетичну схильність до розвитку порушень в ендокринній системі, можна розглядати як конкретний патогенетичний субстрат формування автоімунних ендокринних захворювань у дітей з нетоксичним дифузним зобом ІА – ІВ ступеня (НДЗ), пов'язаний з ризиком переходу НДЗ у тяжкі клінічні форми.

Було встановлено, що у дітей з НДЗ незалежно від характеру опромінення значніше поширення антигенів HLA-A19, HLA-B8, HLA-B22, HLA-B35, HLA-DR5, які є маркерами тироїдної патології, у співставленні з опроміненими дітьми без НДЗ. Наявність у фенотипі дітей з НДЗ, які мешкають на контрольованих територіях, маркерів підвищеної радіочутливості організму (HLA-A10; HLA-B38; HLA-DR4) підсилює ступінь ризику реалізації схильності до тироїдної патології, доказом цього є діагностована через п'ять років патологія щитоподібної залози в 65% в порівнянні з 1-3 % в контрольній популяції.

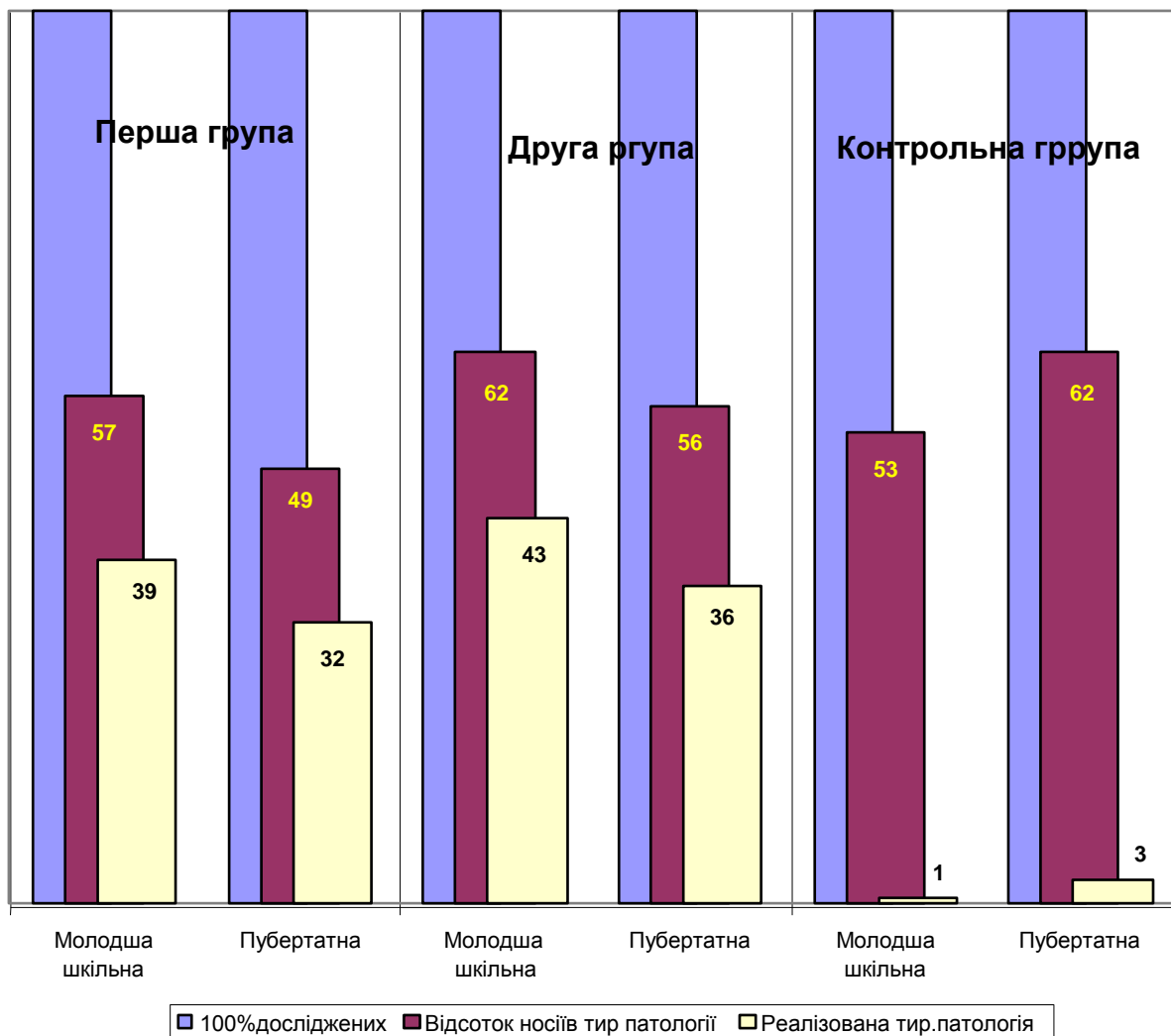


Рисунок 10.5 - Відсоткова характеристика носійства маркерів тироїдної патології та реалізації спадкової генетичної до захворювань щитоподібної залози у обстежених групах дітей з НДЗ

До групи захворювань, які можуть бути причинно пов'язані з опроміненням належать лімфопроліферативні захворювання. Це обумовлено тим, що радіаційні ефекти реалізуються перш за все на рівні критичних систем організму – гемопоетичної і імунологічної, патологічні зміни в яких в свою чергу складають патогенетичний субстрат розвитку онкогематологічної патології. В усіх випадках у реконвалесцентів ГПХ, у яких діагностована онкогематологічна патологія, у фенотипі наряду з антигенами, асоційованими саме з захворюванням ідентифіковани маркери підвищеної радіочутливості організму.

Аналіз ступіню вкладу імуногенетичних маркерів радіочутливості в формування онкогематологічної патології в умовах опромінення свідчить про підсилення ступеню ризику формування патологічного процесу. Так, асоціативний коефіцієнт відносного ризику RR при носійстві в генотипі хворого на гостру лейкемію алелей HLA-A*24; HLA-A*02 ; DRB1*07; B52 дорівнював 3,84. При генотипичному сполученні HLA-A*24; HLA-A*02; **B*35;B38; Cw*3; DR4**; асоціативний коефіцієнт $RR = 7,03$. Тобто носійство даних алелей є імуногенетичним чинником ризику розладів в конкретних ланках гемопоезу, реалізації кістковомозкового синдрому і онкогематологічної патології при опроміненні.

Таким чином, результати двадцятирічного дослідження імуногенетичних аспектів радіаційної генетики переконливо свідчать про наявність генетично детермінованої радіочутливості організму людини, субстратом якої є генетичні системи крові.

Імуногенетичне дослідження 6 500 осіб (дорослих і дітей), опромінених в різних дозах, в різний термін, шляхом гострого опромінення і пролонгованого, зовнішнього і за рахунок радіонуклідів свідчить, що в усіх випадках спостерігаються загальні закономірності генетичних механізмів реалізації пострадіаційних ефектів на рівні імунного гомеостазу і мультифакторіальної патології, серед яких визначені найважливіші:

- Реалізація механізмів асоціації тканинних імуногенетичних факторів з розвитком патологічного процесу обумовлена типом взаємовідносин (синергізм, антогонізм) між антигенними детермінантами.

- Одним з механізмів реалізації пострадіаційних ефектів на рівні імунного гомеостазу і соматичної патології, причинно пов'язаної з радіаційним опроміненням, є реалізація генетичної схильності до патологічного процесу в умовах опромінення.

- Радіаційний фактор є індукуючим в реалізації генетичної схильності до патологічного процесу, що дозволяє розглядати його як можливий селективно-екологічний фактор, індуктор віддалених наслідків опромінення на індивідуальному і популяційному рівнях.

Світові набутки в напрямку дослідження генетичних основ впливу негативних екзогенних чинників на організм людини свідчать, що найбільше значення з позицій ризику реалізації генетичної схильності до патологічного процесу мають ті захворювання, у яких патогенетичний субстрат складають

імунологічні порушення, тому і підкреслюється значення імуногенетичної компоненти, яка відповідні саме за генетичний контроль імуного гомеостазу.

Незважаючи на багаточисельність і різне походження негативних екологічних чинників, а також різні механізми прямого пошкоджуючого впливу на організм людини, з позицій імуногенетики механізми реалізації генетичної схильності в усіх випадках будуть загальними.

Питання для самоконтролю.

1. Чи існує генетично детермінована радіочутливість і радіорезистентність організму людини?
2. При наявності у генотипі особи маркрів радіочутливості чи є радіаційний фактор індуктором реалізації генетичної схильності до патологічного процесу в умовах опромінення?
3. Яка соматична патологія може бути причинно пов'язана з опроміненням?
4. Які типи функціональних взаємовідносин існують між антигенними детермінантами в межах однієї системи і між системами?

ЛИТЕРАТУРА

1. Pilinskaya M.A. Cytogenetic effects in somatic cells of chernobyl accident survivors as biomarker of low radiation doses exposure // International Journal of Radiation Medicine. – 1999. - № 2. – P. 60 – 66.
2. Kovalchuk L., Mishchuk V. Genetic characteristics of lymphocytes of peripheral blood of the Chernobyl accident consequences // International Journal of Radiation Medicine. – 2001. V. 3. - № 1-2. – P. 67.
3. Поспишил М., Ваха И. Индивидуальная радиочувствительность, ее механизмы и проявления. – М.: Энергоатомиздат, -1986.-112с.
4. Мінченко Ж.М. Генетичні системи крові людини при радіаційному опроміненні: Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук.: - К.,1994. - 32 с.

5. Svejgaard A., Morling N., Platz P. et al. HLA and disease associations with special reference to mechanisms. // *Transplant. Proc.*, -1996. - v.28. -p.913-917.
8. Прокоп О., Гёлер В. Группы крови человека: Пер. с немецкого. – М.: Медицина, 1991. – 512 с.
9. Terasaki P.I, Bernoco F, Park M.S. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens // *AM. J. Clin. Patol.* – 1978. – V. 69. – P. 103 – 120.
10. Minchenko J.N., Lefter A.V., Kalinichenko S.B. Appied tasks solusion software tools // *Catalog software of Ukraine.* – Kiev: Second edition, 1994. - P.36 – 37.
11. Поповская Т.Н., Козырева Т.В., Никифорова Н.А. Прогнозирование развития типов иммунопатологических реакций под воздействием малых доз ионизирующей радиации на основании HLA-фенотипа // Віддалені наслідки опромінення в імунній та гемопоетичній системах : Тези науково-практичної конференції 7 - 10 жовтня 1996 р. - Киив, 1996. - С. 21 – 22.
12. Минченко Ж.Н., Лефтер А.В., Калиниченко С.Б. Математические аспекты исследований ассоциативных связей генетических систем крови с заболеваниями // *Международный журнал радиационной медицины.* - 2001. - N 3-4. - С.106 – 117.
13. Ж.М.Мінченко, О.О.Дмитренко, Д.А.Бази́ка, І.С.Дягі́ль, А.А.Чума́к, В.Г.Бєбєшкo. Імуногенетичні чинники в механізмах радіочутливості організму людини і ризику реалізації пострадіаційних ефектів на рівні дисфункцій і імунопоезі та формуванні соматичної патології у опромінених осіб внаслідок аварії на ЧАЕС/ в монографії „Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній електростанції//.- ДІА.- Київ.-2007.- с.413-422
14. Тельнов В.И. Оценка распределения генотипов гаптоглобина у людей, подвергшихся хроническому профессиональному облучению в значительных дозах // *Генетика.* - Т. 30. - № 9. - С. 1274 – 1277.
15. HLA-генетичні маркери в прогнозі ушкоджуючої дії малих доз

іонізуючого випромінення на імунні процеси / Афоніна Г.Б., Мінченко Ж.М.,
Яценко К.Г. та ін. // УРЖ . - 1994. - № 2. - С. 161 - 163

РОЗДІЛ XI

ПОПУЛЯЦІЙНА ІМУНОГЕНЕТИКА

11.1 Геноегеографія і поліморфізм генетичних систем крові

Основою геноегеографії є популяційна генетика, яка вивчає поширення антигенів (алельних генів) в різних людських расах і популяціях всього світу. Даний напрямок є невід'ємною складовою як фундаментальної так і прикладної імуногенетики, оскільки висвітлює нормальний розподіл імуногенетичних чинників в здорових популяціях різних рас. В галузі прикладної імуногенетики цей розділ має велике значення для трансплантології в аспекті підвищення ефективності селекції пар донор-реципієнт на основі урахування популяційної принадності індивіду. Вивчення асоціативного зв'язку з різними соматичними патологіями і імунними розладами також не може бути коректним без урахування генетичної структури дослідженої популяції. Для антропологів цей напрямок є важливим для прояснення питання відносно міграції населення і для встановлення походження тих чи інших рас. Розподіл антигенів в популяції має також певне значення для розрахування можливих іммуноконфліктних станів у системі мати-плід і для судмедекспертизи.

Кожний таксономічний вид живих організмів (тварин, рослин і мікроорганізмів) розділяється на складові сукупності – популяції. Термін "популяція" (від лат. *populus* – народ) означає сукупність особин певного виду організмів, які здатні до вільного схрещування, населяють певну територію і деякою мірою ізольовані від сусідніх популяцій. Спостереження показали, що особини кожної з популяцій будь-якого виду організмів виявляються дуже добре пристосованими до умов зовнішнього середовища тієї природно-кліматичної зони, яку вони заселяють. Таку зону називають **ареалом розповсюдження** популяції.

Найхарактернішою рисою популяцій є їхня постійна спадкова гетерогенність та внутрішня генетична єдність. Така єдність проявляється в здатності особин будь-якої популяції до панміксії в межах своєї сукупності. Здатність до панміксії систематично відновлює високу гетерогенність і генотипову пластичність популяцій у пристосувальному плані.

У просторі і в часі популяція виступає в ролі цілісної генетичної системи, здатної спадково змінюватись у поколіннях, пристосовуючись до певних умов середовища. При цьому будь-які спадкові зміни в генетичній системі популяції можуть розглядатись як елементи еволюційних подій. Отже популяції характеризуються рядом описаних ознак, які надають їм рангу елементарних еволюційних одиниць. Зауважимо, що елементарною еволюційною одиницею не може бути окремий організм, бо з віком він гине. Цю функцію не можуть виконувати лінії, біотики, підвиди або види, оскільки вони не мають ознак, притаманних елементарній еволюційній одиниці.

Отже, популяція – це найменша самовідновлювальна сукупність організмів виду з самостійною генетичною системою, котра заселяє територію певної природно-кліматичної зони, утворюючи на ній свою екологічну нішу.

Видом називають сукупність особин, які подібні за основними морфологічними і функціональними ознаками, каріотипом, реакціями поведінки, мають спільне походження, заселяють певну територію (ареал), схрещуються в природних умовах виключно між собою і при цьому дають плодюче потомство. Належність особин до виду визначається за основними критеріями: морфологічними, фізіологічними, цитогенетичними, екологічними тощо. Найважливішою ознакою виду є повна генетична (репродуктивна) ізоляція, яка полягає в неможливості схрещування особин одного виду з представниками інших видів. Особини будь-якого виду поширені у своєму ареалі не рівномірно, а окремими стійкими скупченнями –

популяціями. Це пояснюється тим, що умови існування у межах ареалу не скрізь рівнозначні і представники будь-якого виду концентруються на ділянках з найбільш сприятливими умовами.

За вивчення генетичної будови та мінливості популяції дуже важливим є поняття **генофонд**. **Генофондом** популяції називається сукупність генів всіх її особин. Мінливість генофонду виражається або частотами генів, або частотами генотипів. За частоту алельного гена приймають відношення його кількості у всіх особин до загальної суми всіх генів, що є в популяції. **Популяційна генетика базується на 3 основних показниках, які характеризують розподіл антигенів, генне представництво, взаємозв'язок антигенів в межах сублокуса і між окремими локусами: частота антигена (фенотип), частота гена (генотип), нерівноважне зчеплення двох генів (Δ).**

Частота фенотипу (антигену) – це його доля (частка) у загальній сукупності особин популяції і характеризує розподіл антигенів в різних популяціях. Визначається шляхом серотипування і обчислюванням % - носіїв певного антигену.

Частота генотипу (гена) – це його доля (частка) у загальній сукупності особин популяції. Вона розраховується на основі частоти фенотипу за формулою:

$$(p+q)^2=1$$

$$\Delta = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+d)(c+d)}{n^2}},$$

і характеризує розподіл в популяції кожного алеля, який детермінує відповідний антиген. Сумарна частота алелей, які знаходяться в одному сублокусі в сумі відповідно за законами генетики повинно складати одиницю.

Нерівноважне зчеплення характеризує відхилення від теоретично обчисленої гаплотипової частоти двох або кількох алелей, двох, або кількох сублокусів; відхилення (Δ) показує наскільки рідше або частіше зустрічається певна комбінація генів на хромосомі у співставленні з теоретично визначеної по формулі $P_1 \times P_2$ (де P – частота алелей).

Популяція, як довготривала одиниця біологічного виду повинна бути стабільною відносно частот генів (алелей). В популяції постійно відбувається передавання генів із покоління в покоління. Тобто, повинні існувати механізми, які підтримують рівноважність генних частот. Такими елементарними механізмами підтримки частот генів в популяції є **закон Харді-Вайнберга** (закон рівноважного стану). Згідно закону Харді-Вайнберга: **в теоретично можливій панміктичній популяції, всі особини якої не зазнають впливу процесів мутагенезу, дії добору та ефектів міграцій і зберігають здатність до вільного розмноження, співвідношення частот домінантних і рецесивних алельних генів залишається незмінним у ряду наступних поколінь при умові панміксії.**

Незважаючи на те, тому що в природі ідеальних популяцій не існує, відкритий для таких популяцій закон має важливе значення в плані наукового пізнання. Згідно з даним законом в достатньо великих популяціях, які не підвладні дії відбору відносно долі генотипів, лишаються постійними із покоління в покоління при умові панміксії. Якщо алелі аутосомного гену (A_1 і A_2) розповсюджені в популяції з частотами p і q (відповідно $p + q = 1$), то частота генотипів в цієї популяції визначається зрівнянням

$$(p + q)^2 = 1,$$

$$\text{або } p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

де p^2 - частота гомозиготного потомства по алелю A_1 ; $2pq$ – частота гетерозигот (A_1, A_2); q^2 – частота гомозиготного потомства по алелю A_2 .

Рівновага генів по одному аутосомному алелю настає через одне покоління і зберігається таким в усіх наступних, якщо немає певних

додаткових втручань, які можуть порушити структуру популяції. Щоб обчислити частоту генотипів для локусів з множинними алелями, можна використати той же підхід $((p + q + r...+s)^2 = 1$.

Зміна частоти генотипу від частоти гену представлено на рис 1.

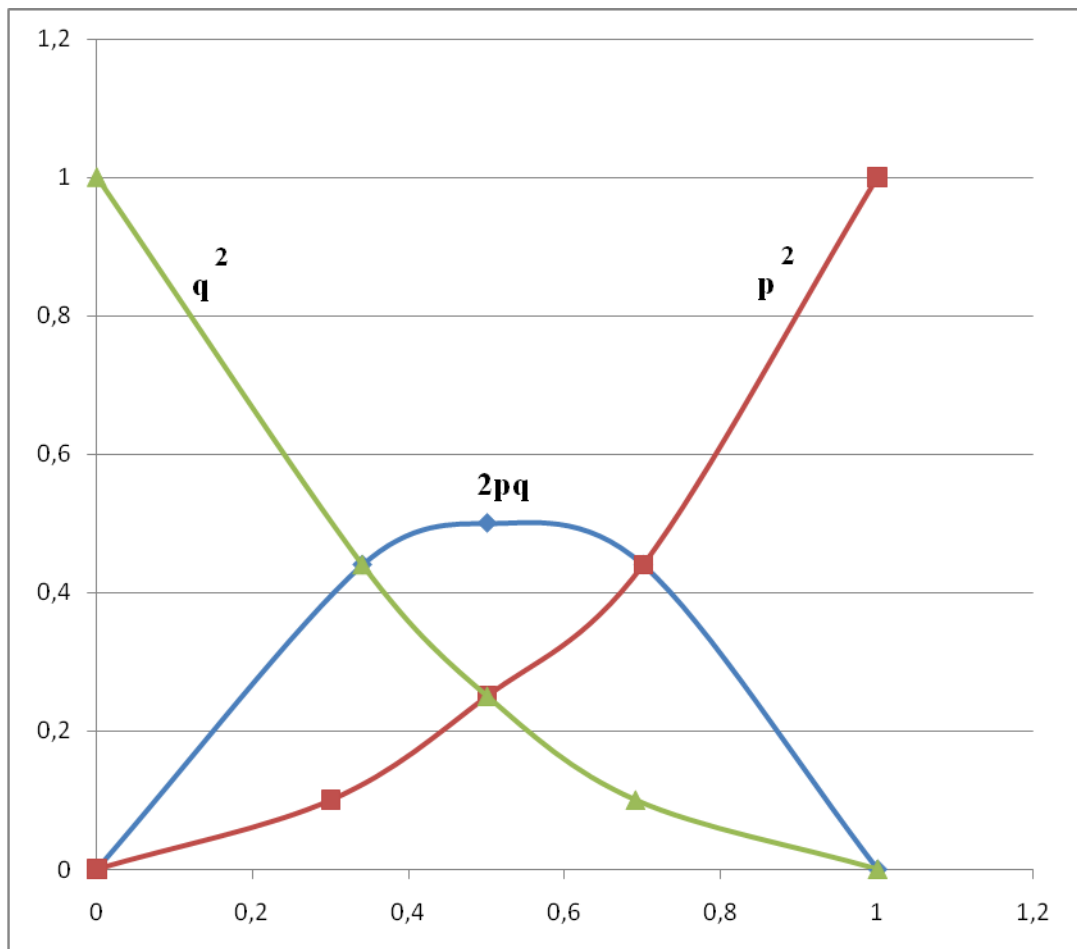


Рисунок 11.1.1 - Відносна частота гомо- (p^2 і q^2) і гетерозиготних ($2pq$) генотипів (по осі ординат) за умов різної частоти одного із алелів (p) по осі абсцис.

Ми бачимо, що частота гетерозиготних індивідів не може перевищувати 50%, томущо, якщо обидва алеля зустрічаються з однаковою

частотою $p = q = 0,5$, то $2pq = 0,5$. Важливо зазначити, що частота гетерозигот не може бути вищою за один тип гомозигот.

Рівноважний стан в популяції виникає не тільки за алелями одного локусу, але і двох і більше. Однак для цього потрібно більша чисельність поколінь. Якщо локуси, які розглядаються, сполучаються вільно, то стан рівноваги набувається порівняно швидко. Якщо ж вони зчеплені (особливо якщо щільно), то даний процес дуже повільний, але в кожному випадку рівновага настає.

Закон Харді-Вайнберга часто використовують для аналізу популяцій з медико-генетичної точки зору. З його допомогою можливо виявити чинники відбору, які діють на популяцію і визначити поширеність патологічного гену і частоту гетерозигот.

За рівнянням закону Харді-Вайнберга легко визначити структуру генотипу певної сукупності організмів за домінантними та рецесивними алельними генами. Наприклад, серед багатьох спадкових хвороб людини є хвороба Менкеса. У хворих на неї сеча має запах кленового сиропу, що це обумовлено порушенням амінокислотного обміну в організмі. У таких хворих уражається функція нервової системи. Хвороба Менкеса успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Вона проявляється у середньому в одного з кожних 50 000 чоловік. З'ясувалось, що за допомогою формули закону Харді-Вайнберга можна визначити структуру генотипів обстеженої сукупності людей з наявністю відповідного мутантного гена. Якщо умовно позначити рецесивний мутантний ген хвороби Менкеса через a , а домінантний алель через A , то, спираючись на формулу Харді-Вайнберга, можна записати:

$$p^2AA + 2PqAa + q^2aa = 1$$

$$\text{або ж } A^2 + 2Aa + a^2 = 1$$

З 50 000 чоловік лише один виявляється гомозиготним за рецесивним a -геном. Тому можна записати: $aa = a^2 = 1/50000$. Звідси

$$a = \sqrt{1/50000} = 1/224.$$

Неважко зрозуміти, що в даній сукупності людей частота нормального, немутантного гена має бути: $A = 1 - 1/224 = 223/224$, а частота гетерозигот – $2Aa = 2 \times 223/224 \times 1/224$. Виконавши відповідні розрахунки, знаходимо, що в обмеженій сукупності людей на гомозиготи за нормальним, домінантним геном припадає 99,109%, на гомозиготи за мутантним геном – 0,002%, на гетерозиготи – 0,889%.

Проведені розрахунки показали, що частота особин, які хворіють на синдром Менкеса досить незначна, всього 0,002 %. Але частота гетерозигот 0,89% є істотною, а отже, нею не можна нехтувати. Описаним способом можна обрахувати структуру генотипів обстеженої сукупності організмів виду за вмістом гомозигот та гетерозигот за будь-якою парою алельних генів. Знаючи частоту гетерозигот по певному аутосомному гену, дослідник може прогнозувати ймовірність шлюбних зустрічей та народження гомозиготних за мутантним геном нащадків.

За формулою Харді-Вайнберга можна розрахувати частоту гена не тільки для двох, але і для більш алелей. Наприклад, для обчислення частоти алелей по групам крові АВО можна користуватись формулами:

$$r = \sqrt{0}; \quad p = \sqrt{0+A} - \sqrt{0}; \quad q = \sqrt{0+B} - \sqrt{0},$$

Коли історія популяції свідчить про рандомизовану структуру шлюбів протягом кількох поколінь (рівнозначно можливого укладання шлюбів будь-яких індивідів різної статі із репродуктивної частини популяції), то відхилення розподілення генотипів від рівняння $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ може свідчити про суттєву дію відбору в популяції.

Природні популяції організмів у своїй переважній більшості генетично гетерогенні, тобто складаються з особин з різними генотипами. Ця генетична неоднорідність популяцій в першу чергу пояснюється явищем існуючого в них множинного алелізму і постійним виникненням нових (здебільшого рецесивних) алелей генів у мутаційному процесі. Саме мутації є

первинним джерелом фенотипової мінливості організмів. Слід відмітити, що мутаційний процес діє на кожен популяцію незалежно від способу розмноження її особин. Показником генетичної мінливості може слугувати середня частота особин, гетерозиготних по певних локусах, тобто **гетерозиготність (H)** популяції. Цю величину вираховують відношенням гетерозигот до загальної кількості досліджених генотипів. Спершу визначають частоти особин, гетерозиготних по кожному локусу, а потім вираховують середнє арифметичне, яке приймають за середню гетерозиготність популяції. Як правило, гетерозиготність призводить до кращої життєздатності особин.

Поліморфність (P) популяції – це доля поліморфних (з алельними варіантами) генних локусів із числа всіх досліджених.

До факторів динаміки популяцій належать: добір, мутаційний процес, порушення панміксії, ізоляція, дрейф генів. Спонтанний мутаційний процес відбувається безперервно; мутації торкаються всіх ознак організмів. Нагромадження мутантних алелей створює комбінативну мінливість, яка призводить до генетичної гетерогенності (генетичного поліморфізму) природних популяцій. Отже мутаційний процес служить систематичним постачальником елементарного еволюційного матеріалу. Якби популяція завжди зберігала сувору рівновагу генів та їхня частота не змінювалась, то еволюція була би неможливою. Але в реальності діють численні чинники, які порушують рівновагу генів в популяції.

Міграція і мутаційний процес викликають **первинні зміни** генетичної структури популяції. Інші чинники – **інбридинг, дрейф генів, еміграція і відбір** відносяться до **вторинних процесів**, оскільки вони не спричиняють появу нових алелей.

Найголовніший фактор еволюції – природний добір. **Природним добром** називають процес виживання тих організмів, які завдяки особливостям їх генотипів найбільш пристосовані до навколишніх умов і

залишають найбільшу кількість нащадків. Іншими словами, природний добір – це диференційоване відтворення різних варіантів генотипів до даних умов. В процесі природного добору організми пристосовуються до умов середовища. **Штучний добір** відрізняється від природного тим, що він здійснюється людиною на її розсуд з метою отримання нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Природний добір відбувається в природних умовах під впливом факторів середовища, але без цілеспрямованого втручання людини.

Якщо розглядати окремий таксономічний вид, то між його популяціями **панміксія**, або вільне схрещування, пригнічується механізмами ізоляції. Але оскільки частоти мутування генів і напрямки природного добору в різних популяціях не збігаються, то й за генетичною конституцією кожна з них відрізняється від усіх інших.

Розрізняють три основні форми природного добору: рушійний, стабілізуючий і дизруптивний (дивергентний).

Рушійний добір може відбуватися у двох напрямках: у бік збільшення або зменшення показників ознаки. **Стабілізуючий добір** спрямований на закріплення тієї вузької норми реакції, яка виявилася оптимальною при даних умовах існування. У людських популяціях інтенсивно діє стабілізуючий добір на ранніх стадіях ембріонального розвитку, усуваючи багато шкідливих мутацій.

Дизруптивний добір призводить до розпадання (дивергенції) попередньої форми і формування не однієї, а двох або більше різних норм реакції. Класичним прикладом цієї форми добору є поява на океанічних островах комах безкрилих або з дуже добре розвиненими крилами.

Будь-які форми добору призводять до адаптації, тобто відповідності будови, функцій, поведінки живих організмів середовищу існування. Нові адаптивні пристосування часто зумовлені наявністю структур, які раніше

виконували інші функції. Наявність таких структур, які розширюють або змінюють свої функції, називають преадаптацією.

Розрізняють адаптації пасивні і активні. До перших відносяться - інтенсивне розмноження, захисне і попереджувальне забарвлення тощо. До других – розвиток нервової системи та органів чуттів, органів руху тощо.

Географічно розділені групи популяцій іноді називають **расами**. Вони визначаються як популяції одного і того ж виду, дещо відмінні у генетичному відношенні. Відмінності між расами відносяться до генофонду в цілому, отже складаються зі змін частот алелів по багатьох локусах.

Міграція або потік генів – це переміщення особин з одної популяції до іншої з наступною участю їх у процесах розмноження. Міграції можуть бути активними і пасивними (наприклад, перенос насіння вітром або птахами). Іноді людина навмисно частково змішує популяції для отримання цінних гібридних форм. Зміни генетичного складу в популяціях з яких населення емігрувало і в які воно іммігрувало можна проілюструвати зміною частот генів системи АВО зі Сходу на Захід (від високої до низької частоти гену В і від низької до високої частоти гену А). Такий градієнт пояснюється значними міграціями з азіатського Сходу у період від 500 до 1500 років н.е. Іншим прикладом може бути висока частота R₀-алелю за резус-фактором у корінних жителів Африки. Обстеження негроїдного населення США за частотою алелей генів системи резус свідчило, що 30% від їх генофонду складають гени, які притаманні білому населенню країни. Міграція населення і порушення кордонів системи шлюбів призвело до гетерозиготизації населення.

Вся різноманітність людства обумовлена явищем мінливості, в якому відрізняють спадковий і не спадковий компоненти. Як відомо **мутаційним процесом** називається процес зміни спадкових структур. Як явище його класифікують за багатьма аспектами: за змінами фенотипу; за змінами генотипу; за локалізацією в клітині, за типом клітин, в яких мутація виникла;

за причинами виникнення мутації (спонтанна, індукована). Інтенсивність мутаційного процесу на рівні популяції пов'язана з частотою мутацій не в окремому гені, а в багатьох локусах.

Механізми ізоляції бувають досить різноманітними. Наприклад, **біологічні форми ізоляції** обумовлені мутаціями генів, які обмежують можливості панміксії. Це мутації, які зміщують терміни дозрівання пилку відносно зародкових мішків; мутації гаметофітної несумісності, за якої пилок втрачає здатність проростати пилковими трубками в тканинах маточки; мутації несумісності гамет; нездатність утворених гібридів до відтворення власних нащадків тощо. Крім того, існує **територіально-географічна, або просторова, ізоляція**, за якої популяції виду роз'єднанні, скажімо, гірськими хребтами, водними перепонами тощо. Ізоляція може здійснюватись також за допомогою часу.

Отже, ізоляція є першопричиною різних напрямків генетичного розвитку популяцій, їхньої дивергенції (розходження ознак у організмів однієї систематичної групи в процесі еволюції). Саме дивергенція в популяціях приводить до виникнення нових видів.

Репродуктивна ізоляція популяцій обумовлена як територіально так і соціально. Основним результатом її дії є обмеження численності популяції. Зростає також ступінь спорідненості партнерів, які укладають шлюб, тобто має місце **інбридинг** і набуває значущості ще один фактор генотипової структури – **дрейф генів**, який спричиняє випадкові коливання концентрації окремих алелей (втрата одних і підвищення частоти інших).

Дрейфом генів (або просто дрейфом) називається абсолютно випадковий генетично-автоматичний процес, за якого частота того чи іншого алельного гена в популяції різко зменшується або, навпаки, дуже зростає. Якщо дрейф йде на користь алеля, що зменшує пристосованість особин, то популяція за рахунок негативного добору може зменшуватись аж до повного вимирання. Проте інколи за рахунок дрейфу генів виникають особини, які

відрізняються від інших високою пристосованістю до навколишніх умов та деякими іншими властивостями. Такі особини, на думку деяких авторів, можуть еволюціонувати у нові різновидності і навіть види.

Мірою гомозиготизації (або інбредності) окремої особини слугує **коефіцієнт інбридингу (F)**, який вказує на ймовірність знаходження у даному локусі двох ідентичних за походженнями алелів, тобто двох точних копій одного з генів, що знаходився у генотипі одного з прабатьків цієї особини.

Все описане вище дає підстави вважати, що популяції є функціональними еволюційними одиницями.

Важливим мірилом інтенсивності природного добору є різниця пристосованості порівнювальних генотипів або так званий коефіцієнт добору (S). Він визначає швидкість зменшення у популяції того чи іншого генотипу і вираховується за формулою: $S = 1 - W$, де W - пристосованість.

Інбридинг – близькоспоріднене схрещування організмів, які мають спільних предків. Спільність походження схрещуваних організмів збільшує ймовірність наявності у них одних і тих же алелів будь-яких генів. **Аутбридинг** - схрещування неспоріднених між собою організмів.

11.2 Популяційна генетика антигенів (алельних генів) генетичних систем крові людини

Популяційна генетика тканинних антигенів є невід'ємним розділом класичної імуногенетики і обов'язково обговорюється на всіх міжнародних уоркшопах. Вже до 1980 року були обстежені і обговорені всі основні етнографічні групи (раси) земної кулі і встановлено, що існують певні імуногенетичні маркери, які характеризують як людство в цілому, так і окремі людські раси. Теорії, які намагаються пояснити причини нерівномірного розподілу генетичних маркерів серед різних народів світу, як

один із можливих механізмів розглядають вибіркову толерантність або чутливість конкретного індивіду в популяції до інфекційних захворювань в залежності від носійства певного фенотипу/генотипу. Звідси і велика зацікавленість дослідників всього світу у вивченні асоціативного зв'язку певних імуногенетичних маркерів з патологічним процесом на рівні всієї біологічної системи організму і на рівні окремих систем, зокрема імунного гомеостазу, як можливого патогенетичного субстрату формування патології поширеної в популяції.

Основні положення популяційної імуногенетики:

- Антигени (алельні гени) генетичних систем крові людини є загальними для основних популяцій земної кулі.
- Існують особливості в розподілі генетичних структур крові в різних популяціях, при яких певні антигени (гени) мають високе поширення в окремих расах, тоді як в інших расах ті ж самі антигени (гени) мають лише слідові кількості, або відсутні зовсім.
- Антигени (гени), які представлені в усіх расах, мають різну фенотипову частоту поширеності, що характеризує генетичну структуру кожної конкретної популяції (етнічної групи).

Тобто, на сьогодні визначені антигенні специфічності, які маркують певні расові групи. Наприклад, для антигенів гістосумісності системи HLA вважається, що специфічності A1 і B8 – зустрічаються практично тільки у кавказоїдів; Bw42 і Dw58 – тільки у негроїдів; Bw52 і Bw54 – тільки у орієнтів.

Таблиця 11.2.1 - Особливості розподілу HLA антигенів в основних етнічних групах Землі (адаптовано по матеріалам Ю.М.Зарецької)

Антигенна			
Специфічність	кавказоїди	негри	орієнти
A1	0,077	сліди	-
A24	0,088	-	0,366
Aw30	0,025	0,154	сліди
B8	0,085	сліди	-
Bw52	„	сліди	0,119
Bw54	-	-	0,074
Bw58	сліди	0,118	сліди
B40	0,056	сліди	0,161
Cw2	0,050	0,120	сліди
Cw6	0,080	0,094	„
DR3	0,112	0,173	„
DR7	0,126	0,098	„
DR9	сліди	сліди	0,133

Таблиця 11.2.2 - Найбільш поширені гаплотипи HLA-A I HLA-B

Гаплотип	гч на 1000 осіб	Δ
Європейські кавказоїди		
A1-B8	64,1	57,2
A1-B17	22,4	16,0
A2-B12	27,2	14,1
A3-B7	28,3	18,5
A23-B12	19,3	17,6
A11-B35	15,3	12,1

A29-B12	33,1	27,3
A30-B13	17,0	16,6
Північно-американські кавказоїди		
A1-B8	67,9	59,2
A1-B17	18,0	12,2
A2-B21	21,8	13,7
A2-B40	42,2	21,5
A3-B7	38,0	27,6
A3-B35	22,8	13,8
японці		
A9 –B7	55,1	34,9
A10-B35	25, 8	16, 6
A33-B12	11, 5	11, 5

Особливістю популяційного розподілення HLA- антигенів є нерівномірність їх гаплотипових асоціацій, яка пов'язана саме з високим поліморфізмом цієї системи. Тобто, певні гаплотипи в популяціях зустрічаються частіше ніж це витікає з теоретично розрахованих результатів (гч). Так, наприклад, для європейських і американських кавказоїдів найбільш характерними є гаплотипи A1-B8 і A3-B7, які зустрічаються майже з рівною частотою, тоді як у японців найбільш поширеним є гаплотип A9 –B7. Відносно гаплотипових сполучень антигенів локусів HLA-DR і HLA- B встановлено, що в усіх світових популяціях антиген DR3 асоційований з антигеном B8, тоді як антиген DR2 асоційований з B7 у кавказоїдів і американських негрів.

Порівняльна характеристика даних по розподілу HLA гаплотипів серед населення Західної і східної Європи, показала, що для європейської популяції

характерними є гаплотипи HLA–A1, B8; HLA–A2, B12; HLA–A3, B7; HLA–DR1, 35; HLA–DR2, 7; HLA–DR3, B8; (Maskintosh P., et all, 1980, Hansen H.E., et all, 1981 та інші. Для білоруської популяції (Семенов Г.В. 1989 р.) характерними є гаплотипічні сполучення HLA–A3, B7; HLA–A2, B12; HLA–A2, B16; і тільки на п'ятій позиції знаходиться HLA–A1, B8. В російській популяції (Зарецкая Ю.М. 1985, Шабалин В.Н. 1988 р.) найбільш характерними виявилися гаплотипи HLA–A1, B8 і HLA–A3, B7.

Внаслідок міграції різних народів та історичної дисоціації окреслились певні особливості в нерівноважному зчепленні антигенів гістосумісності не тільки між расами, але і в межах конкретних рас. Достатнім прикладом є той факт, що тільки в Україні окреслено п'ять геноеографічних зон: **Центрально-Українська, Деснянська, Поліська, Південно-Східна, Карпатська.** Тобто навіть в межах однієї держави ми можемо спостерігати нерівномірне поширення імуногенетичних маркерів лейкоцитарних та еритроцитарних антигенних систем крові .

Дослідницькими роботами українських вчених було показано, що в українській популяції найчастіше зустрічаються гаплотипи HLA–A2, B7; HLA–A2, B5; HLA–A9, B7; A3, B5, а гаплотип HLA–A1, B8 займає тільки п'яту позицію у цьому розподілі, що співвідноситься з поширенням останнього в білоруській популяції .

Співставлення розподілу ізольованих HLA-серотипів і фенотипових і гаплотипових сполучень антигенів навіть у різних геноеографічних зонах України свідчить про певні відмінності, що необхідно враховувати при вивченні асоціативного зв'язку імуногенетичних чинників з будь яким патологічним станом. Саме розбіжності в популяційному поширенні часто є причиною неспівпадань маркерів асоційованих з захворюванням в різних дослідницьких групах. В наш час, коли світові міграційні процеси в популяціях є вкрай поширеними, при дослідженні імуногенетичних структур як маркерів ризику формування захворювань, виникає

необхідність формування контрольної популяції в кожному конкретному випадку.

Прикладом може слугувати порівняльний аналіз поширеності певних антигенів у різних геногеографічних регіонах. Так, для Південно-Східної геногеографічної зони найпоширенішими антигенами HLA локусу В являються HLA-B7; HLA-B12; HLA-B5; HLA-B8; HLA-B35; HLA-B18; HLA-B16; HLA-B13 та HLA-B27 частота зустрічаємості яких складає відповідно 22,0%; 16,5%; 15,1%; 13,8%; 12,3%; 11,35%; 11,4%; 11,2% і 10,2%. (Ходаковський) Сума частоти генів вище перелічених антигенів складає 0,642, Наведені дані по ряду показників (HLA-B7; HLA-B8; HLA-B12; HLA-B35) майже співпадають з даними по Центрально-Українській геногеографічній зоні, а по деяким (HLA-B5; HLA-B13; HLA-B27) частота зустрічаємості значно менша, що в результаті дає суму частоти гена 0,790.

В локусі C_w специфічність HLA-C_w 4 складає 28,1%; HLA-C_w 6 - 21,3%; HLA-C_w 2 - 19,4%. Сумарна частота генів складає 0,369. Серед населення Центрально-Української геногеографічної зони ця сума дорівнює 0,373, тобто різниця несуттєва. Але антиген C_w 7, який майже не зустрічається серед населення центральної частини України, у мешканців Південно-Східної геногеографічної зони є досить поширеним (16,0%), а антиген C_w 1 зустрічається рідко – 5,2%, що найбільш близько до болгарської популяції.

За поширеністю антигени HLA DR у населення Південно-Східної України розподілені у наступному порядку: HLA-DR-(230,1%); HLA-DR-7(21,6%); HLA-DR_w52 (16,8%) на відміну від Центральної України, де найчастіше зустрічається антиген HLA-DR-1.

Характеристика генетичної структури конкретної популяції не може бути повною без визначення розподілу гаплотипів з урахуванням гаметної асоціації. Встановлено, що до першої п'ятірки гаплотипів за частотою зустрічаємості, належать HLA-A2, B7; HLA-A1, B8; HLA-A2, B5; HLA-A3,

B7; HLA–A2, B40;(відповідно Н дорівнює – 9,89; 8,04; 7,96; 7,73 та 6,11). За поширеністю гаплотипів HLA–A2, B7 та HLA–A2, B5 спостерігається співпадіння з російською популяцією, а посідання другого місця HLA–A1, B8 свідчить про належність популяції до європеїдів.

Серед гаплотипічних сполучень антигенів локусів А, В та С з антигенами локусу DR, з урахуванням величини гаметної асоціації Δ , яка мала позитивне значення, найчастіше зустрічається: HLA–A2, DR1 (11,76%); гаплотипи HLA–A2, DR7; HLA–A9, DR 2 зустрічаються з однаковою частотою (10,08 %); як і з частотою 8,40 % представлені в популяції HLA–A 10, DR2; HLA–A9, DR7; HLA–A1, DR52. В той же час, навіть негативна величина гаметної асоціації не змогла значно знизити кількість носіїв гаплотипів HLA–B5, DR4; HLA–B7, DR4; HLA–B5, DR 2, які займають другу позицію (5,04%) після HLA–B7, DR3 та HLA–B8, DR1 (7,56%). Найчастішим гаплотипом цього локусу є HLA–C_w 6, DR2 (7,56%).

Таким чином, дані, відносно HLA генетичної структури населення різних геногеографічних регіонів України у значній мірі співпадають з даними, отриманими дослідниками з Росії, Білорусі та Болгарії, що вказує на генетичне співвідношення представників української популяції до Європейської, точніше слов'янської популяції європеїдів. Представлені вище дані відносно закономірностей розподілу поліморфних генетичних структур крові ГКГС є правомірні і для інших еритроцитарних і сироваткових систем крові: ABO; Rh-Hr; MNSs; Kell; Daffy; Kidd; Gc; Tf; Gm; та інш. Так, розглядаючи систему ABO, можна простежити досить нерівномірне розповсюдження антигенів. Наприклад, у індіців Аргентини відсутній антиген В, рідко зустрічається антиген А, тоді як у переважна більшість населення має фенотип О. Полінезійці, навпаки мають переважний фенотип А (60%). Відсутній антиген В у ескімосів. У панміктичній європейській популяції переважно зустрічається антиген А. При порівняння

частоти зустрічаємості груп крові серед слов'янських популяцій європейців маємо дуже близькі дані.

	група крові			
	0	A	B	AB
росіяни	33,5	38,8	20,5	8,1
українці	36,4	38,4	21,6	5,82
білоруси	38,22	37,07	18,53	6,18

Подібна закономірність простежується і для поширення антигенів інших еритроцитарних систем крові. Само поширення у великій мірі залежить від панміктичності популяції і міграційних процесів.

Дискутабельним залишається питання відносно розбіжностей в поширенні певних антигенів у дітей і дорослого населення. Так, за даними одних дослідників існують вірогідні популяційні відмінності в поширеності певних антигенів в дитячому віці. Роботи останніх років відносно генетичної структури дитячого і дорослого населення представляють протилежні висновки. На основі цих останніх даних виникає можливість використовувати в якості контрольної групи популяцію дорослих при дослідженні дитячої когорти. Однозначно вирішити це питання на сьогоднішній день є не можливим, оскільки переконливих причин перерозподілу в популяції певних специфічностей HLA антигенів в залежності від віку у світовій літературі не висвітлено, не знайдено безумовних імуногенетичних маркерів даної системи, які були б

безпосередньо пов'язані з селективною елімінацією осіб ще в дитячому віці. Але безумовним є факт необхідності при вивченні асоціативного зв'язку HLA антигенів і конкретних захворювань формування контрольної (опозитної) групи в кожному випадку. На необхідність формування контрольної групи при імуногенетичних дослідженнях в даному аспекті вказує також сучасний стан популяційних міграцій населення у зв'язку з екологічними катастрофами, що призводить до динамічної зміни генетичної структури населення окремих регіонів.

Слід також зазначити, що новий рівень біотехнологій ідентифікації імуногенетичних специфічностей на рівні геномної ДНК, коли ми можемо визначати саме генотип індивіду, також вносить певні корективи у напрямок популяційних досліджень.

Молекулярно-генетичні дослідження розподілу алелей HLA в різних популяціях підтвердили наявність і розширили уяву про механізм формування міжрасових і міжетнічних відмінностей, оскільки нові методи дозволяють визначити більш 2000 алельних варіантів генів, тої як визначення серотипів продуктів генів HLA — антигенів, дозволяє ідентифікувати близько 200 специфічностей. Слід також зазначити, що генотипування дозволяє значно наблизитись до розуміння генетично обумовленої резистентності, або чутливості до впливу ендогенних чинників у навколишньому середовищі, а також до характеристики поширення деяких хвороб на рівні популяції. Прикладом можуть слугувати дані, представлені російськими вченими (Хаитов,2001,...) при дослідженні поширеності алельних варіантів гену HLA DRB 1*04 в 7 популяційних групах Росії. Вибір для аналізу варіантів саме цього гену обумовлено встановленим фактом асоціативного зв'язку окремих алелей (HLA DRB 1*0401, HLA DRB1*0404 и HLA DRB1*0405) з аутоімунним захворюванням - інсулінзалежним цукровим діабетом (ІЗЦД). В той же час з HLA DRB 1*0403 асоційована толерантність до захворювання. Досліджувались популяції росіян, поморів,

саамів, татар, марі, тувінців, ненців. Встановлено, що в усіх популяціях, за виключенням ненців, присутня висока частота алеля HLA DRB 1*0401 (3,80; 16,21; 9,14; 5,61; 12,65; 12,13; відповідно), але популяціях саами, тувінці, ненці, на відміну від інших популяцій присутня висока частота алеля-протектора (8,38, 5,35 и 7,16 відповідно). Саме в цих популяціях практично відсутня захворюванність ІЗЦД. Це свідчить про те, що проєктивний ефект є превалюючим по відношенню до ефекту схильності. Аналогічні дані відносно функціональної взаємодії HLA алелей і ізольованих антигенних специфічностей на рівні антагонізму (конкурентної взаємодії) і синергізму (підсилюючої дії) отримано при дослідженні генетичної детермінованості індивідуальної радіочутливості організму людини (ми).

Спостерігався перерозподіл значень коефіцієнта асоціації RR в залежності від сполучень антигенів.

Найбільш виражені синергічні взаємовідносини характерні для сполучень антигенів HLA-A1,28; HLA-A10,28; HLA-A1,10; HLA-B8,w16; HLA-A10,B13; HLA-A10,B38, HLA-DR3,4, коли значно підвищується коефіцієнт асоціації RR; - антагоністичні – для сполучень антигенів HLA-A10,B16; HLA-A1,B16; HLA-A1,B16; HLA-B16,21; HLA-B13,DQ1; HLA-B16,DR3, коли, або значно знижується чисельні значення коефіцієнта, або при достатньо високому RR губиться ступінь вірогідності. При цьому в синергічні і антогоністичні взаємовідносини можуть вступати антигени, які ізольовано вірогідно асоційовані з підвищеною радіочутливістю організму. Ці дані мають суттєве значення при оцінці індивідуального і популяційного ризику реалізації певних патологічних станів, причинно пов'язаних з впливом негативних екологічних чинників, в даному випадку радіаційного.

Проведені дослідження генетичної структури популяції Центрально-Української геногеографічної зони свідчить про поширення маркерів радіочутливості у 33% населення, що дозволяє віднести цих індивідів до

потенціальної групи ризику формування пострадіаційних ефектів в умовах опромінення і прогнозувати можливі наслідки для популяції в цілому.

Таким чином, всі наведені вище дані свідчать про те, що поліморфізм імуногенетичних структур крові є характерним для кожної конкретної групи населення і суттєво впливає на біологічну стабільність популяції в цілому, оскільки є одним із провідних механізмів варіабельності еволюційного природного відбору людини як виду.

РОЗВ'ЯЗАННЯ ЗАДАЧ

Задача № 1

Популяція складається з 80% особин з генотипом AA і 20% з генотипом aa. Визначте у долях одиниці частоти генотипів AA, Aa і aa після встановлення рівноваги у популяції.

Розв'язок. Частота (p) алеля A=0,8, а частота (q) алеля a=0,2. У відповідності до закону Харді-Вайнберга у популяції встановиться наступне співвідношення генотипів:

$$0,64AA+0,32Aa+0,04aa.$$

Отже, частота (p^2) генотипу AA=0,64, або 64 %, частота ($2pq$) генотипу Aa=0,32, або 32%, частота (q^2) генотипу aa=0,04, або 4%.

Задача № 2

У популяції 16% особин мають групу крові N. Передбачаючи панміксію, визначте: який процент особин, що мають групи крові M і MN можна очікувати.

Розв'язок. Частота людей з групами крові N є частотою гомозигот $NN=p^2=0,16$ (16%). Звідки p, тобто частота гена N в популяції, дорівнює

$\sqrt{p^2}=0,4$. Тоді частота гена М в популяції дорівнює $1-0,4=0,6$. Звідси частота генотипу MN за формулою ХардіВайнберга дорівнює $2pq=2\times 0,4\times 0,6=0,48$, частота генотипу MM – $0,36 (q^2)$.

Для самостійного розв'язку

Задача № 1

Під час визначення MN груп крові у популяції корінного населення Австралії з 2800 досліджених 82 людини мали антиген М і 840 чоловік – обидва антигени М і N. Розрахуйте частоту цих генотипів у популяції, виражаючи її у долях одиниці.

Задача № 2

З 27 312 дітей, які народилися у місті Р, у 32 дитини виявлений патологічна рецесивна ознака r (генотип rr). Визначте частоту генотипу rr серед новонароджених, виражаючи її десятковою дріб'ю, і встановіть, на яке число новонароджених припадає одна дитина з таким генотипом.

Задача № 3

У популяції ймовірність захворювання становить 1 на 400 чоловік. Визначте число носіїв мутантного алеля.

Питання для самоконтролю

8. Що означає термін “популяційна генетика”?
9. Дайте визначення термінам “популяція” і “вид”.
- 10.Що називають “генофондом популяції”?

11. Сформулюйте закон Харді-Вайнберга.
12. Розкажіть про природний добір та його форми.
13. Дайте визначення термінам “панміксія”, “інбридинг”, “аутбридинг” і “дрейф генів”.
14. Розкажіть про молекулярно-генетичні дослідження розподілу алелей HLA в різних популяціях.
15. Назвіть основні положення популяційної імуногенетики.
16. Чим відрізняється “потік генів” від “дрейфу генів”?
17. Яка роль ізоляції в популяції?

Література:

32. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. – 2001, №3. – с. 4-12.
33. Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.
34. Мінченко Ж.М. Генетичні системи крові людини при радіаційному опроміненні: Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук.: - К., 1994. - 32 с.
35. Распределение фенотипов гаптоглобина среди населения Украины / Никольченко А.Ю., Омельченко Е.И., Гулевский А.К. и др. // Цитология и генетика . - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 62 - 69.
36. Раутиан Г.С., Мироненко В.Р., Калабушкин Б.А. Изучение распределения генотипов гаптоглобина в популяциях человека. // Генетика. -- Т.24. –N12. – 1988. –с.2226-2232.
37. Распределение фенотипов гаптоглобина среди населения Украины / Никольченко А.Ю., Омельченко Е.И., Гулевский А.К. и др. // Цитология и генетика . - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 62 – 69.
38. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. - И

- Здоров'я, 1989. - 200 с.
39. Тимошенко Л.И., Лавровская Л.Н. Распределение эритроцитарных антигенов и белковых фракторов крови среди населения некоторых гено-географических зон Украинской ССР // Цитология и генетика . - 1978. - Т. 12. - № 6. - С. 535 – 540.
40. Данилова Е.И. Гематологическая типология и вопросы этногенеза украинского народа. - Киев, 1971. - 123 С.
41. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ.. – М.: Мир, 1990. – 336 с.
42. Павлюк Р.П., Гордиенко А.І., Крицапа Є.М. Генетичний поліморфізм антигенів гістосумісності у мешканців м.Києва // II з'їзд мед. генетиків України, Львів, 18-20.10.1995 (матеріали), Львів, 1995. – С.112.

РОЗДІЛ XII

Математичні основи імуногенетичного аналізу.

Клінічна імуногенетика як дисципліна не може повноцінно функціонувати без інструменту математичного аналізу, який би дав змогу проаналізувати і оцінити внесок імуногенетичної компоненти в формування генетичної структури конкретної популяції, оцінки ефективності алогенних трансплантацій і визначити асоціативний зв'язок НЛА з певними захворюваннями.

З позицій успадкування алелей комплексу гістосумісності людська популяція вважається панміктичною і є підлеглою закону Харді-Вайнберга, який представлений формулою успадкування для системи з двома ознаками:

$$P^2 + 2pq + q^2 = 1.$$

Дана формула відображає кількість гомо- і гетерозиготних за відповідним геном індивідів у вибірці.

Частота антигену розраховується як відсоткове співвідношення індивідів, які несуть антиген відносно загальної кількості обстежених, а частота гену також розраховується за вищенаведеною формулою після її реформування:

$$p_x^2 + 2p_x(1 - p_x) + (1 - p_x)^2 = 1;$$

Але, зважаючи на те, що

$$p_x^2 + 2p_x(1 - p_x) = A_x,$$

$$1 - p_x = \sqrt{1 - A_x} \quad \text{і} \quad p_x = 1 - \sqrt{1 - A_x},$$

де p_x є частотою гена, а A_x - антигену.

Обчислена за формулою частота гену повинна бути перевірена шляхом порівняння *спостерігаємого* у вибірці розподілення гомо- і гетерозиготних

індивідів з *теоретично обчисленим* у відповідності з формулою рівноваги Харді - Вайнберга. Формули, за якими проводиться теоретичний розрахунок і сама схема математичного аналізу у відповідній вибірці наведена у таблиці.

Таблиця 12.1 - Схема перевірки частоти гена

Позначення фенотипу	Генотип	Теоретично очікуване
P	PP, PB	$N(p^2 + 2PB)$
Q	QQ, QB	$N(Q^2 + 2QB)$
PQ	PQ	$N 2PQ$
V(blank) *	BB	$N B^2$

Примітка: N- число індивідів у вибірці; B – пустий алель, який може виникнути при серотипуванні внаслідок обмеженості тест-панелі за специфічностями. При генотипуванні дана проблема не виникає.

Важливим елементом популяційного аналізу є **гаметна асоціація**, яка враховує різницю в теоретично розрахованій асоціації між двома антигенами різних локусів і істиною асоціацією, визначеної в популяції. Необхідність введення даного показника базується на наступних розсудах: якщо би алелі локусів A і B були поширеними незалежно один від одного, частота їх асоціації на хромосомі (гаплотип) визначалась би за формулою $P_1 \times P_2$ де P_1 і P_2 є частотами відповідних генів. Але в популяції сполучення окремих алелей зустрічається частіше, або, навпаки, є менш поширеними ніж це обчислено за теоретичним розрахунком, тобто дані гени знаходяться в стані **нерівноважного зчеплення (linkage disequilibrium)**, яке вимірюється величиною Δ , яка відображає перевищення або дефіцит гаплотипу в популяції у порівнянні з результатом помноження частот двох генів. Величина Δ розраховується по „сітці” 2×2 за формулою P.Mattius (1970):

$$\Delta = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+d)(c+d)}{n^2}},$$

де n – число обстежених у вибірці; b – число індивідів, які несуть A і не мають B ; c – число індивідів, які не мають ні A ні B . Наведена формула є складовою частиною формули, яка використовується для обчислення частоти гаплотипу в панміктичній популяції:

$$P_{AB} = (P_A \times P_B) + \Delta_{AB},$$

Де P_A і P_B – частотами відповідних генів; Δ_{AB} – гаметна асоціація між генами A і B .

Обчислення асоціативних зв'язків між HLA і захворюваннями.

З розвитком наукового напрямку *HLA* і захворювання в клінічній імуногенетиці були розроблені спеціальні математичні методи розрахунків, які враховували певні правила популяційно-генетичного аналізу.

Ці математичні підходи виявлення асоціативного зв'язку з захворюванням базуються на застосування статистичних методів обчислення і мають за мету формування системи генетичних маркерів захворювання. Для визначення генетичних маркерів методами класичної імуногенетики, як правило, вирішують два завдання:

- визначення різниці між частотою носіїв конкретного антигену або комплексу (сукупності антигенів) у хворих і здорових осіб, а також статистичної значимості цієї різниці.
- Визначення сили асоціації між антигеном або комплексом антигенів з захворюванням.
- Різниця частот обчислюється за реальними вибірками даних і значимість відмінностей частот вимагає підтвердження для чого використовують статистичний критерій (χ -квадрат).

$$\chi^2 = \frac{N(ad - bc)^2}{(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)}; \quad N = a + b + c + d.$$

Наприклад: У виборці 44 хворих, антиген В13 визначено у 12 осіб; в контрольній групі здорових осіб даний антиген присутній у 3 з 89 осіб, тоді згідно формулі:

$$\chi^2 = \frac{133 \times [(12 \times 86) - (3 \times 32)]^2}{15 \times 44 \times 89 \times 118} = 16,66$$

Визначення достовірності різниці і достовірності спостережимої асоціації проводять за таблицями χ^2 з урахуванням одного ступеню свободи.

- Для визначення саме сили асоціації використовують коефіцієнт відносного ризику (**RR**), біологічний сенс якого – ризик розвитку захворювання у носіїв антигену в порівнянні з індивідами, які не несуть даний антиген:

$$R = \frac{f_n(1 - f_n)}{f_k(1 - f_n)};$$

Де f_n - фракція носіїв антигену серед пацієнтів; f_k - фракція носіїв антигену в контрольній групі.

На основі даних наведеного вище клінічного прикладу, отримуємо:

$$R = \frac{0,273(1 - 0,034)}{0,034(1 - 0,273)} = 10,676.;$$

В даному випадку f_n і f_k мають бути представлені у вигляді десятинних дробів або відсотків.

Величина RR, яка дорівнює 1, свідчить про відсутність асоціації, тобто про однакову частоту зустрічальності антигена у хворих і здорових

осіб. Величина $R \geq 1$ свідчить про позитивну асоціацію з захворюванням, $R \leq 1$ - про негативну, тобто про зниження частоти зустрічальності антигену в дослідженій популяції.

Генетичними маркерами захворювання вважаються ті антигени (або сукупність антигенів), HLA-комплексу, які статистично значимо асоційовані з захворюванням. Відповідно можна говорити і про генетичні маркери стійкості організму до захворювання, в таких випадках вважають, що генетичні маркери мають протекторні функції.

Слід зазначити, що величина RR не є абсолютним показником статистичної достовірності асоціації і залежить від числа обстежених осіб. Так, при великих вибірках, достовірною може бути асоціація, числове значення якої лише трохи більше 1, тоді як при малих виборках коефіцієнт $R \geq 2$ не завжди є достовірним.

Удосконалення методів математичної статистики в клінічній імуногенетиці визначило ще один шлях вимірювання сили асоціації HLA генетичних алелей введенням етіологічної (EF) і превентивної (PF) фракцій. Так, величина EF, виражена в долях одиниці, вказує на число хворих, патологія яких обумовлена носійством певного HLA гена, або сегрегуючого з ним гена вразливості до захворювання. Даний показник дає більш об'єктивну інформацію відносно сили асоціації в тих випадках, коли з патологією асоційовано декілька антигенів і важко визначити саме яка асоціація є первинною, а яка обумовлена нерівноважним зчепленням генів.

Важно відмітити, що сам коефіцієнт **RR має значний діапазон значень – від одиниці до безмежності** і при трактовці результатів лише констатують наявність або відсутність генетичної схильності без визначення ступеня ризику її реалізації при формування патологічного стану.

Вищенаведені класичні методи обчислювання асоціативного зв'язку з захворюванням антигенів гістосумісності є дуже критичними до об'єму експериментальних даних. Обмеженість вибірок цих даних є об'єктивною

характеристикою реальних досліджень, тому пошук генетичних маркерів в HLA комплексі, як правило, обмежений одним антигеном або сполученням двох антигенів (гаплотипом), оскільки в досліджених вибірках певні сполучення антигенів зустрічаються дуже рідко або не зустрічаються зовсім, що не дозволяє зробити статистичний аналіз по відношенню до цих сполучень.

Крім того, при використанні поодиноких або парних маркерів захворювання виникають методичні складності при визначення сукупного ризику розвитку захворювання. Наприклад, у одного індивіду тільки за локусами А і В можуть зустрічатись 4 поодиноких або 4 парних (фенотип, гаплотип) маркера, кожний з яких свідчить про ризик розвитку захворювання або про стійкості до захворювання. При цьому кожен з них може відігравати як підсилюючу так і послаблюючу роль. Тому обчислення простої суми маркерів є некоректним, оскільки абсолютні значення відносного ризику (RR) розраховані при різних частотах зустрічаємості.

Сучасні підходи обробки реальних виборок експериментальних даних для визначення асоціативних зв'язків HLA-системи з захворюванням вимагають нових математичних методів, які б дозволили отримати об'єктивні результати в умовах обмеженої інформації, а також оцінювати генетичну схильність до патологічного процесу за антигенним складом всіх генетичних систем організму з урахуванням можливих взаємовідносин між окремими генетичними алелями ГКГС в межах однієї системи і між системами.

Мова йде про введення нового поняття – сумарного коефіцієнта ризику (RRs) замість загальноприйнятого критерію – відносного ризику RR.

Новий математичний метод повинен передбачати можливість оцінки ступеню вірогідності реалізації генетичної схильності в залежності від значень коефіцієнта ризику (RRs), що потребує нормування чисельних значень. **В якості такого підходу для імуногенетичного прогнозування**

перспективним є використання методів теорії розпізнавання образів, які базуються на теоремі Байєса і вже знайшли своє місце при вирішенні складних практичних завдань в медицині.

В термінах теорії розпізнавання образів поставлене завдання можна описати наступним чином: HLA- комплекс як сукупність наборів антигенів являє собою систему характеристик людини. Априорно визначені групи осіб, кожна з яких має свій генетичний набір, який належить до двох класів: **хворі і здорові**. В термінах теорії розпізнавання завдання формулюється як необхідність синтезу вирішального правила (моделі), використання якого дозволило б з найбільшою ефективністю (мінімальною помилкою) визначити належність об'єкта (людини) за своїм генетичним набором до класу хворих або здорових. В даному випадку вирішується завдання прогнозування ризику розвитку захворювання як для окремого індивіду, так і для популяції вцілому.

З цих позицій запропоновано використання багаторядні вірогіднісні алгоритми метода групового обліку аргументів, розроблених А.Г.Івахненко (1992). Перевагою цих алгоритмів є можливість їх застосування при дослідженні обмежених за об'ємом вибірок, а також об'єктивність синтезу вирішального правила за принципом самоорганізаційних моделей на ЕВМ. В даному розділі ми не наводимо формул за якими розраховуються „відношення правдоподібності” апостеріорних вірогідностей, оскільки проводити математичний аналіз без використання програмного забезпечення є дуже складним. Але на сьогоднішні програмні продукти для математичної статистики асоціативного зв'язку антигенів і генів ГКГС на основі багаторядних алгоритмів МГУА вже є доступними. Слід зазначити, що завдяки розробленому математичному підходу імуногенетичного прогнозування були отримані нові можливості, що свідчить про певні переваги нового математичного підходу:

Даний метод дозволяє визначати асоціативні зв'язки антигенів системи HLA і інших імуногенетичних систем організму людини з розвитком патологічного процесу. Метод передбачає аналіз невеликих вибірок за сукупністю обраних алоантигенних систем одночасно, що дозволяє прогнозувати ризик формування захворювання за усім фенотиповим комплексом тканин організму. Нормування чисельних значень коефіцієнту (RRs) від 0 до 10 дозволило ввести нове поняття - визначення ризику реалізації імуногенетичної схильності до захворювання, що підвищує діагностичні можливості прогнозування реалізації захворювання. Метод передбачає можливість проводити прогнозування схильності до захворювання для окремого індивіду і для популяції в цілому. Метод дозволяє урахувати взаємодію імуногенетичних алелей на рівні специфічності (синергізму і антагонізму), що підвищує рівень прогнозування ризику реалізації генетичної схильності до захворювання.

Нові математичні підходи не виключають використання класичних методів обчислення асоціацій генетичних алелей з захворюванням, але значно розширює можливості імуногенетичного аналізу.

Питання для самоконтролю:

- 1. Охарактеризуйте закон успадкування Харді-Вайнберга.**
- 2. Які антигени вважаються генетичними маркерами захворювання.**
- 3. Який діапазон значень має коефіцієнт відносного ризику RR (асоціації з захворюванням)**
- 4.Що таке негативна, що таке позитивна асоціація**
- 6. Що таке гаметна асоціація,**
- 5. Що таке нерівноважне зчеплення**

Література:

1. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциации HLA-антигенов с заболеваниями // Вестн. АМН СССР. – 1988. - №7. – С.48-52.
2. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика . - М.: Медицина, 1983. - 208 с.
3. Минченко Ж.Н., Лефтер А.В., Калиниченко С.Б. Математические аспекты исследований ассоциативных связей генетических систем крови с заболеваниями // Международный журнал радиационной медицины. - 2001. - N 3-4. - С.106 – 117.
4. Минченко Ж.Н., Лефтер А.В., Калиниченко С.Б. Интегрированная среда для статистической обработки экспериментальных данных методами популяционной статистики MEDSTAT, в кн.: Программы Украины. Каталог, 1994. вып.2, с.34-35.
5. Minchenko J.N., Lefter A.V., Kalinichenko S.B. Applied tasks solution software tools // Catalog software of Ukraine. – Kiev: Second edition, 1994. - P.36 – 37.

СЛОВНИК НАУКОВИХ ТЕРМІНІВ

Аберация хромосомна (або хромосомна аномалія) – узагальнена назва будь-якого типу хромосомних мутацій: делецій, транслокацій, інверсій, дуплікацій та інш. Інколи цим терміном також позначаються і геномні мутації (анеуплоїдії, гаплоїдії, трісомії тощо).

Аглютиніни – антитіла, що володіють властивістю склеювати корпускулярні АГ (бактерії, еритроцити і т.п.) і викликати їхню аглютинацію. Належать до імуноглобулінів класів G і M.

Ад'ювант – речовина, яка неспецифічно стимулює імунну відповідь на антиген і фактори різного походження та складу, що стимулюють діяльність імунної системи. Іноді це поняття звужують до речовин, які будуть або введені тварині в суміші з АГ (гаптенем) або перед введенням АГ (гаптеном) підсилюють імунну відповідь на цей АГ (гаптен).

Активация лімфоцитів - процес, у результаті якого взаємодія лімфоцита зі стимулюючим агентом, напр., АГ або мітогеном, індукує перехід лімфоцита зі стадії спокою в початкову стадію клітинного циклу.

Алель – одна з двох чи більше альтернативних форм гену, кожна з яких характеризується унікальною послідовністю нуклеотидів.

Алерген – антиген навколишнього середовища, що ініціює реакцію гіперчутливості негайного типу. Алергени, які проникають в організм через дихальні шляхи, мають наступні особливості: 1) усі вони є білками, що відносяться до категорії Т-залежних антигенів; 2) висока розчинність в умовах вологого середовища дихальних шляхів сприяє швидкій дифузії алергенів із вдихаючих часток; 3) низька молекулярна маса забезпечує алергенам відносно вільне проникнення у слизову; 4) низька прововуюча доза сприяє включенню у відповідь хелперних CD4 Т-клітин; продукція цими клітинами інтерлейкіна-4 забезпечує переключення синтезу імуноглобулінів в В-клітинах на IgE-ефекторну молекулу алергічних реакцій.

Алергія (грецьк. allos - інший та ergon - дія) - змінена форма реакції організму при повторній зустрічі з антигеном, або гіперчутливість I типу, форма імунологічної відповіді, що виявляється у підвищеній чутливості організму до різноманітних антигенів (т. зв. алергенів); при алергії організм відповідає на специфічний алерген надмірною реакцією, яка пошкоджує його власні тканини внаслідок набряку та запалення, спазму й розслаблення гладенької мускулатури, порушень мікроциркуляції та гемодинаміки.

Алогенний – термін, що відображає генетичну відмінність між індивідами одного виду.

Алоантигени - АГ, які кодуються генами, що в даного виду зустрічаються в алельній формі.

Алотрансплантат – тканинний або органний трансплантат між галогенними індивідами, тобто пересадка органів чи тканин в межах одного виду.

Антиген – будь-яка молекула, що може бути розпізнана антитілами, або антигенрозпізнавальним Т-клітинним рецептором; може мати як екзогенне, так і ендogenous походження.

Антигенність – міра антигенної якості.

Антитіла - глобулярні білки (глікопротеїни) класу імуноглобулінів, що володіють здатністю до специфічного зв'язування з антигеном і утворюються в організмі у відповідь на введення у нього чужорідних речовин для нейтралізації їх шкідливої дії.

Антитіло моноклональне - антитіло, штучно одержане із клітинного клону і тому містить тільки один тип імуноглобуліну. Моноклональні антитіла утворюються шляхом з'єднання антитіло-утворювальних лімфоцитів, що є в селезінці миші, із клітинами мишачої мієломи. Гібридні клітини, що утворюються в результаті такого з'єднання, починають швидко розмножуватися (аналогічно злоякісним клітинам і виробляти те саме антитіло, що і їх батьківські лімфоцити).

Антитоксини – антитіла, що утворюються в організмі під дією токсинів бактеріального, рослинного і тваринного походження і здатні нейтралізувати їхні пошкоджуючі властивості.

Аутоантигени - антигени власного організму, по відношенню до яких існує аутоімунна толерантність, за певних умов можуть викликати утворення аутоантитіл.

Аутоантитіла - антитіла до молекул речовин, що входять до складу власних клітин або тканин організму.

Аутоімунітет - стан, за якого імунна система починає розпізнавати свої тканини як чужорідні, і атакує їх; один із різновидів імунопатології, оскільки в нормі ряд механізмів постійно підтримує імунну систему в стані толерантності до тканин свого організму, і імунна відповідь не відбувається.

Базофіл (basophil) - різновид лейкоцитів, для яких характерна наявність у цитоплазмі великих гранул, які забарвлюються в пурпурово-чорний колір при впливі на цитоплазму барвника Романовського. Призначення базофілів поки що до кінця не з'ясовано, однак відомо, що вони здатні поглинати чужорідні частки і, крім того, містять у своєму складі гістамін і гепарини, тромбокساني, лейкотрієни та інші медіатори гіперчутливості негайного типу, що обумовлює участь базофілів у алергічних реакціях організму. Звичайно в нормі в одному літрі крові міститься $30-150 \times 10^6$ базофілів.

Бактерицидний - термін, що вказує на властивість хімічних (дезінфектантів, антисептиків, хіміотерапевтичних речовин, включаючи антибіотики), біологічних (АТ, С, лізоциму, в-

лізиму, баєтеріоцинів, фагів, фагоцитів) і фізичних (УФП, іонізує випромінювання й ін.) факторів викликати загибель вегетативних форм бактерій. Аналогічний ефект зазначених факторів відносно спор називають спороцидним, мікробів -мікробоцидним, грибів - фунгіцидним, вірусів - вірусоцидним, найпростіших - паразитоцидним.

Білки гострої фази - група сироваткових білків, які продукуються печінкою, їхня концентрація різко зростає під час запалення; мають літичні властивості по відношенню до бактерій, виступають як хемоатрактанти для фагоцитів тощо.

Білок С-реактивний – білок гострої фази, що взаємодіє з фосфатидилхоліном клітинної стінки бактерій та виступає у якості опсоніна; сприяє швидкому поглинанню бактерій фагоцитуючими клітинами.

Бласти - клітини, які утворюються при диференціюванні ретикулярних клітин (займають проміжне місце між ретикулярними та незрілими плазматичними клітинами).

Бласттрансформація - це перетворення малих лімфоцитів під впливом неспецифічних і специфічних стимулів у бласти - великі піронінофільні клітини, які здатні до проліферації й подальшої диференціації, що приводить до збільшення в лімфоїдній тканині кількості реагуючих клітин.

В-клітини – одна з популяцій лімфоїдних клітин, яка взаємодіє з Т-лімфоцитами і макрофагами для забезпечення імунологічних реакцій, що розвиваються у відповідь на генетично чужорідні субстанції - антигени. Після контакту з антигеном В-лімфоцити перетворюються в плазматичні клітини, які починають продукувати специфічні імуноглобуліни – антитіла.

Видова специфічність – специфічність, завдяки якій представники одного виду організмів відрізняються від особин іншого виду.

Вилочкова залоза (тимус) - центральний орган імунної системи хребетних, в якому відбувається дозрівання Т-лімфоцитів. Складається з двох частин, розділених на менші часточки, які побудовані із коркової (де Т-лімфоцити диференціюються на імунокомпетентні тимоцити) та мозкової речовин, куди мігрують уже зрілі Т-лімфоцити, щоб потім потрапити із кров'ю та лімфою до периферійних лімфоїдних органів.

Вроджений імунітет - імунітет, обумовлений вродженими біологічними особливостями певного організму.

Вторинна імунна відповідь - імунна реакція, що виникає після повторного або багаторазового проникнення антигену.

Гальмування - нейтралізація антитіл при додаванні специфічних антигенів або гаптенів у розчинній формі.

Гамма g- глобуліни (імуноглобуліни) - сироваткові лікувально-профілактичні препарати, що являють собою розчин очищеної й концентрованої g-глобулінової фракції білків крові.

Гаптеноспецифічність – антигенна специфічність, що обумовлена тим чи іншим гаптенним групуванням.

Гемаглютинація - склеювання еритроцитів. Пов'язана з реакцією антитіло - антиген або присутністю в організмі деяких вірусів або речовин.

Гемопоез, кровотворення – процес утворення клітин крові та тромбоцитів, що відбувається протягом усього життя людини і приводить до заміни старих клітин новими (при цьому старі клітини видаляються з кровообігу). У здорових дорослих людей гемопоез здійснюється в червоному кістковому мозку та під час ембріонального розвитку й у ранньому дитинстві, також: як і у випадку деяких захворювань, він може проходити в деяких

Ген – послідовність нуклеотидів у ДНК або РНК, котра обумовлює певну функцію в клітині чи в організмі шляхом контролю синтезу білка (або РНК).

Генна інженерія – сукупність заходів, методів і технологій одержання рекомбінантних РНК і ДНК, виділення генів з організму (клітин), здійснення маніпуляцій з генами, введення їх в інші організми з метою їх експресії.

Генна терапія – введення рекомбінантної ДНК чи РНК у клітину, функцію якої вони нормалізують .

Геном – загальна генетична інформація, яка знаходиться у генах організму, або генетичний склад клітини. Термін „геном” інколи використовується для позначення гаплоїдного набору хромосом.

Генотип – 1) вся генетична інформація організму; 2) генетична характеристика організму за одним або декількома вивчаючими локусами.

Гетерозиготний організм – організм, котрий має дві різні форми певного гену (різі алелі) у гомологічних хромосомах.

Гіперчутливість - підвищена чутливість організму до певної речовини; швидко і сильно виражена імунна реакція на антиген, який не несе для організму небезпеки; різновид імунопатології.

Гіперчутливість негайного типу - підвищена чутливість організму до алергенів, обумовлена АТ і медіаторами. Характеризується швидким розвитком після введення алергену та здатністю передаватися пасивно, із сироваткою.

Гіперчутливість уповільненого типу - підвищена чутливість до алергенів, обумовлена Т-лімфоцитами - ефektорами й лімфокінами, IV тип реакції.

Головний комплекс гістосумісності – група генів і кодуємих ними антигенів клітинної поверхні, які розміщені на 6-й хромосомі і здійснюють генетичний контроль імунної відповіді. ГКГС має назву HLA (human leukocyte antigens). Антигени HLA відіграють важливу роль в регуляції імунної відповіді і являють собою сильні антигени.

Гранулоцити - зернисті лейкоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли), кров'яні клітини хребетних, що містять у цитоплазмі специфічні зерна-гранули; їхня основна функція - захоплення й перетравлення чужорідних часток, особливо бактерій, і участь в імунних реакціях.

Групова специфічність – специфічність, котра обумовлює різниці серед особин одного виду організмів.

Гуморальний імунітет - імунітет, обумовлений антитілами, проти-інфекційна захисна реакція організму, заснована на утворенні В-клітинами циркулюючих у крові специфічних антитіл, а також на дії всіх інших позаклітинних розчинних факторів сироватки крові та рідин організму.

Еозинофіл , гранулоцит еозинофільний (eosinophil) — одна із форм гранулоцитів (зернистих лейкоцитів) крові хребетних, різновид лейкоцитів, що відрізняються наявністю в їхній цитоплазмі великих гранул, які забарвлюються в оранжево-червоний колір барвником Романовського. Роль еозинофілів поки що до кінця не з'ясована, однак відомо, що вони здатні поглинати чужорідні частки, присутні у великих кількостях у слизових оболонках і беруть участь у алергічних реакціях в організмі. У нормі в літрі крові міститься $40-400 \times 10^6$ еозинофілів.

Ефекторні клітини - лімфоцити й фагоцити, які після завершення диференціювання можуть здійснювати свої кінцеві функції.

Запалення – реакція організму на тканинне пошкодження, інфекцію. Характеризується підвищенням проникності судин, накопичуванням рідини та клітин у місці інфекції або фізичного пошкодження.

Змішана лімфоцитарна реакція (MLC) –проліферативна відповідь Т-клітин, який індукується під впливом В-клітин, які експресують алогенні молекули ГКГ (реакція *in vitro*).

Ізоантигени – антигени, завдяки яким різні особини або групи осіб тварин одного виду різняться між собою.

Імунітет – спосіб захисту організму від живих тіл і речовин, котрі несуть на собі ознаки генетичної чужорідності.

Імунітет гуморальний - імунітет, основним ефектором якого є АТ (антитіла).

Імунітет клітинний – імунітет, основним ефектором якого є клітини, сенсibiliзовані лімфоцити та продуковані ними лімфокіни.

Імунна відповідь – реакція імунної системи організму на агенти, що несуть ознаки генетично чужорідної інформації.

Імунна система – сукупність всіх лімфоїдних органів і скупчень лімфоїдних клітин тіла.

Імуногенетика – наука, яка вивчає закономірності спадкування антигенної специфічності і роль генетичних механізмів у здійсненні імунних реакцій.

Імуноглобуліни (Ig) – сукупність білків сироватки, котра несе активність „антитіл”, а раніше називалась γ -глобулінами.

IgA – димерний імуноглобулін, існує в сироватковій і секреторній формі; ефектор місцевого імунітету на слизових оболонках та в секретах слинних, слюзових і молочних залоз, здатний до аглютинації; володіє антивірусною, антибактеріальною (за наявності лізоциму) та антитоксичною дією.

IgD – рецептори В-лімфоцитів, які, взаємодіючи між собою, здійснюють контроль за активацією та супресією лімфоцитів, володіють здатністю до спонтанного протеолізу.

IgE – реактиви, ефектори алергії та протипаразитарного імунітету, які розповсюджені на базофілах, тучних клітинах, у носових, слюзових і слинних секретах.

IgG – основні ефекторні молекули імунітету, здатні проникати через плаценту, становлять 80 % від загальної кількості імуноглобулінів; розповсюджені інтра- та екстравакулярно, здатні до фіксації комплементу та приєднання до макрофагів і нейтрофілів, володіють аглютинаційною здатністю, мають сильну антивірусну, антибактеріальну та антитоксичну дію.

IgM – ефекторні молекули раннього протиінфекційного імунітету, розміщені інтравакулярно; здатні до фіксації комплементу та аглютинації мікроорганізмів, мають антивірусну та антибактеріальну (за наявності комплементу) активність.

Імунодефіцитні стани (імунологічна недостатність) – стан імунної системи, що характеризується недостатністю функції або дефектністю однієї або декількох її одиниць.

Імуногенність – властивість викликати імунні реакції, опосередковані В- і/або Т-клітинами.

Імунологічна реактивність – специфічна реакція організму на антиген, метою якої є специфічна блокада, нейтралізація, руйнування або елімінація саме тих субстанцій, які стимулювали імунну відповідь.

Імунологічна толерантність – це розпізнавання чужорідного і специфічна терплячість до нього, тоді як імунітет – розпізнавання чужого і нетерплячість до нього.

Імунологія – наука про імунітет – вивчає генетичні, молекулярні і клітинні механізми реагування організму на чужорідні субстанції, які називаються антигенами.

Імунопатологія – наука, котра вивчає різноманітні захворювання, у генезі яких лежить розлад імунологічних механізмів.

Імуносупресія – пригнічення імунної відповіді, наприклад, за допомогою лікувальних речовин, що запобігають транспланційній реакції відторгнення.

Імуноферментний метод – визначення АГ або АТ за допомогою АТ або АГ, ковалентно з'єднаних із ферментом.

Імунофлуоресценція полягає у тому, що до молекули антитіл приєднується будь-який флуоресцентний барвник, наприклад, ізотиоціанат натрію.

Інтерлейкіни – група молекул, які входять у склад цитокінів, що продукуються клітинами імунної системи та отримали назву «гормони клітин імунної системи». Необхідні для кооперації клітин імунної системи в реалізації етапів імунної відповіді. На даний час описано більш 20 видів інтерлейкінів, найбільш важливими з них є наступні:

ІЛ-1 – продукується макрофагальними клітинами. Відомий раніше як ендогенний піроген. Під впливом ІЛ-1 ініціюються важливі біологічні ефекти. З точки зору імунної відповіді, ІЛ-1 сприяє тому, що Т-лімфоцити-хелпери починають продукувати ІЛ-2; одночасно з цим під впливом ІЛ-1 на Т-лімфоцитах експресується рецептор до ІЛ-2.

ІЛ-2 – відомий як фактор росту лімфоцитів, тобто білок, що сприяє проліферації лімфоцитів. Продукується Т-лімфоцитами-хелперами 1-го типу.

ІЛ-4 – продукується Т-лімфоцитами хелперами 2-го типу. Головна його роль – підсилення розвитку гуморальної імунної відповіді та переключення продукції ІgM на продукцію ІgG4 або ІgE. Таким чином, підвищена експресія ІЛ-4 сприяє в свою чергу підвищеній продукції ІgE.

ІЛ-10 - суп ресорний інтерлейкін, що продукується так як ІЛ-4. Т-лімфоцитами хелперами 2-го типу. Є цитокіном, що пригнічує функціонування Т-лімфоцитів-хелперів 1-го типу.

Інтерферон – група цитокінів, які збільшують резистентність клітин до вірусної інфекції, володіють антипроліферативним ефектом, а також здатні регулювати імунну відповідь. Розрізняють три види інтерферонів: α – продукується лейкоцитами; β – продукується фібробластами та γ – продукується Т-лімфоцитами-хелперами 1-го типу.

Кілерні Т-клітини - Т-лімфоцити, які розпізнають своїми рецепторами (ТкР) заражені вірусами клітини та руйнують їх.

Класичний шлях активації комплементу – механізм активації комплементу, має наступні властивості: 1) наявність для його запуску циркулюючих імунних комплексів, у склад яких

входять перш за все IgG та IgM; початок процесу активації з ранніх компонентів комплементу, до яких відносяться C1, C4 і C2; утворенням при послідуочій активації C1, C4 і C2 C3-конвертази класичного шляху C4b2a.

Кластери диференціювання (англ. clusters of differentiation, скорочено CO) - білкові антигени, що знаходяться на поверхні клітин і виявляються за допомогою моноклональних антитіл (іншими словами, це своєрідні маркери (мітки), за якими одні клітини відрізняються від інших).

Клітини пам'яті – утворюються при первинній імунізації та зберігаються в організмі тривалий час. Клітини пам'яті забезпечують прискорену, більш сильну імунну відповідь при повторній зустрічі організму з антигеном (патогеном), застосованого при первинній імунізації.

Колонієстимулюючі фактори – фактори, що забезпечують проліферацію та диференціювання гемопоетичних клітин.

Комплемент - система сироваткових білків свіжої крові, фактор природного імунітету тварин і людини; складається з дев'яти компонентів, що включають 11 білків (перший компонент представлений трьома субодинацями) і, приєднуючись до комплексу антиген-антитіло на поверхні клітинної мембрани, викликає лізис бактерій, еритроцитів та інших клітин, активація комплементу відбувається в результаті взаємодії його компонентів з імунними комплексами (класичний шлях активації).

Ко-стимуляція – додаткова стимуляція лімфоїдних клітин в момент розпізнавання антигену. Реалізується за допомогою ко-стимуляторних молекул: наприклад, для пари «макрофаг – Т-хелпер» - це CD80/CD86 – CD28; для пари «Т-хелпер – В-лімфоцит» - CD40 ліганд – CD40. Таким чином, макрофаг дає ко-стимуляційний сигнал Т-хелперу, а Т-хелпер – В-лімфоциту. У випадку відсутності такого сигналу настає анергія клітин або розвивається апоптоз.

Леталь – мутація, яка викликає загибель клітини чи особини перед досягненням репродуктивного віку.

Лангенгарса клітини – антигенпрезентуючі дендритні клітини шкіри, які володіють рецептором до Fc-фрагменту імуноглобулінів мають на своїй поверхні антигени гістосумісності класу II та CD1a.

Лейкотрієни – продукти метаболізму арахідонової кислоти, які підсилюють запальний процес, хемотаксис та підвищують судинну проникність. Продукція базофілами, в тому числі і тканьовими, і макрофагами.

Лізоцим – антибактеріальний фермент, присутній в гранулах фагоцитуючих клітин, в слизовій рідині та слюні, який розщеплює пептидоглікани мембрани бактеріальної клітини.

Лімфа – рідина, що циркулює в лімфатичній системі хребетних тварин, виконує трофічну та захисну функції; містить багато лімфоцитів та дуже мало еритроцитів; до лімфи легко проникають отрути й бактеріальні токсини, як потім нейтралізуються в лімфатичних вузлах.

Лімфоїдні органи (центральні) – органи, в яких відбувається розвиток імунокомпетентних лімфоцитів. До них відносяться тимус і кістковий мозок у ссавців.

Лімфокіни – біологічно активні речовини (глікопротеїди), що синтезуються і виділяються всіма популяціями лімфоцитів при дії антигену або неспецифічного активатора (напр. лектину). За їх допомогою відбувається координація, кооперація та регуляція функцій клітин, залучених до імунної відповіді.

Лімфоцити наївні – лімфоцити, що пройшли доантигенний шлях розвитку і не контактують з антигеном. Зустріч з антигеном забезпечує їх подальший пост антигенний розвиток з переходом у функціонально активні ефекторні клітини.

Лімфоцити Т (Т-клітини) – один із класів лімфоцитів, провідна роль яких належить тимусу. Т-лімфоцити – головні учасники Т-системи імунітету, що здійснюють клітинну форму імунного захисту. Основна ознака Т-клітин – наявність Т-клітинного антигенрозпізнавального гетеродимерного рецептора, асоційованого з однодоменними С3-білками, а також маркера Thy-1 (у мишей).

Локус – місце у хромосомі, де міститься ген (два алелі у диплоїдних клітинах).

Макрофаг – фагоцитуюча клітина, яка походить від моноцита периферійної крові та може функціонувати як антигенпрезентуюча клітина та клітина, що опосередковує антитілозалежну цитотоксичність.

Маркер – алель (чи ознака), успадкування котрого простежується у нащадків.

Мітоген – субстанція, що викликає неспецифічну проліферацію лімфоцитів (фітогемаглютинін, конканавалін А, мітоген лаконоса).

Мієлома – тип злоякісної пухлини, коли з невідомих причин розростається клон плазматичних клітин, що синтезують чітко однакові молекули γ -глобуліну.

Молекули адгезії – речовини, які експресуються активованими кубічними ендотеліальними клітинами та сприяють приваблюванню лімфоцитів до місця локалізації антигену й утриманню їх там.

Монобласт – сама рання ідентифікована клітина, з якої утворюється моноцит. Дозрівання проходить без проміжної стадії (промоноцит). Монобласти присутні в кровотворній тканині

червоного кісткового мозку. У хворих на гостру монобластичну лейкемію вони з'являються в крові.

Моноклон – культура антитілопродуцентів, котрі походять з одного лімфоциту.

Моноклональні антитіла – антитіла однієї специфічності, які продукуються одним клітинним В-клоном і має назву гібридома. Належать до класу імуноглобулінів і мають одну антигензв'язуючу специфічність.

Моноцити – мононуклеарні фагоцити, що виявляються в периферичній крові та є попередниками тканинних макрофагів.

Мутант – організм, котрий несе мутантний алель.

Мутагенез – процес виникнення спадкових змін – мутацій.

Мутагени – фактори, які викликають мутації – різні види випромінювань, деякі хімічні речовини (гідроксиламін, етиленімін та ін.), віруси.

Мутація – зміна у спадкових структурах (ДНК, гені, хромосомі, геномі).

Незалежне успадкування – успадкування конкретного гена (ознаки) без впливу інших генетичних факторів (іншого гена або полу), як правило, в цих випадках говорять про гени, які входять в різні групи зчеплення.

Незалежний розподіл – Розподіл генів, локалізованих на різних хромосомах, в гаплоїдні гамети, тобто наявність числа гамет АВ, аВ, Ab, ab у індивіда з генотипом AaBb. Н.р. лежить в основі закону Менделя про незалежний розподіл ознак.

Незамінні амінокислоти – амінокислоти, які не синтезуються в тваринному організмі, але необхідні для його нормальної життєдіяльності. На – валін, ізолейцин, лейцин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, аргінін, гістидин, поступають до організму з їжею. Інші амінокислоти відносяться до замінних, деякі з них – умовно, наприклад тирозин, який утворюється в організмі тільки з фенілаланіну і при недостатньої кількості у їжі може стати незамінним.

Нейтрофіли – одна із форм лейкоцитів крові у хребетних тварин і людини, форма зернистих лейкоцитів, здатних до фагоцитозу дрібних чужорідних часток, включаючи бактерії. Характеризуються тим, що вони раніше всіх потрапляють в тканини при розвитку запального процесу. Крім того вони володіють здатністю здійснювати антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність.

Неменделівський фактор – Зовнішнє ядерний ген, який локалізований у цитоплазматичних органелах.

Неменделівське успадкування – Відхилення від очікуваного, згідно законам Менделя, співвідношення частот фенотипів в результаті зкрещування, або поява незвичайних фенотипів, як слідство

НК-клітини - нормальні (природні) кілерні клітини. Популяція лімфоцитів, що володіє природною властивістю розпізнавати й руйнувати деякі інфіковані вірусами та пухлинні клітини.

Носій – будь-яка молекула, яка після зв'язування з не імуногенною молекулою, наприклад, з гаптенем, надає ост анній імуногенні властивості.

Нулеві клітини - це група клітин, які ще до кінця не визначені як самостійна популяція. Можливо, це молоді або старіючі клітини субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Не містять або містять мало рецепторів і маркерів Т- і В-клітин.

Онтогенез – індивідуальний розвиток особини (організму) з моменту зародження до природної смерті або до припинення існування одноклітинного організму в наслідок поділу.

Опсонізація – процес, що полегшує фагоцитоз. Обумовлений зв'язуванням опсонінів (антитіл і компоненту С3b комплементу) з поверхневими антигенами бактерій, ушкодження або вкривання поверхні патогенного фактора комплементом, С-реактивним білком або іншими імунними факторами, необхідне для їх фагоцитозу макрофагами чи нейтрофілами.

Опсоніни (бактеріотропіни) - білкові фактори сироватки крові, які, взаємодіючи з поверхнею чужорідних часток, полегшують їхнє захоплення фагоцитами.

Опсонін – субстанція, яка підсилює фагоцитоз, зокрема імуноглобуліни, активований 3-й компонент комплементу (С3b) та інш.

Пам'яті клітини – клони Т- і В-клітин, що утворились при первинній імунній відповіді, здатні розпізнати антиген, що викликав їх утворення, та відповідати на нього по типу вторинної імунної відповіді.

Пей'єрові бляшки – елементи лімфоїдної тканини, що асоційована з кишечником у вигляді окремих лімфоїдних вузлів, які розташовані, головним чином, в тонкій кишці.

Примірування – процес, впродовж якого настає первинна сенсibiliзація до відповідного антигену.

Перемикання класу імуноглобулінів – генетично обумовлена властивість В-лімфоцитів перемикати продукцію імуноглобулінів з одного класу на інший, наприклад з продукції I gM на продукцію IgG.

Плазматична клітина – заключний етап антигенного диференціювання В-лімфоцитів; активно секретує велику кількість антитіл.

Поєднуючий ланцюг (goint –ланцюг) – молекула, яка приймає участь у формуванні структури IgM і секреторного IgA .

Презентація антигену – процес, під час якого певні клітини, які представляють антиген в організмі експресують антиген на своїй клітинній поверхні в формі, яку можуть розпізнати лімфоцити.

Проліферація – збільшення числа клітин шляхом мітотичного поділу. Спостерігається під дією неспецифічних факторів (міогенів, ендо- та екзорегуляторів).

Процесінг – (периварювання) антигену – процес, в результаті якого клітина доводить велику молекулу білкового антигена до форми пептида, який нараховує декілька амінокислотних послідовностей. Внутрішні клітинні цитозольні білки переварюються (процесуються) під впливом протеосомальних ферментів, а потім занурюються в пептидзв'язуючі бороздки антигенів гістосумісності класу I; таким же чином процесуються і вірусні білки.

Поліморфізм – визначає наявність багатьох алельних варіантів одного і того ж гена.

Полігенія – наявність декількох неалельних близько зчеплених генів, які контролюють ізогенні ознаки. При кодомінантному успадкуванні сполучення поліморфізму і полігенії утворює набір фенотипових ознак, які і визначають індивідуальність осіб виду.

Реакція зв'язування комплементу – серологічна реакція, що використовуються для кількісного визначення комплементзв'язуючих АТ і АГ.

Реакція у змішаній культурі лімфоцитів (ЗКЛ) – проліферативна відповідь Т-клітин на алоантигени ГКГС в культурі, яка вміщує клітини двох відмінних за специфічністю індивідів, або клітини двох інбредних ліній тварин.

Резус-конфлікт – несумісність в системі мати-плід за антигенами системи резус (мати резус-негативна; плід резус-позитивний), що призводить до розвитку гемолітичної хвороби немовлят, або мертвонародженню.

Реакція трансплантат проти хазяїна (РТПХ) – відбувається внаслідок антигенної несумісності за тканинною специфічністю імунокомпетентних клітин донора і реципієнта. Внаслідок несумісності донорські Т-лімфоцити атакують Т-лімфоцити реципієнта, що призводить до відторгнення трансплантата і формування тяжкої імунопатології.

Рецептор – молекула на поверхні клітини, яка має здатність зв'язувати специфічні білки або пептиди.

CD-антиген – (перекладається, як кластер диференціювання – cluster differentiation) – позначає молекули, що знаходяться на поверхні клітин, які можуть бути ідентифіковані за допомогою групи моноклональних антитіл.

CD-3 - маркер Т-лімфоцитів, комплекс із п'яти поліпептидів, які беруть участь у трансмембранній передачі сигналу при активації Т-лімфоцитів.

CD-4 - маркер, за наявності якого ідентифікуються Т-хелперні клітини.

CD-8 - загальний маркер для всіх цитотоксичних лімфоцитів.

CD-16 - рецептор до Fc-фрагменту молекули IgG, експресується на поверхні природних кілерів.

CD-19-CD-22 - чотири маркери, які поряд із імуноглобуліновим рецептором ідентифіковані на поверхні В-лімфоцитів.

Секреторний імуноглобулін – імуноглобулін, який має в своєму складі секреторний компонент і визначається в різних секретах організму. Він являє собою основний захисний фактор місцевого імунітету. Розрізняють секреторні IgA і IgM.

Селекція клонів лімфоцитів – процес відбору клонів лімфоїдних клітин, які здатні взаємодіяти з особистими молекулами головного комплексу гістосумісності (позитивна селекція, яка відбувається у тімусі), або видалення клонів, які реагують на особисті антигени - ауто антигени (негативна селекція, яка відбувається у тімусі для Т-клітин або в кістковому мозку для В-клітин).

Селектини - три молекули адгезії: Р-селектин (CD62P), Е-селектин (CD62E) та L_-селектин (CD62L). Беруть участь у припиненні міграції лейкоцитів через ендотелій венул.

Сенсибілізація - процес формування специфічної, індукованої попереднім введенням алергену підвищеної чутливості організму негайного або вповільненого типу.

Сингенний – генетична ідентичність. Для тварин прикладом є „чисті лінії тварин” для людини – одно яйцеві близнюки.

Система мононуклеарних фагоцитів - сукупність клітин мезенхімного походження, об'єднаних на основі здатності до фагоцитозу; до неї належать клітини ретикулярної тканини, ендотелія синусоїдів гемопоетичних та інших органів, а також всі види макрофагів; виконує захисну функцію.

Соматична гіпермутація – посилення швидкості точкових мутацій в генах варіабельних регіонів імуноглобулінів. Спостерігається після антигенної стимуляції і діє як механізм підвищення різноманітності антитіл.

Спадковість – здатність живих організмів передавати особинам наступного покоління морфоанатомічні, фізіологічні, біохімічні особливості своєї організації, а також характерні риси становлення цих особливостей у процесі онтогенезу.

Спадкові захворювання – захворювання, які існують від народження і для яких етіологічним фактором є генна, хромосомна або геномна мутація.

Специфічність – ті антигенні особливості, завдяки наявності яких антигени відрізняються один від одного.

Специфічний імунітет – набутий, адаптивний імунітет, у процесі якого для кожного типу антигену організм виробляє певні, специфічні антитіла; основні його ефектори – Т- та В-лімфоцити.

Специфічні антитіла – це популяція антитіл із широким спектром афінності, але вони володіють загальною специфічністю до даного гаптену.

Стовбурова гемопоетична клітина – клітина, яка є родопочатковою для всіх клітин крові; знаходиться в кістковому мозку людин і тварин.

Супресорні Т-клітини – функціонально особливі популяції Т-клітин, які пригнічують імунну відповідь інших Т- і В-клітин або ж направляють відповідь іншим шляхом (переключення типу відповіді), недовго-живучі клітини з фенотипом антигенів H-2, L_{yt}-2,3, Thy-1, Q_a-1, MTLA, Ia, містять рецептори до Fc-фрагменту IgG, до мітогенів, гістаміну, високочутливі до циклофосфаміду.

Т-хелпери - субпопуляція Т-лімфоцитів, які беруть участь у реакціях гуморального імунітету. Це довгоживучі клітини з фенотипом H-2, L_{yt}-1, IgG, Ia, Thy-1, чутливі до циклофосфаміду, містять рецептори до мітогенів, ідіотипових та антиідіотипових детермінант.

Т-залежний антиген – антиген, що потребує участь Т-лімфоцитів-хелперів при розвитку продукції антитіл на цей антиген.

Т-незалежний антиген – антиген, здатний викликати продукцію антитіл у відсутності Т-лімфоцитів-хелперів.

Тимоцити – стовбурові клітини, що розвиваються в тимусі; є попередниками Т-лімфоцитів.

Т-супресори - регуляторні клітини, які гальмують імунну відповідь Т- і В-лімфоцитів на антиген.

Т-хелпери другого типу - індуктори гуморальної імунної відповіді організму, продукують інтерлейкіни 4, 5, 6, 10 і трансформуючий фактор росту пухлин.

Т-хелпери першого типу - хелпери запалення, індукують відповідь клітинного імунітету шляхом виділення інтерлейкіну 2, інтерферону гама, фактору некрозу пухлин.

Т-цитотоксичні лімфоцити - тимоцити, функцією яких є руйнування шляхом лізису клітин-ишієней, які мають чужорідний антиген (пухлинних та вірус-інфікованих, а також трансплантованих клітин).

Т-лімфоцити – тимусозалежні клітинні популяції, котрі забезпечують всю гаму імунологічних реакцій, що розвиваються у відповідь на генетично чужорідні субстанції.

Толерантність – стан специфічної імунологічної невідповідальності на власні антигени організму, яка розвивається в процесі дозрівання імунної системи.

Трансгенний – термін, який визначає факт переносу генів, які отримані в одному організмі, до іншого. Дані гени вмикаються в ДНК хазяїна.

Трансплантація – пересадка тканини або органу у рослин, тварин і людини.

Фагоцити – спеціалізовані захисні клітини сполучної тканини тварин і людини, здатні до захоплення й перетравлення чужорідних часток; до них належать нейтрофіли, клітини мікроглії та системи моноклеарних фагоцитів.

Фагоцитоз - процес активного захоплення й поглинання мікроскопічних чужорідних живих об'єктів (бактерії, фрагменти клітин) та твердих часток одноклітинними організмами або деякими клітинами багатоклітинних тварин; важливий компонент механізмів природного імунітету людини.

Фактор некрозу пухлин – група прозапальних цитокінів, які кодуються генами МНС. ФНП синтезується макрофагами\моноцитами, бере участь у регуляції імунної відповіді (підсилює запальні й цитотоксичні реакції), а також руйнує пухлинні клітини.

Fab-фрагмент – (антигензв'язуючий) – фрагмент імуноглобулінів, який зв'язує антиген. IgG має два антигензв'язуючих (**Fab**) фрагмента, які вміщують обидва легких ланцюга і N-кінцеві частини обох важких ланцюгів, зв'язаних між собою дисульфідними мостиками.

Fab-фрагменти визначають валентність імуноглобулінів, тобто ту кількість антигену, яку може зв'язувати даний конкретний імуноглобулін.

Fc-фрагмент – константний фрагмент, який не здатний зв'язувати антиген. До його складу входять C-кінцеві частини обох важких ланцюгів імуноглобулінів. Функціональне значення Fc-фрагменту визначено як можливість зв'язування з Fc-рецептором, який є на мембрані багатьох клітин; в зв'язуванні з C1q-компонентом комплементу, що призводить до активації комплементу за класичним шляхом; реалізація транспорту IgG крізь плаценту до плоду.

Феномен аглютинації – полягає у тому, що бактерії, клітини тварин або інші корпускулярні антигенні частки, які знаходяться у суспензії, під впливом антитіл склеюються між собою.

Феномен десенсибілізації полягає у тому, що організм, котрий переніс анафілактичний шок у важкій або легкій формі, на декілька днів втрачає гіперчутливість до даного антигену і наступне його введення не супроводжується анафілактичним шоком.

Десенсибілізація – елімінація ізоімунних антитіл із організму.

Феномен лізису – здатність деяких антитіл розчиняти клітини, проти яких вони виникли.

Феномен опсонізації полягає у тому, що антитіла підсилюють фагоцитарну активність нейтрофілів і макрофагів у відношенні тих антигенних субстанцій або мікроорганізмів, проти яких вони одержані.

Феномен преципітації – ефект збільшення розчинних антигенних субстанцій під впливом антитіл з появою помутніння прозорих розчинів.

Феномен HLA- генетичної рестрикції – імунологічний феномен в результаті якого Т-клітини розпізнають процесований чужерідний антиген тільки за умов презентації особистими аутологічними HLA молекулами.

Фенотип – сукупність властивостей і ознак організму, що склалися на основі взаємодії генотипу з умовами зовнішнього середовища.

Функціональна специфічність – антигенна специфічність, пов'язана з функцією даної органічної молекули.

Хемокіни – низькомолекулярні цитокіни, що приймають участь в міграції та активації фагоцитуючих клітин та лімфоцитів; відіграють одну з центральних ролей у запальній відповіді.

Хемотаксиси – направлена міграція клітин у відповідь на продукцію відповідних хемотаксичних факторів.

Хроматин – комплекс біополімерів, в якому здійснюються головні генетичні процеси клітини. Він знаходиться у хромосомах ядра клітини тваринних і рослинних організмів; являє собою нуклеопротейд.

Хромосоми – структури клітинного ядра, які забезпечують передавання спадкової інформації від клітини до клітини та від покоління до покоління.

Цитокіни – загальна назва білків низької молекулярної маси, які продукуються різними клітинами та здатні стимулювати або пригнічувати диференціювання, проліферацію або функцію імунних клітин. Є медіаторами міжклітинної взаємодії.

Цитофільність – здатність імуноглобуліну приєднуватись до клітин, зокрема до базофілів.

Чутливість – здатність живого організму сприяти дію подразників з зовнішнього і внутрішнього середовища.

Шарнірний регіон – ділянка амінокислот між Fab і Fc- регіонами імуноглобулінів, яка здатна робити молекулу імуноглобулінів рухомою при її контакті з антигеном.

Епітоп – ділянка антигену (антигенна детермінанта), яка розпізнається антигенрозпізнаючим рецептором з наступним розвитком специфічної імунної відповіді.

Ядро клітинне – найважливіший структурний компонент клітин еукаріотичних організмів, основною функцією якого є збереження і передавання генетичної інформації.

Якірні амінокислоти – амінокислотні залишки лінійного пептичного фрагменту антигена, які утворюють зв'язок з амінокислотами в щілині молекули ікласу МНС, внаслідок чого формується імуноген - лінійний пептид антигена з молекулою ікласу, експресований на поверхні клітини для розпізнавання цитотоксичними CD8 Т-лімфоцитами.