

Тематичний план практичних занять з дисципліни «Клітинна і молекулярна імунологія» для підготовки аспірантів очної (денної, вечірньої) форм навчання за спеціальністю 222 Медицина

1. Фенотипування лімфоцитів. Діагностична цінність методу проточної цитофлуориметрії (А.М.Гаврилюк)
2. Оцінка вродженого та набутого імунітету в нормі та при патології (Х.О.Ліщук-Якимович)
3. Особливості введення лікувальних моноклональних антитіл. Імуноглобулінотерапія (Я.Є.Бойко)
4. Алерговакцини в практичній медицині (С.О.Зубченко)
5. Залікове заняття.

Тема практичного заняття №1. Фенотипування лімфоцитів. Діагностична цінність методу проточної цитофлуориметрії – 2 год. (А.М.Гаврилюк)

Навчальна мета заняття: дати аспірантам сучасні знання про метод проточної цитометрії, рекомендації щодо його застосування

Професійно-орієнтована мета заняття: навчити аспірантів основам інтерпретації імунограми

Навчальні питання:

1. Які ви знаєте інші лабораторні методи із застосуванням флуоресцентних барвників
2. Історія проточної цитофлуориметрії
3. Доцільність застосування кількох флуоресцентних міток
4. Які клітини можна аналізувати на проточному цитометрі

Короткий зміст теми заняття

Лікарям, які розпочинають вивчення клінічної імунології, необхідність розбиратися у назвах, кількісній та функціональній оцінці численних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів стає суттєвим бар'єром у навчанні.. Це завдання набагато полегшилося у 1984 році, коли у практику було впроваджено кластерну диференціацію (cluster of differentiation - CD) клітин. Відповідно до будови поверхневих глікопротеїнових рецепторів, унікальних для кожної імунної клітини і здатних змінюватися у залежності від її стану - спокою, активації чи пухлинної трансформації - було створено моноклональні антитіла (МА).

Як виникають і з кого формуються різні популяції та субпопуляції лімфоцитів? Для початку усвідомимо, що експресія поверхневих антигенів та рецепторів для виконання своїх функцій відбувається не відразу. Лімфоцити «дозрівають» у центральних органах імунної системи. До тимусу поступають спільні прогениторні лімфопоетичні клітини (common lymphocyte progenitor – CLP) з кісткового мозку. Під впливом синтезованих у тимусі білків Jagged та Delta-like, які зв'язуються з рецептором Notch-1 вони розпочинають диференціюватися у тимоцити (дозріваючі Т-лімфоцити, або тимічні лімфоцити). Процес дозрівання **Т-лімфоцитів** можна розділити на дві фази: 1) рання, коли дозріваючі клітини не мають рецептора для зв'язування антигену; 2) пізня, коли тимоцити вповні експресують антигенрозпізнаючі рецептори. Зрілі Т- і В-лімфоцити уже мають на своїй поверхні рецептори (TCR і BCR), які служать для специфічного розпізнавання антигену. Остаточної зрілості Т- і В-лімфоцити досягають лише після того, як залишають тимус та кістковий мозок і мігрують у периферичні лімфовузли. Недозрілі тимоцити ще не мають ані рецепторного комплексу TCR/CD3, ані молекул CD4 та CD8. У тимусі розпочинається процес реаранжування генів TCR, який призводить до створення рецептора TCR, який складається з двох різних ланцюгів α та β . Після реаранжування клітини починають синтезувати молекули CD4 та CD8 та інтенсивно проліферувати. Виникає великий пул лімфоцитів подвійно додатніх CD4⁺CD8⁺, яких чекає позитивна та негативна селекція. Позитивній селекції піддаються такі подвійно додатні лімфоцити, які мають правильно збудований рецептор TCR і мають здатність розпізнавати чужорідні антигени, презентовані власними молекулами I-го класу МНС. Такі лімфоцити залишаються в організмі. Якщо ж тимоцити здатні розпізнавати власні, а не чужорідні, антигени, то вони живуть заледве 3-4 дні і підлягають апоптозу. Розпізнавання власних антигенів не обов'язково призводить до негативної селекції. Певний відсоток лімфоцитів CD4⁺, який здатен розпізнати власні антигени, починає синтезувати молекули CD25 та транскрипційний фактор FOXP3, потім диференціюється у тимусі в тимічні (натуральні) регуляторні лімфоцити tTreg.

В-лімфоцити (CD19, -20, -21, -22) також розвиваються з CLP кістковомозкового походження в кістковому мозку. З нього виходять незрілі, так звані «транзитні» В-лімфоцити, які вже мають правильно зреаранжовані імуноглобулінові гени, кодуєчі поверхневі імуноглобуліни (BCR, в основному sIgM). Тільки у тимусзалежних регіонах селезінки ці клітини продовжують дозрівання. Далі з В-лімфоцитами відбувається позитивна та негативна селекція, «транзитні» В-лімфоцити зв'язують аутоантигени через sIgM, і біля 75% цих клітин гине від апоптозу. Решта В-лімфоцитів остаточно дозрівають, на них з'являється рецептор до цитокіну BAFF, збільшується кількість sIgD, і клітини стають здатними розпізнавати чужорідні антигени, проникати у периферичні лімфоїдні органи та створювати осередки розмноження.

На всіх цих етапах відбувається експресія відповідних глікопротеїнових рецепторів на мембранах імунних клітин. Наявність рецепторів того чи іншого типу створює так званий фенотип клітини. Реакції глікопротеїновий рецептор-моноклональне антитіло до нього оцінюються як за допомогою світлової

мікроскопії, так і проточної цитометрії. Для визначення імунофенотипу застосовуються так звані «панелі» моноклональних антитіл проти поверхневих та цитоплазматичних антигенів основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів та інших клітин крові (таблиця 1).

№п/п	Популяція клітин	Антиген
1.	Т-лімфоцити	Т-клітинний рецептор (TCR), CD2, CD3 , CD4, CD5, CD7, CD8, CD28, CD154 (CD40L), молекули МНС I-го класу
2.	Т-лімфоцити хелпери	CD2, CD3, CD4 , CD5, CD7, CD45
3.	Т-лімфоцити цитотоксичні	CD2, CD3, CD8 , CD5, CD7, CD45
4.	В-лімфоцити	В-клітинний рецептор (BCR), CD10, CD19, CD20, CD21 (CR2), CD22 , CD32 (FcγRII), CD35 (CRI), CD40, CD72, CD79a, CD80, CD86, поверхневі IgM, HLA-DR, CD45; молекули МНС класів I і II
5.	Плазматичні клітини	CD19, CD38, цитоплазматичні Ig, CD138, CD45
6.	НК-клітини	CD16, CD56 , CD45
7.	Клітини моно/мієлоїдальні	CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, мієлопероксидаза, CD117, CD45
8.	Стовбурові кровотворні клітини	CD34, CD133, TdT, CD45
9.	Еритроцити	CD71
10.	Мегакаріоцити	CD61, CD62P

Таблиця 1.

Основні антигени, присутні на морфологічних елементах крові (Golab J., et al. 2017)

Проточний цитометр використовують як для оцінки функціональної активності імунних клітин, так і для дослідження взаємодії між клітинами, як наприклад фагоцитозу, антитілозалежної клітинної цитотоксичності, природньої цитотоксичності НК-клітин, активації каскаду комплементу, активації та проліферації Т-лімфоцитів. Технологія мультимерів МНС, які містять щонайменше чотири молекули комплексів МНС уже з презентованими пептидами, дає можливість виявлення антигенспецифічних Т-лімфоцитів, наприклад, при вірусних інфекціях, пухлинних процесах, аутоімунних хворобах. Завдяки новій технології використання кульок, вкритих антитілами, котрі специфічно розпізнають різні білки (cytometric bead assay), можливою є також кількісна оцінка цитокінів, хемокінів, ростових факторів як всередині клітини, так і синтезованих назовні у малих кількостях. Найновішим варіантом проточної цитометрії є масцитометрія CyTOF (Cytometry by Time-of-Flight), яка об'єднує

широту дослідження на рівні великої кількості клітин (біля мільйона) та прискіпливість маспектроскопії. В масцитометрії клітини, марковані іонами тяжких металів, проходять через струмінь іонізованого аргону, завдяки чому виявляються іони металів, які містяться у різних антитілах. Завдяки масцитометрії можна одночасно оцінити біля 40 параметрів на одній клітині, що полегшує вивчення складних внутрішньоклітинних процесів, як передача сигналів, фосфорилування білків, регуляція процесу транскрипції. На сьогоднішній день, завдяки доступності багатьох реактивів та флуоресцентних міток, проточна цитометрія зробила можливим функціональні дослідження клітин. Зокрема, це: 1) оцінка функції трансмембранних «транспортерів» з визначенням месенджерів мембранних pomp, наприклад глікопротеїну P; 2) внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} , рН клітин, транспорт іонів K^+ та Na^+ та зміни мембранного потенцілу з використанням спеціальних барвників; 3) визначення відсотка апоптичних, некротичних клітин, фаз клітинного циклу, плоїдії ДНК за допомогою флуоресцентних зв'язків, авідних до нуклеїнових кислот; 4) спостереження за поділом клітин з використанням стабільних флуоресцентних зв'язків з внутрішньоклітинними білками.

Проточна цитофлуориметрія — це метод підрахунку, аналізу та сортування мікроскопічних частинок (найчастіше, клітин), завислих у потоці рідини.

У основу створення методу проточної цитофлуориметрії лягли сучасні цитохімічні флуоресцентні методи аналізу структурних компартментів клітин, їх поверхневих антигенів та внутрішньоклітинних процесів. Однак основною відмінністю проточної цитофлуориметрії від них є висока продуктивність: вивчаються вибірки від кількох тисяч до мільйонів клітин, що гарантує статистичну достовірність отриманих результатів. Проточна цитофлуориметрія відрізняється також від класичної цитохімії тим, що: 1) цей метод аналізує не середньостатистичні молекулярні характеристики по всій популяції клітин, а індивідуальні параметри для кожної окремо; 2) може реєструвати по кілька параметрів для кожної окремої клітини зі швидкістю 10^5 клітин в секунду; 3) використовує логічні обмеження, що дозволяє визначати окремі субпопуляції клітин у гетерогенних клітинних популяціях (наприклад, периферичній крові); 4) інтенсивність флуоресценції вимірюється об'єктивно за рахунок вискоефективних та високочутливих фотоприймачів; 5) метод здатен виявити та охарактеризувати рідкісні події, які трапляються з частотою $10^{-5} - 10^{-7}$.

Метод дозволяє одночасно багатопараметрично аналізувати фізичні або хімічні характеристики окремих частинок/клітин. Назва методу пов'язана з тим, що вони вивчаються в «потоці» буферу. Основа методу полягає у 1) використанні системи гідрофокусування, яке забезпечує поодичне проходження клітин в потоці; 2) опроміненні клітини лазерним випромінюванням; 3) реєстрації сигналів світлорозсіювання та флуоресценції від кожної клітини.

Інформація, яка отримується з аналізу сигналів світлорозсіювання та вимірювання часу «прольоту» клітин через зону аналізу, дозволяє дослідникам визначати морфологічні характеристики клітин (розмір, співвідношення між розмірами ядра і цитоплазми, гранулярність цитоплазми, ступінь асиметрії клітин). У такому випадку можна визначати тип клітин («типувати») без застосування флуоресцентних барвників, і скласти пацієнту гістограму з трьох груп клітин – лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів. Однак, для сучасної гематології цієї інформації замало. Якщо є необхідність виявлення патологій на клітинному та мембранному рівнях, застосовують МА. Це дозволяє типувати клітини не тільки за їх морфологічними відмінностями, але і за рахунок набору поверхневих антигенів та рецепторів, характерних для строго визначених популяцій клітин та їх функціонального стану.

Суспензія клітин, попередньо мічених флуоресціюючими МА або флуоресцентними барвниками, потрапляє в потік буферу. Клітини вишиковуються одна за другою за рахунок так званого гідродинамічного фокусування потоку в потоці. Воно забезпечується великим об'ємом зовнішнього потоку (потоку-оболонки) у порівнянні з потоком проби. При проходженні лазерного променя через клітину детектори фіксують: 1) розсіювання світла під малими кутами (от 1° до 10°), 2) розсіювання світла під кутом 90° , 3) інтенсивність флуоресценції по кількох каналах флуоресцентності (від 2 до 18-20). Зазвичай використовують моноклональні антитіла, мічені флуорохромами, котрі після збудження світлом лазера з певною довжиною хвилі випромінюють світло вже іншої хвилі. Найчастіше це Флуоресцеїну ізотіоціанат (FITC), Фікоеритрин (PE, RD1), Перидинін-Хлорофіл Протеїн (Per-CP), Алофікоціанін (APC), а також «тандемні» барвники: Фікоеритрин — Техаський червоний (ECD), Фікоеритрин — Cy5 (PC5), Фікоеритрин — Cy7 (PC7), Алофікоціанін- Cy7 (APC-Cy7). «Квантові точки» у проточній цитофлуориметрії – це QD560, QD590 і т. д.

Кольори світіння залежать від різновиду флуорохрому (барвника): ізотіоціанін флуоресцеїну дає зелений колір, фікоеритрин - помаранчевий, тексанська червонь та тетраметил-ізотіоціанін - червоний. У залежності від типу апарата відрізняється кількість одночасно проаналізованих випромінювань хвиль різної довжини (від 2 до 18). Інтенсивність флуоресценції формується за рахунок двох складових: специфічної флуоресценції та аутофлуоресценції. Специфічна флуоресценція - це випромінювання молекул флуорохрому, зв'язаних з певними клітинними компартментами чи речовинами (рецептори, внутрішньоклітинні білки, ДНК та ін.). Аутофлуоресценція – це випромінювання з молекул - складових частин клітини (білки, нуклеїнові кислоти і т.д.). Інтенсивність специфічної флуоресценції залежить від кількості молекул флуорохрому в клітині, довжини хвилі збуджувального випромінювання, екстинції флуорохрому

на цій довжині хвилі, квантового виходу флуорохрому, числової апертури оптичної системи збору флуоресценції, спектрального діапазону системи оптичної фільтрації та детекції. Інтенсивність аутофлуоресценції аналогічним чином залежить від оптичних властивостей молекул власної клітини. Підготовка клітин перед виконанням методу здійснюється так, щоби рівень специфічної флуоресценції на кілька порядків перевищував рівень аутофлуоресценції. В основному аналізують суспензії клітин крові, кісткового мозку, лімфовузлів чи інших тканин, навантажених моноклональними антитілами.

За допомогою проточної цитофлуориметрії можна вивчити насамперед морфологічні параметри, які можна охарактеризувати по розсіюванню світла. Реєстрацію розсіяного світла під малими кутами використовують для визначення діаметра клітин. Наступна характеристика – інтенсивність флуоресценції досліджуваного об'єкта. Крім цих основних параметрів, можна вимірювати поляризацію флуоресценції (і, завдяки цьому, ступінь в'язкості мембрани клітин, яка змінюється в залежності від їх функціонального стану) і час прольоту часточки через зону аналізу (свідчить про ступінь асиметричності клітин або їх органел). На сьогоднішній день сфери застосування проточних цитофлуориметрів розширилися за рахунок: 1) кількісного аналізу внутрішньоклітинних РНК та ДНК; 2) параметрів клітинного циклу; 3) встановлення наявності клітин, що діляться; 4) виявлення клітин з аномальним ДНК. Для цього використовують інші флуоресцентні барвники, такі як йодид пропідію, Hoechst, 7-аміноактиноміцин D (7-AAD) і ряд інших.

Проточна цитофлуориметрія має різновидності - крім класичної проточної цитофлуориметрії, яка забезпечує аналіз, є ще проточна цитофлуориметрія-сортування. Проточна цитофлуориметрія-сортування дозволяє відібрати субпопуляції клітин, потрібні для дослідження (грунтуючись на аналітичних можливостях першого варіанту методу), і надалі працювати тільки з ними. Ряд наукових досліджень неможливий без сортування хромосом, отримання тетраном, трансфектованих клонів суперпродуктивних GFP тощо. Виконання методу проточної цитофлуориметрії у клінічних та наукових лабораторіях вирішує багато важливих завдань біології клітини, імунології, клітинної інженерії і т.д. **Діагностична цінність методу** – це кількісна та якісна оцінка фізичних та біологічних властивостей клітин та внутрішньоклітинних елементів (нуклеїнових кислот, мітохондрій тощо). Основні сфери **застосування методу проточної цитофлуориметрії**: 1) **імунологія** - імунофенотипування клітин периферичної крові; визначення фагоцитарної активності (захоплення мічених флуорохромами бактерій чи дріжджів); визначення внутрішньоклітинних

цитокінів (спонтанна продукція чи під дією різних стимуляторів, зокрема ФМА + іономіцин, ЛПС, ФНП-альфа); визначення внутрішньоклітинних білків, наприклад транскрипційних факторів GATA-3, T-bet, FoxP3 для дискримінації CD4 T-лімфоцитів; визначення проліферативної активності (виявлення інкорпорованого бромдезоксидуридину); дослідження клітинного циклу; оцінка клітинної цитотоксичності, 2) **онкологія** - кількісний аналіз внутрішньоклітинних компонентів (ДНК); аналіз стадій клітинного циклу; виявлення анеуплоїдного клону; визначення проліферативної активності анеуплоїдного клону; визначення маркерів апоптозу; оцінка стану протипухлинного імунітету; оцінка клітинної ланки імунітету (визначення субпопуляцій лімфоцитів); оцінка функціональної здатності НК-клітин тощо; 3) **цитологія** – визначення цитоморфологічної приналежності клітини, розмір, співвідношення ядро/цитоплазма, ступінь асиметричності та гранулярності клітин; оцінка активності внутрішньоклітинних ферментів за допомогою флуорогенних субстратів; визначення експресії поверхневих антигенів; аналіз стадій клітинного циклу; вимірювання фізіологічних параметрів клітини (внутрішньоклітинне рН, концентрація вільних іонів Ca^{2+} , потенціал зовнішньої клітинної мембрани), 4) **гематологія** - аналіз субпопуляційного складу клітин периферичної крові; підрахунок ретикулоцитів, аналіз тромбоцитів за специфічними маркерами; диференційна діагностика лімфопроліферативних хвороб та реактивних лімфоцитозів; діагностика гострих лейкозів; 5) **фармакологія** – вимірювання експресії маркерів на клітинах; активності внутрішньоклітинних ферментів; визначення стадій поділу клітини для вивчення механізмів впливу різних біологічно активних речовин на клітинному рівні.

Діагностичні можливості сучасних проточних цитометрів є практично безмежними, і одним із завдань молодих вчених-імунологів є якомога ширше використати їх у наукових та клінічних дослідженнях.

Контрольні питання:

1. Застосування проточного цитометра-«сортера» у наукових дослідженнях
2. Застосування проточної цитометрії для онкодіагностики
3. Імунофармакологія та проточна цитометрія
4. Багатокомпонентність діагностичної цінності методу проточної цитометрії

Використана література:

1. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: И-во РИО УрО РАН, 2011. – 220 с.

2. Микитюк О. Ю. Проточна цитометрія: фізичні основи та практичне застосування у медицині і біології / О. Ю. Микитюк // Вісник проблем біології і медицини. — 2015. — Вип. 2(1). — С. 214—217.
3. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa:Wydawnictwo naukowe PWN SA, 2017. – 497 s.
4. Spitzer M.H., Nolan G.P. Mass cytometry: single cells, many features. Cell 2016; 165; 780-791
5. Zidovec Lepej S., Vince A., Racusic S. et. al. Center for disease control (CDC) flow cytometry panel for human immunodeficiency virus infection allows recognition of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus or cytomegalovirus // Croat. Med. J., 2003. Vol.44, P.702-706.

Тема практичного заняття №2. Оцінка природженого та набутого імунітету в нормі та при патології – 2 год. (Х.О.Ліщук-Якимович)

Навчальна мета заняття: сформувати у лікарів-слухачів знання про сучасні підходи до оцінки природженого та набутого імунітету.

Професійно орієнтована мета заняття: навчити лікарів-слухачів інтерпретувати результати оцінки природженого та набутого імунітету.

Навчальні питання:

1. Основні підходи до правильного аналізу лейкограми.
2. Які зміни загального аналізу крові можуть вказувати на імунопатологію?
3. Етапність у проведенні лабораторної оцінки імунної системи.
4. Базові засади інтерпретації імунограми.

Короткий зміст теми заняття.

Одне з першочергових завдань сучасної імунології - це оцінка функціонування імунної системи в нормі і при патології. Складність цієї проблеми обумовлена багатокомпонентною організацією імунної системи, різноманітністю її структур на клітинному і молекулярному рівні, залежністю від регуляторних сигналів зі сторони нервової, ендокринної, кровоносної та багатьох інших систем організму. На жаль, в даний час не придумали єдиного тесту для оцінки роботи імунної системи в цілому.

Склад крові у кожної людини індивідуальний і може змінюватися залежно від різних біологічних процесів. Кількість лейкоцитарних клітин різного типу і рівня відображає спеціальна лейкоцитарна формула. Цей аналіз дозволяє оцінювати загальний стан здоров'я, а також здатний показувати

можливі відхилення. У дитячому віці, особливо при народженні, лейкоцитарна формула має невеликий зсув, який пояснюється незрілістю організму і процесами, що активно відбуваються в ньому. Підвищений рівень лімфоцитів (лімфоцитоз) може виникати в результаті наступних захворювань: вірусні та бактерійні інфекції: грип, кашлюк, краснуха, кір, туберкульоз; бронхіальна астма; вроджена схильність до алергії (алергічний дерматит); аутоімунні захворювання: хвороба Крона, хвороба Лайма. Значне перевищення кількості еозинофілів говорить про дві ймовірні патології: алергічна реакція, наприклад у дитини на молочні продукти, лактозу і глютен; глистні інвазії, що тривалий час знаходяться без лікування. Моноцитоз може бути причиною грибкових і вірусних захворювань; моноцитопенія розвивається на тлі нестачі в організмі вітамінів групи В, фолієвої кислоти і розвитку залізодефіцитної анемії. Нейтрофіліоз, при якому відзначається значне збільшення чисельності нейтрофілів в крові, може виникати як природна захисна реакція. Що характерно при великому запальному процесі. Нейтропенія виникає в результаті гормональних порушень або при наявності пригніченого нейтропоезу в кістковому мозку, інтоксикація, при якій новоутворені клітини не здатні повноцінно функціонувати в організмі. Базофілія явище досить рідкісне, яке розвивається лише в поодиноких випадках при наявності небезпечних патологій: туберкульозі лімфотичних вузлів, мієлолейкоз, онкологічні захворювання крові. Під час аналізу крові проводиться визначення абсолютних (Г/л) та відносних (%) показників клітин крові.

За даними лабораторії кафедри клінічної імунології та алергології Львівського медичного університету імені Данила Галицького в нормі абсолютне число лімфоцитів становить більше 1,2 Г/л, еозинофілів – більше 0,6 Г/л, нейтрофілів – більше 1,5 Г/л.

Загальні підходи до оцінки стану імунної системи: 1) універсальний спосіб оцінки полягає в аналізі імунограми в комплексі з оцінкою клінічної картини та даних фізикального та інструментального обстежень; 2) патогенетичний - в оцінці результатів дослідження окремих стадій імунної відповіді (стадії розпізнавання антигену; стадії активації лімфоцитів; стадії проліферації лімфоцитів; стадії диференціювання лімфоцитів; регуляції імунної відповіді); 3) системно-функціональний - в комплексній оцінці результатів обстеження 3-ох систем (системи фагоцитозу, гуморальної та клітинної ланки імунної системи).

Розроблені основні принципи інтерпретації імунограми на основі даних загального аналізу крові у повсякденній медичній практиці і досвіду використання імунограми клініцистами. В основу діагностики и прогнозування необхідно завжди ставити сукупність змін усіх показників лейкограми й імунограми. Один і той же кінцевий результат імунної реакції при однакових умовах може бути отриманим різною кількісною і якісною асоціацією компонентів імунної системи. В основі діагностики та прогнозування завжди слід встановити набір змін всіх показників лейкограма й імунограма. Результат

імунної відповіді за однакових умов може бути отриманий за допомогою різних кількісних і якісних комбінацій компонентів імунної системи.

Фундаментальні принципи інтерпретації імунограми.

Повний клінічний аналіз імунограми може здійснюватися лише разом з оцінкою клінічної картини захворювання у хворого і даних його історії хвороби та життя. Не можна зробити клінічний висновок, що базується на показниках тільки імунограми, тому що аналогічні показники можливі при принципово різних патологічних процесах.

Комплексний аналіз імунограм є більш інформативним, ніж аналіз одного показника. Однакові зміни певного показника у різні фази запального гострого процесу можна розглядати як сприятливі або несприятливі.

На достовірні зміни в імунограмі вказують суттєві порушення показників імунограми (на 40-50% більше/менше від норми). Лабільність показників імунограми, їх незначні коливання можливі в абсолютно здорових осіб.

Клінічні дані відіграють вирішальну роль, а імунограма несе допоміжну діагностичне та прогностичне значення. Відсутність змін в імунограмі при наявності клінічної картини патології вимагає вивчення функції окремих компонентів імунної системи.

Аналіз імунограми в динаміці (особливо порівняно з клінічною динамікою) є більш інформативним з точки зору як діагностики, так і прогнозу перебігу захворювання, допомагає уникнути помилкового тлумачення.

Діагностичне та прогнозоване значення мають індивідуальні показники норми в окремого пацієнта (враховуючи вік і наявність супутніх хронічних захворювання, шкідливих звичок, медикаментозної терапії).

Пріоритет при оцінці імунограми має співвідношення показників імунограми, а не їх абсолютні значення. Оцінюючи показники імунограми, необхідно врахувати можливість їх коливань через вживання їжі, фізичну активність, відчуття страху, часу доби.

Розбіжність змін у імунограмі і клінічної картини хвороби (синдром дисоціації) вказує на негативний розвиток процесу.

Чим вища антигенність чужерідного фактору і більша зона його проникнення, тим яскравішим буде запальний процес і відповідно будуть більш виражені зміни показників імунограми, що буде свідчити на користь адекватності реакції імунної системи. Відсутність вказаних змін у лейко- й імунограмі – несприятливий симптом, який свідчить про неадекватність роботи імунної системи.

Своєчасне розпізнавання такої невідповідності є головною задачею клінічного імунолога.

Етапи проведення лабораторної оцінки імунної системи:

1-й етап – виявлення грубих дефектів імунної системи (визначення кількості Т- та В-лімфоцитів, визначення концентрації IgA, IgG, IgM, активності фагоцитозу).

2-й етап – визначення функціональної активності Т-, В-, НК-лімфоцитів, фагоцитів.

Підвищення показників гуморального (В-клітинного) імунітету спостерігається у другій стадії запального процесу, особливо при привірусних інфекціях (асоціюється із збільшенням лімфовузлів); при затяжних запальних процесах, тиреотоксикозі, гострому та хронічному лейкозі тощо. Зниження кількісних показників В-лімфоцитів спостерігається при вроджених імунодефіцитах (антитілозалежних та комбінованих); при вторинних/набутих імунодефіцитах зниження цієї популяції лімфоцитів зустрічається порівняно рідко, і може мати складнішу інтерпретацію. Прогностичне значення дефекту гуморальної ланки імунної системи полягає в наступному: тривале збільшення кількості В-лімфоцитів свідчить про продовження запального процесу.

Захворювання, при яких необхідно визначати сироваткові імуноглобуліни: 1) мієломна хвороба з моноклональною парапротеїнемією; 2) автоімунний хронічний гепатит; 3) системні автоімунні хвороби; 4) алергічні хвороби; 5) інфекційні хвороби.

Наступним кроком у обстеженні антитілопродукуючої здатності В-лімфоцитів повинно бути визначення специфічних імуноглобулінів/антитіл (залежно від патології).

Підвищення показників фагоцитозу частіше всього супроводжує гострі та хронічні бактерійні інфекції, хронічні запальні стани. Зниження показників фагоцитозу може бути також при хронічних рецидивуючих бактерійних та грибкових інфекціях, вроджених імунодефіцитах, автоімунних хворобах тощо.

Загальні правила інтерпретації імунограми:

- комплексний аналіз імунограми є більш інформативним, ніж оцінка кожного окремого показника;
- повноцінний клінічний аналіз імунограми можна проводити лише в комплексі з оцінкою клінічної картини захворювання та даних анамнезу;
- реальну інформацію про зміни в імунограмі несуть лише значні відхилення показників від нормативних ($\pm 20-40\%$ та більше);
- для діагностичної та прогностичної оцінки імунограми важливе значення мають індивідуальні показники норми в даного хворого з урахуванням віку, супутніх захворювань, стадії даного захворювання та характеру лікування;
- аналіз імунограми, особливо при виявленні відхилень від норми, має проводитися повторно, у динаміці в одній і тій самій лабораторії з використанням нормативів, які використовують у роботі даної імунологічної лабораторії;
- найбільшу практичну цінність при оцінці імунограми мають співвідношення показників імунограми, а також їхні абсолютні значення;
- при оцінці показників імунограми слід насамперед виключити можливість їх коливання у зв'язку із вживанням їжі, медикаментів, фізичними навантаженнями, гострими інфекційними захворюваннями, відчуттям страху, часом доби, порою року; існують

регіональні коливання нормативів вмісту окремих імунологічних показників;

- окрім діагностики, диференціальної діагностики імунної недостатності та імунодефіцитних захворювань, клінічний аналіз імунограми має велике значення для визначення типового патофізіологічного процесу, що відбувається в організмі хворого (запалення, пухлинний ріст, алергія), та його перебігу, контролю ефективності лікування низки автоімунних, алергічних, мікробно-запальних та інших захворювань.

При проведенні оцінки імунограми з несприятливим прогнозом необхідно акцентувати увагу на наступних показниках:

- під час гострого запального процесу трансформація абсолютної нейтрофілії у нейтропенію, а також зворотнє явище – перехід нейтропенії у нейтрофілію;
- різке зниження кількості лейкоцитів, проозвук лейкопенії у поєднанні з агранулоцитозом;
- зменшення загальної кількості лейкоцитів, посилення зсуву вліво до молодих форм гранулоцитів на тлі зниження кількості еозинофілів, лімфоцитів, моноцитів, зменшення числа Т-лімфоцитів, підвищення кількості НК-клітин, високої адгезивної здатності фагоцитів та зниження активності фагоцитозу. Все це вказує на вкрай несприятливий перебіг захворювання;
- прогресування нейтрофілії на тлі виразного лейкоцитозу, зсуву лейкоформули вліво, підвищення кількості НК-клітин, Т-регуляторних лімфоцитів, посилення адгезивної здатності нейтрофілів, зниження кількості еозинофілів, лімфоцитів, Т-лімфоцитів, активності фагоцитозу нейтрофілів. Такі комплексні зміни імунограми вказують на надмірне напруження функціонування імунної системи, її зрив і неефективність захисту організму;
- при маніфестації деяких інфекцій (грип, черевний тиф, паратиф) спостерігається лімфоцитоз, пов'язаний з токсичним ураженням нейтрофілів, і, як наслідок, нейтропенією; наростання в динаміці захворювання лімфоцитозу вважається несприятливою ознакою;
- при хронічних інфекціях, сепсисі, онкопатології лімфопенія після лімфоцитоз без регресії клінічних симптомів відноситься до несприятливого прогнозу і вказує на формування більш важкої фази патологічного процесу.

До сприятливих прогностичних критеріїв імунограми відносяться: 1) зменшення інтенсивності нейтрофільного лейкоцитозу вказує на початок ремісії; 2) зменшення загальної кількості лейкоцитів у поєднанні із зменшенням нейтрофільного зсуву лейкоформули вліво, підвищення вмісту еозинофілів, лімфоцитів (в т. ч. Т- і В-лімфоцитів), моноцитів на тлі зниження числа НК-клітин та активації фагоцитозу; 3) показником клінічного видужання є

підвищення вмісту лімфоцитів на тлі зниження кількості нейтрофілів (нейтрофіліоз змінюється на лімфоцитоз).

Наведені приклади інтерпретації окремих імунологічних показників можуть залежати від індивідуальних особливостей імунної відповіді організму та від якості проведеного лабораторного аналізу. Лабораторне обстеження імунної системи надає лікареві вищий рівень розуміння багатьох імунних порушень, але в жодному випадку не може бути єдиною підставою для постановки діагнозу чи призначення імунотерапії.

Контрольні питання:

1. Загальні підходи до оцінки стану імунної системи.
2. Загальні правила інтерпретації лейкограми.
3. Загальні правила інтерпретації імунограми.
4. Які біологічні матеріали використовуються для оцінки стану імунної системи людини?
5. Перерахуйте основні методи оцінки процесів розпізнавання, активації, проліферації, диференціювання, регуляції імунної відповіді.
6. Сприятливі та несприятливі прогностичні критерії лейкограми та імунограми.

Використана література:

1. Derkacz A, Olczyk P, Komosinska-Vassev K. Diagnostic Markers for Nonspecific Inflammatory Bowel Diseases. *Dis Markers*. 2018 Jun 11;2018:7451946. doi: 10.1155/2018/7451946. PMID: 29991970; PMCID: PMC6016179.
2. *Advanced Concepts in Human Immunology: Prospects for Disease Control: Prospects for Disease Control 1st ed. 2020 Edition* by Pooja Jain (Editor), Lishomwa C. Ndhlovu (Editor). Springer International Publishing. – XVIII, 403
3. *Cellular and Molecular Immunology. 9th Edition.* Abul Abbas Andrew Lichtman Shiv Pilla. Elsevier. – 2017. – 608p.
4. *Immunology Laboratory Testing, An Issue of the Clinics in Laboratory Medicine (Volume 39-4) (The Clinics: Internal Medicine, Volume 39-4).* Vinay Subash Mahajan. Elsevier. – 2019. – 240 p.
5. *Medical Immunology, 7th Edition* 7th Edition by Gabriel Virella (Editor). – CRC Press. – 2019. – 478 p.

Тема практичного заняття №3 «Особливості введення моноклональних лікувальних антитіл. Імуноглобулінотерапія» – 2 год. (Бойко)

Навчальна мета заняття: сформувати у аспірантів сучасні знання про використання моноклональних антитіл у та імуноглобулінів для внутрішньовенного введення у практичній медицині.

Професійно орієнтована мета заняття: навчити аспірантів визначати показання до призначення таргетної терапії моноклональними антитілами у хворих з онкологічними, ревматологічними, гематологічними та іншими хворобами.

Навчальні питання:

1. Загальна характеристика препаратів моноклональних антитіл.
2. Будова препаратів моноклональних антитіл.
3. Особливості застосування моноклональних антитіл в онкології.
4. Моноклональні антитіла в ревматології: механізми дії, покази до застосування.
5. Застосування моноклональних антитіл для лікування остеопорозу.
6. Особливості терапії моноклональними антитілами хворих на розсіяний склероз.
7. Ефективність моноклональних антитіл при хворобі Альцгеймера.
8. Моноклональні антитіла в якості антидотів до пероральних антикоагулянтів.
9. Моноклональні антитіла при біологічній терапії бронхіальної астми.

Короткий зміст теми заняття

Моноклональні антитіла — це антитіла, які виробляються ідентичними імунними клітинами, які клоновані з однієї клітини-попередника (В-лімфоцита), які специфічні до одного антигену. Моноклональні антитіла можуть вироблятися проти будь-якого природного антигену, який можуть зв'язувати дані антитіла. Моноклональні антитіла можуть використовуватись як для виявлення специфічного антигену в організмі, так і для його зв'язування та його знешкодження. Найбільш широко моноклональні антитіла застосовуються в медицині для діагностики (зокрема, різних гематологічних захворювань), та для лікування різноманітних онкологічних, ревматологічних, деяких неврологічних захворювань (зокрема, розсіяного склерозу), хвороби Альцгеймера, остеопорозу, виразкового коліту, хвороби Крона, пульмонологічних захворювань, а також у трансплантології для профілактики реакції відторгнення трансплантату.

За походженням моноклональні антитіла поділяють на мишині, химерні, гуманізовані і людські антитіла. Химерні антитіла – це особливий тип терапевтичних антитіл, отриманих як комбінація генетичних інгредієнтів від людей і мишей. В цих антитілах константні домени обох ланцюгів мишей замінені константними доменами імуноглобуліну людини. Гуманізовані антитіла є на 95% людського походження. Тільки гіперваріабельні ділянки, які відповідають за комплементарну взаємодію з антигеном, мають мишаче походження. Повністю людські антитіла були отримані із застосуванням методу «фагового дисплею».

Моноклональні антитіла в онкології. В останні роки досягнутий успіх в лікуванні пацієнтів зі злоякісними пухлинами завдяки розробці препаратів цілеспрямованої дії. Вважається, що мішенями таргетної терапії є молекули, які відіграють важливу роль в трансформації клітин та визначають властивість і ступінь злоякісності пухлин. Однією з подібних мішеней є рецептор епідермального фактору росту 2-го типу, експресія якого спостерігається при раку молочної залози, кишечника, стравоходу, сечового міхура. Людські епідермальні рецептори позначають аббревіатурою HER (Human Epidermal Receptor). Вони розташовані на мембранах клітин нормальних тканин і пухлин. Кількість HER-рецепторів в пухлинах перевищує їх кількість в нормальних тканинах. Використовують препарат трастузумаб (герцептин), який представляє собою рекомбінантні гуманізовані моноклональні антитіла, які скеровані на інгібування їх позаклітинного домена (anti_HER-2-monoclonal antibodies). Іншим варіантом позаклітинного домену є протидія димералізації HER-рецептору, головним чином HER-3(HER-dimerization inhibitor). Цей механізм – основа таргетного впливу препарату пертузумаб – гуманізованих моноклональних антитіл, які пригнічують зв'язок HER-2-рецепторів з іншими рецепторами HER-сім'ї. Найбільш відомим препаратом для лікування раку молочної залози серед таргетних лікарських засобів вважають трастузумаб в зв'язку з високою частотою експресії HER-2 в клітинах залози. Одним з найбільш серйозних онкологічних захворювань є рак яєчників, що пов'язують з високою продукцією клітинами яєчників фактору росту ендотелію судин (VEGF). Саме пониження експресії VEGF асоціюють зі зменшенням тривалості життя і тому в комплексну терапію раку яєчника включають бевацизумаб, що собою являє рекомбінантне гуманізоване моноклональне антитіло до VEGF, зв'язує і нейтралізує біологічно активну лізоформу фактору росту ендотелію.

Моноклональні антитіла в ревматології. Завдяки препаратам моноклональних антитіл проводять цілеспрямовану терапію аутоімунних хворіб дитячого та дорослого віку. Застосування таких препаратів дає можливість досягати ремісії

у тих хворих на аутоімунні захворювання, які раніше не відповідали на традиційну базову терапію, і тим самим запобігти подальшому розвитку їхньої інвалідизації. У світі схвалені до лікування хворих на ревматоїдний артрит химерні моноклональні антитіла до TNF- α (інфліксимаб), а також цілковито людські рекомбінатні моноклональні антитіла до TNF- α (адаліумаб і голіумаб) та зв'язаний білок, що складається з двох рецепторів розчинного рецептора TNF- α (етанерцепт).

Адаліумаб, голіумаб й інфліксимаб виявилися ефективними у лікуванні хронічних запальних захворювань кишківника, в той час як етанерцепт при цих захворюваннях є неефективним. Етанерцепт, адаліумаб і голіумаб можна самостійно вводити підшкірно в домашніх умовах. Через високу ймовірність розвитку побічних реакцій при введеннях інфліксимабу його слід вводити лише у стаціонарних умовах. Етанерцепт і адаліумаб були схвалені для лікування дітей із ЮІА американською FDA і ЕМА (Європейське Медичне Агентство), в той час як інфліксимаб дозволений тільки для лікування хвороби Крона у дітей.

У світі існують три різних інгібітори ІЛ-1 β шляху: анакінра, канакінумаб, рілоцепт. Тоциліумаб – це гуманізовані антитіла до ІЛ-6 рецептора, які блокують утворення комплексу ІЛ-6 з рецептором до ІЛ-6. Встановлено, що ефект тоциліумабу реалізується через одночасне пригнічення мембранозв'язаної та розчинної форм рецепторів до ІЛ-6.

Блокада Т-клітинної активації. Т-клітинна активація відіграє важливу роль у запальних процесах при аутоімунних хворобах у дітей. У процесі імунної відповіді для здійснення Т-клітинної активації необхідне зв'язування Т-клітинних рецепторів із антигенами головного комплексу гістосумісності на антигенпрезентуючій клітині (АПК), а також необхідний костимулюючий сигнал, який передається під час зв'язування білків CD28 на поверхні Т-лімфоцита з білком CD80/86 на поверхні АПК. На відміну від антагоністів TNF- α , клінічний ефект препарату розвивається із затримкою та збільшується з продовженням терапії упродовж кількох місяців.

Моноклональні антитіла в лікуванні остеопорозу. В молекулярних механізмах синтезу моделювання кісток застосовують нові технології. Сигнальний шлях, що запускається лігандами рецепторів до ядерного фактору кВ (RANKL), лежить в основі патогенезу остеопорозу, допомагає створювати новий клас препаратів, які сприяють досягненню ремісії. Моноклональні антитіла, що склали елемент таргетної терапії остеопорозу були першими представниками таргетних засобів, які є високо специфічними людськими

антитілами до імуноглобуліну (IgG2) з високим ступенем афінитету до людського активатору ядерного фактору κВ (RANKL).

Моноклональні антитіла для лікування розсіяного склерозу. Є відомості про успішне застосування моноклональних антитіл до білку CD52, а також Т- та В-лімфоцитів. Певну ефективність має доклізумаб/гуманізоване моноклональне антитіло до альфа-субодиниць ІЛ-2, яке розташоване на лімфоцитах CD-25. Окрелізумаб є гуманізованим моноклональним антитілом, яке вибірково виснажує білки CD20, що експресуються В-клітинами та зберігають здатність до відновлення В-клітин, а також існуючого клітинного імунітету. Окрелізумаб зв'язується з великою позаклітинною петлею CD-20 з високою афінністю та вибірково зменшував кількість CD20 експресуючих В-клітин, зберігаючи здібність до відновлення В-клітин та гуморального імунітету. Зниження кількості В-клітин досягалося за рахунок клітинних механізмів, в тому числі антитілонезалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності, комплементзалежної цитотоксичності та індукції апоптозу.

Ефективність моноклональних антитіл при хворобі Альцгеймера. Однією з патогенетичних теорій хвороби Альцгеймера є акумуляція амілоїду-β пептиду, що веде до синаптичної дисфункції, нейродегенерації та відповідної симптоматики. Адуканумаб – повністю людське IgG1 моноклональне антитіло, селективно реагує з агрегатами амілоїду-β, включаючи розчинні олігомери та нерозчинні фібрили. Препарат зв'язується з N групами залишків і змінює порядок мономерів β-амілоїду.

Моноклональні антитіла в якості антидотів до нових пероральних антикоагулянтів. Одним з перших був досліджений специфічний антидот до прямого інгібітору тромбіну дабігатрану під назвою ідаруцизумаб. Ідаруцизумаб є фрагментом моноклонального антитіла (Fab), що зв'язує дабігатрин в 350 разів сильніше, ніж дабігатран зв'язується з тромбіном. Він не впливає на згортання крові і функцію тромбоцитів. Сучасний ідаруцизумаб схвалений для застосування в клінічній практиці США і ЄС як специфічний препарат, який нейтралізує антикоагулянтну дію дабігатрану.

Моноклональні антитіла як гіполіпідемічні засоби. Еволокумаб був ефективний у хворих з гомо- та гетерозиготною формами гіперхолестеринемії, його прийом призводить до регресії атеросклеротичної бляшки. Прийом еволокумабу встановив, що тривалий гіполіпідемічний ефект препарату не став слабшим, не асоціювався з ризиком розвитку ускладнень, не порушував нейрокогнітивну функцію.

Моноклональні антитіла при біологічній терапії бронхіальної астми. При тяжкій бронхіальній астмі рекомендована комбінована фармакотерапія, в тому числі з включенням біологічних препаратів, зокрема гуманізованих моноклональних антитіл до імуноглобуліну E (омалізумаб) і гуманізованих моноклональних антитіл до інтерлейкіну 5 (меполізумаб і реслізумаб). Омалізумаб був першим біологічним препаратом, рекомендованим для лікування тяжкої алергічної бронхіальної астми, обумовленої дією імуноглобуліну E. Це гуманізоване моноклональне антитіло до FeeRI-зв'язуючого домену людських IgE. Селективно зв'язуючись з вільними молекулами IgE, омалізумаб перешкоджає їх об'єднанню зі специфічними рецепторами, передусім високо афінними рецепторами (FeeRI) на тучних клітинах, базофілах, лейкоцитах. Це веде до пригнічення експресії вказаних рецепторів на клітинах і зрештою до зниження експресії медіаторів алергічного запалення та його редукції. Меполізумаб – препарат гуманізованих моноклональних антитіл до інтерлейкіну-5, який селективно інгібує еозинофільне запалення, редукує кількість еозинофілів, як у мокротинні, так і в крові, зв'язуючись з ІЛ-5, меполізумаб перешкоджає його взаємодії з рецептором ІЛ-5R, тим самим блокуючи ефекти ІЛ-5.

Таким чином, завдяки досягненням генної інженерії був отриманий новий клас препаратів моноклональних антитіл, які сприяли розробці сучасних ефективних схем лікування багатьох захворювань.

Внутрішньовенний імуноглобулін (ВІГ) отримують з фракціонованої холодним етанолом плазми крові, він складається на 90% з імуноглобулінів класу G (IgG), який майже весь є мономером. У препараті ВІГ можлива наявність невеликої кількості імуноглобулінів інших класів, наприклад IgA та IgM, і протеїнів сироватки. Додавання цукрів, амінокислот та альбуміну до препарату стабілізує IgG від агрегації. Наявність у препараті інтактних Fc-фрагментів опосередковує його функції, а саме: 1) опсонізацію та фагоцитоз; 2) активацію системи комплементу; 3) антитілозалежну цитотоксичність. Також IgG у препараті внутрішньовенного імуноглобуліну мають триваліший фізіологічний період порівняно із сироватковим і фізіологічну пропорцію між його підкласами. Препарат ВІГ містить широкий спектр антитіл із специфічною біологічною активністю щодо ряду мікроорганізмів.

Практично всі комерційні препарати ВІГ (Baxter Healthcare Corp., Talecris Biotherapeutics, ZLB Behring LLC, GrifolsOctapharma, Biopharma і т.п.) виробляють із крові, яку отримують в середньому від 10-ти тисяч донорів (залежно від фірми-виробника). Донорська плазма витримується протягом 6-ти місяців. Хоча немає загальної стандартизації для титру антитіл у ВІГ проти антигенів найпоширеніших патогенних інфекцій, як наприклад Str. pneumonia і

Наemorh. influenza, проте кожна доза повинна містити відповідні рівні антитіл до потенційно патогенних мікроорганізмів. Заключним етапом стерилізації препарату ВІГ є обробка розчинниками та детергентами, пастеризація та нанофільтрація. Крім цього, препарат проходить певні етапи вірусної безпеки, а саме капілярну преципітацію, інкубацію при низькому рН, глибинну фільтрацію та преципітацію в поетиленгліколі.

Препарати ВІГ використовують у замісній терапії пацієнтів з первинними дефектами антитілоутворення, а також при інших імунопатологічних синдромах і хворобах – автоімунних, запальних, інфекційних та алергічних. Хоча застосування ВІГ є широким, але далі розробляються та корегуються схеми його призначення, а також триває пошукова робота з метою створити нову генерацію цих препаратів, які будуть ще краще здійснювати імуномодулюючу дію. Основними імуномодуляторними ефектами препаратів ВІГ є: 1) опосередковані Fc-фрагментами: блокада Fcγ-рецепторів, модуляція їх афінності, активація інгібуючого FcγIIβ-рецептора, підсилення катаболізму автоантитіл, пригнічення активації комплементу, блокування C3b і C4b-компонентів на клітинах – «мішенях», запобігання формуванню мембраноатакуючого комплексу C5b-9, нейтралізація анафілатоксинів C3a і C5a; 2) вплив на дендритні клітини – інгібування їх дозрівання та диференціації, модуляція продукції ними цитокінів; 3) вплив на Т-лімфоцити регуляторно-супресорні – стимуляція активності FoxP3; 4) регуляція апоптозу – бо ВІГ містить антитіла анти-Fas, які блокують апоптоз; 5) здійснення протизапального ефекту – модуляція протизапальних цитокінів IL-1β, TNF-α, нейтралізація бактерійних токсинів, інгібіція Р-селектинзалежного «перекочування» та β2-інтегринзалежної адгезії, зниження міграції лейкоцитів до місця запалення; 6) вплив на В-лімфоцити та продукцію антитіл, нейтралізація аутоантитіл ідіотипічними антитілами, посилення розчинності імунних комплексів; 7) вплив на Т-лімфоцити – нейтралізація Т-клітинних суперантигенів, модуляція продукції цитокінів.

Контрольні питання:

1. Якою є будова та механізми імуотропної дії препаратів моноклональних антитіл та імуноглобулінів для внутрішньовенного введення?
2. Якими є таргетні молекули для моноклональних антитіл в онкології?
3. Якими є механізми дії, покази до застосування біологічних препаратів у ревматології дитячого та дорослого віку?
4. Які моноклональні антитіла застосовують у терапії остеопорозу?
5. Якими є особливості терапії моноклональними антитілами хворих на розсіяний склероз?

6. Якою є ефективність лікування моноклональними антитілами хвороби Альцгеймера?
7. Які моноклональні антитіла використовують в якості антидотів до пероральних антикоагулянтів?
8. Якими є особливості застосування моноклональних антитіл та імуноглобулінів для внутрішньовенного введення для терапії бронхіальної астми?

Використана література:

1. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Шумейко О. В., Клименко О. В., Ходаківська О. В. Спектр фармакологічної активності моноклональних антитіл. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019; Том 4, № 5 .
2. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. Иммуноглобулины и иммуноглобулинотерапия: монография / Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. – К., В-во «Фенікс», 2010. – 208 с.
3. Чопяк В.В. Доказова імунопрофілактика та імунотропна терапія: монографія / В.В.Чопяк – Львів: В-во «Апріорі», 2013. – 336 с.
4. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nature reviews drug discovery. 2010; 9(10): 767-74. PMID: 20811384. DOI:10.1038/nrd3229
5. Bernett MJ, Karki S, Moore GL, Leung IW, Chen H, Pong E, Desjarlais JR. Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions. Journal of molecular biology. 2010; 396(5): 1474-90. PMID: 20045416. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.12.046
6. Lin W, Kurosawa K, Murayama A, Kagaya E, Ohta K. B-cell display-based one-step method to generate chimeric human IgG monoclonal antibodies. Nucleic acids research. 2010; 39(3): e14. PMID: 21062829. PMCID: PMC3035438. DOI: 10.1093/nar/gkq1122
7. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. MAbs. 2010; 2(3): 256-65. PMID: 20400861. PMCID: PMC2881252. DOI: 10.4161/mabs.2.3.11641
8. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Clark, E. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. New England Journal of

Medicine. 2014; 366(2): 109-19. PMID: 22149875. PMCID: PMC5705202. DOI: 10.1056/NEJMoa1113216

9. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. Nature Reviews Rheumatology. 2016; 12(1): 49. MID: 26656660. PMCID: PMC4809675. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.169.

10. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2012 / D.E. Furst, E.C. Keystone, A.K. So [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2013. – Vol. 72 (Suppl. 2). – ii2-ii34.

Тема практичного заняття №4 «Алерговакцини в практичній медицині» – 2 год. (С.О.Зубченко)

Навчальна мета заняття: сформувати у аспірантів сучасне уявлення про алерговакцини, які використовуються для проведення алергенспецифічної імунотерапії.

Професійно-орієнтована мета заняття: навчити аспірантів основним механізмам дії алерговакцин, методикам введення вакцин і принципам вибору алерговакцини з прогнозуванням її ефективності.

Навчальні питання:

1. Основні принципи лікування алергічних хвороб.
2. Алергенімуноterapia – як метод впливу на етіологічні і патогенетичні ланки формування алергічних хвороб .
3. Механізм дії алерговакцинації.
4. Вимоги до алерговакцини.
5. Способи введення алерговакцини і оцінка їх ефективності.

Короткий зміст теми заняття:

Терапія алергічних хвороб (АХ) повинна бути комплексною, спрямованою на різні етіологічні та патогенетичні ланки, і в першу чергу - на усунення контакту з причинно-значущими алергенами, запобігання повторного контакту з ними, зворотний розвиток гострої фази алергічного відповіді і зниження запальної відповіді. Власне у напрямку впливу на етіопатологічні механізми формування АХ працює алергенімуноterapia (АІТ). На сьогодні АІТ продемонструвала ефективні результати при лікуванні таких ІgЕ-залежних АХ, як atopічна БА, АР як сезонний, так і цілорічний, інсектна алергія і є порівняно новим інструментом у лікуванні деяких видів харчової алергії. Рандомізовані контрольовані дослідження показали, що АІТ алергенами запобігає розвитку БА у пацієнтів з АР. Є деякі докази ефективності імунотерапії при лікуванні

пацієнтів з АД і сенсibiliзацією до респіраторних алергенів. Тому, при наявності показань і відсутності протипоказань першочергово вирішується питання про призначення АІТ.

Механізм дії АІТ полягає у введенні пацієнтам із попередньо діагностованими ІgЕ-залежними АХ зростаючих доз алергену, винного у розвитку симптомів захворювання (рисунок 1). Мета АІТ - зниження чутливості організму до причинно-значущого алергену, яка проявляється у зменшенні або в повній відсутності клінічних симптомів при контакті з алергеном після закінчення курсу терапії. Сучасні фармакологічні симптоматичні препарати не дозволяють змінити характер реагування організму на причинно-значущі алергени або змінити активність регуляторних клітин імунної системи. У зв'язку з цим, при припиненні прийому медикаментозних препаратів захворювання продовжує розвиватися і неможливо попередити його перехід у більш тяжкі клінічні форми. У цьому контексті АІТ має низку переваг, оскільки впливає на патогенетичні ланки алергічного процесу і має тривалий профілактичний ефект після завершення курсів лікування.

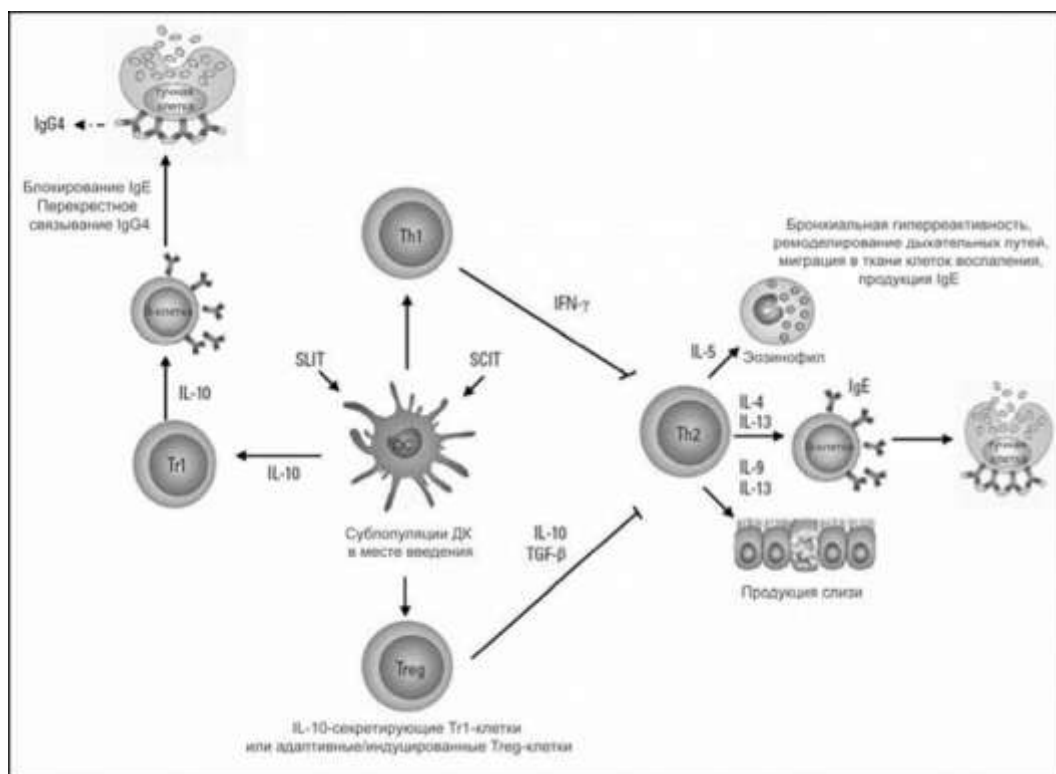


Рисунок 1.

Схема механізмів алергенімунотерапії. *Примітка:* SLIT – сублінгвальна імунотерапія; SCIT - підшкірна імунотерапія; Treg - Т-регуляторні клітини; TGF-β - трансформуючий фактор росту-β; IFN-γ - інтерферон-γ; DC (дендритна клітина) (за Аккос Т et al. Allergy Asthma Immunol. Res. - 2011)

Ефективність АІТ безпосередньо залежить від грамотної діагностики АХ (підтвердженого зв'язку між експозицією алергену, симптомами хвороби і ІgЕ-залежним механізмом розвитку захворювання), дотримання показань і протипоказань до введення АІТ, якості комерційної стандартизованої вакцини і прихильності пацієнта щодо проведення тривалої терапії під контролем лікаря-алерголога. Імунологічні зміни, пов'язані з АІТ, складні, і точний механізм, або механізми, відповідальні за її клінічну ефективність, безперервно оновлюються. У першу чергу імунологічна реакція на проведення АІТ характеризується зменшенням чутливості ефекторних органів і зміною в гуморальних і клітинних реакціях імунної системи на застосовані алергени. Пригнічення реакції ефекторних органів при АІТ включає зменшення вираженості ранніх і пізніх реакцій шкіри, кон'юнктиви, слизової верхніх і нижніх дихальних шляхів у відповідь на алерген; зменшення інфільтрації цих тканин еозинофілами, базофілами і тучними клітинами; пригнічення набряку слизових оболонок і скорочення неспецифічної бронхіальної чутливості до гістаміну. Імуноterapia завершується формуванням імунологічної толерантності, яка визначається відносним зменшенням специфічної до антигену реактивності і може бути пов'язана з імунним відхиленням, Т-лімфоцитарною анергією і/або Т-лімфоцитарним апоптозом. Успішна імуноterapia призводить до формування клону регуляторних Т-лімфоцитів, які експресують маркери CD4⁺CD25⁺, що відбувається протягом днів або тижнів. Регуляторні Т-лімфоцити виробляють цитокіни ІL-10, TGF- β із супресивною активністю. У дослідженнях низки авторів власне синтез таких регулюючих цитокінів був описаний при імунотерапії отрутою *Humenoptera*, пилковими екстрактами трави, екстрактами кліщами домашнього пилу. ІL-10 зменшує продукцію В-лімфоцитами специфічних до алергену ІgЕ і підвищує рівень ІgG4; знижує вивільнення прозапальних цитокінів тучними клітинами, еозинофілами і Т-лімфоцитами; сприяє індукції толерантності Т-лімфоцитів шляхом вибіркового гальмування CD28-опосередкованого костимулюючого шляху. Як наслідок, лімфопроліферативна реакція на алерген після початку імунотерапії зменшувалась.

На сучасному етапі розвитку імунотерапії широкого застосування набули модифіковані алергени – алергоїди, полімеризовані з глютеральдегідом. Їхні переваги над нативними алергенами полягають (рисунок 2):

- нативні алергени: дегрануляція тучних клітин і базофілів. Презентація антигена, опосередкована ІgЕ, спричиняє збільшення виробництва Th2 і ІgЕ
- модифіковані алергени: менша кількість епітопів ІgЕ. Вони використовують фагоцитарну / піноцитарну систему презентації антигену (поглинання антигену) дендритними клітинами та моноцитами / макрофагами: генерація

збалансованої структури цитокінів Th0 / Th1 типу, синтез В клітинами пам'яті імуноглобулінів IgG.

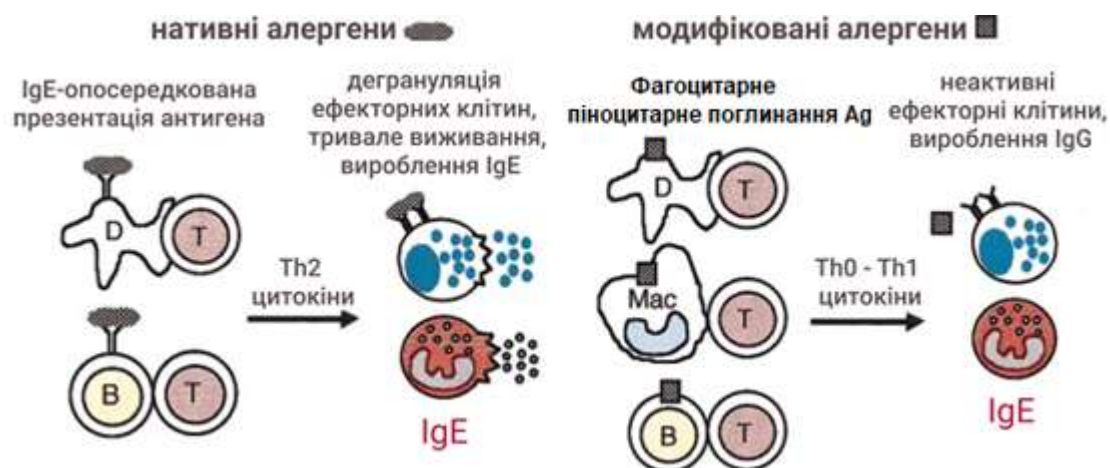


Рисунок 2.

Відмінності в презентації антигена між нативними та модифікованими алергенами Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy 2000;55(6):522-30

Таким чином, алергоїди мають більшу молекулярну масу, що забезпечує зменшення їх алергенності, дозволяє використовувати вищі дози та прискорені схеми введення алерговакцин; меншу здатність зв'язувати IgE, однакове (порівняно з нативними алергенами) зв'язування IgG і розпізнавання клітин, що підтримує їхню імуногенність; зменшення активності ферментів, що дає можливість використовувати суміші.

Існують різні методи введення алерговакцини. Донедавна для АІТ використовували оральний чи субкутаний (СКІТ) метод введення алерговакцини. В останні роки експерти WAO відзначають підвищений інтерес до альтернативних неінвазивних методів введення алергену під язик – СЛІТ (сублінгвальний), при якому алерген дається або у вигляді розчинної таблетки або у вигляді рідкого екстракту і всмоктується через багату судинами лімфатичну мережу рота. Науковці та клініцисти вважають, що значною перевагою СЛІТ є набагато нижчий ризик анафілактичної реакції порівняно зі СКІТ. Поява сублінгвальної імунотерапії поставила низку проблем із відпрацювання доз і схем лікування. Загалом, клінічна ефективність СКІТ і СЛІТ методів лікування, схожа, але потенційні відмінності в задіяних імунологічних механізмах до кінця не вивчені.

У більшості наукових досліджень було продемонстровано високу ефективність і безпеку на тлі незначних побічних ефектів більшою мірою локального характеру, причому, незалежно від способу введення вакцини. Визначено також, що кожен зі способів введення алерговакцини мав низку

недоліків і переваг, тому вибір способу є персоніфікованим. Доведено, що АІТ була і на сьогодні залишається єдиним етіологічним методом лікування пацієнтів з АХ як серед дорослих, так і серед дитячої популяції. Однак, незважаючи на позитивні клінічні ефекти, автори висказали, що загальним недоліком для алерговакцинації є тривалість, вартість та доступність ліків для пацієнтів, а також прихильність пацієнта до даного виду терапії.

В Україні для проведення АІТ використовують також вакцини для СКІТ - АЛКСОЇД (суміш полімеризованих екстрактів алергенів) і для СЛІТ - ОРАЛТЕК (Суміш алергенів)

Механізм їх дії: ОРАЛТЕК (Суміш алергенів), АЛКСОЇД (суміш полімеризованих екстрактів алергенів) застосовується для лікування пацієнтів зі специфічною IgE-опосередкованою алергічною реакцією на різні алергени із такими симптомами, як риніт та ринокон'юнктивіт. Мішенню фармакодинамічного впливу є імунна система. Завданням є модифікація імунної реакції на алергени, якими лікують пацієнта. Лікування препаратами сумішшю алергенів чи сумішшю полімеризованих екстрактів алергенів спричиняє системну конкурентну відповідь антитіл на різні алергени, що супроводжується поступовим зростанням продукування специфічних IgG впродовж 2 років лікування і більше.

Перспективаю АІТ є:

- алергоїдна вакцинація (Інструкції з прискореної та кластерної імунотерапії);
- Т-клітинні епітопні вакцини;
- рекомбінантні алергенні вакцини;
- вакцини на основі комбінації ад'юванта та алергену;
- наночастинні вакцини;
- комбіноване лікування імуномодуляторами;
- нові способи введення алерговакцин.

Необхідно пам'ятати, що лікування алерговакцинами проводиться тільки в медичній установі, обладнаній засобами надання невідкладної медичної допомоги при виникненні анафілактичного шоку, зокрема, забезпечено наявність адреналіну та серцево-легеневої реанімації.

Контрольні питання:

1. Алергенімуноterapia – як єдиний метод впливу на етіологічні і патогенетичні ланки формування алергічних хвороб.
2. Основні механізми дії алерговакцинації.
3. Недоліки і переваги різних способів введення алерговакцини на підставі даних літературних оглядів.

4. Оцінка ефективності алергенімунотерапії з використанням різних алерговакцин.
5. Сучасні види алерговакцин, які використовуються в Україні.
6. Перспективи АІТ.

Використана література:

1. Norman Ph.S. A review of immunotherapy. *Allergy*.2007;33(2):62-70. O. Pfaar, S. Bonini, V. Cardona et al. Guideline on Allergen-specific Immunotherapy in IgE-mediated Allergic Diseases. *J Int Allergo*. 2014;23:282-319.
2. S. Dhami, U. Nurmatov, I. Agache et al. Dhami, S. Allergen immunotherapy for allergic asthma: protocol for a systematic review. *Clin Transl Allergy*. 2016(5):5. O. Pfaar, P. Creticos. Ragweed sublingual tablet immunotherapy: part II - practical considerations and pertinent issues. *Immunotherapy*. 2018(10)17-26.
3. L. Ahlbeck, E. Ahlberg, U. Nystrom et al. Intralymphatic allergenimmunotherapy against pollen allergy. A 3year open follow-up studyof 10 patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;5:626-627. M. Akdis. New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J*. 2014;7:23
4. Jungsoo Lee, Chang Ook Park, Kwang Hoon Lee. Specific Immunotherapy in Atopic Dermatitis *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016 May;7(3):221-229. <http://dx.doi.org/10.4168/aaair.2015.7.3.221> pISSN 2092-7355.
5. Б. М. Пухлик, І. В. Гогунська, І. В. Корицька, О. К. Яковенко. Ефективність специфічної імунотерапії при алергічних захворюваннях органів дихання з позиції доказової медицини. Повідомлення 1. *Журн. вушних, носових і горлових хвороб*. 2009;6:29-38.
6. Пухлик Б. М., Коряцька І. В., Дитятківська Є. М. та ін. Специфічна імунотерапія алергійних захворювань. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*. 2008;3:91-99.
7. И. Е. Козулина, К. С. Павлова, О. М. Курбачева Влияние разных методов аллерген-специфической иммунотерапии на качество жизни больных с поллинозом. *Российская ринология*. 2016;24(4):40-46 doi10.17116/rosrino201624440-46 G. Roberts, O. Pfaar, C.A. Akdis. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*. 2018;73:765-798.
8. Дитятковська Є. М. Динаміка клінічних симптомів полінозу під впливом різних курсів АСІТ. *Медичні перспективи*. 2014;16(3):21-27.
9. Jutel M., Agache I., Bonini S. et al. International Consensus On (ICON) Allergy Immunotherapy (AIT). *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015;136:556-568.

10. A. Bozek, K. Kolodziejczyk, B. Warkocka-Szolysek, J. Jarzab. Grass pollen sublingual immunotherapy: A double-blind, placebo-controlled study in elderly patients with seasonal allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol. Allergy*. 2014;28(5):423-427. WAO White Book on Allergy. World Allergy Association; Milwaukee, WI, USA: 2013. Update 2013. www.worldallergy.org.
11. H. S. Nelson Current and future challenges of subcutaneous and sublingual allergy immunotherapy for allergists in the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;121:278-280.
12. H.S. Nelson, M. Makatsori, M. A. Calderon. Subcutaneous immunotherapy and sublingual immunotherapy: comparative efficacy, current and potential indications, and warnings - United States versus Europe. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016;36:13-24.
13. P. Demoly, G. Passalacqua, O. Pfaar et al. Management of the polyallergic patient with allergy immunotherapy: a practice-based approach. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2016;11:2.
14. S.R.Durham, M. Penagos. Sublingual or subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis? *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:339-349.
15. C. Blanco, R. Bazire, L. Argiz et al. Sublingual allergen immunotherapy for respiratory allergy: a systematic review. *Drugs in Context*. 2018;5;7:212-552.