

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

1. Основні гуморальні фактори вродженого та набутого імунітету (А.М.Гаврилюк)
2. Методи імунологічних досліджень клітин та молекул (А.М.Гаврилюк)
3. Генетичні методи в діагностиці імунодефіцитів (Л.В.Костюченко)
4. Сучасна молекулярна алергодіагностика респіраторних та шкірних проявів алергічних хвороб.(С.О.Зубченко)
5. Апоптоз та аутоімунні хвороби Аутоантитіна в діагностиці аутоімунних хвороб (Х.О.Ліщук-Якимович)
6. Фенотипування в онкогематології. Онкомаркери в онкологічній практиці (Г.О.Потьомкіна)
7. Система HLA в репродуктології та трансплантології. Функціональні методи оцінки лімфоцитів в репродуктології та імунології (А.М.Гаврилюк)
8. Біотехнології в діагностиці та лікуванні (Г.О.Потьомкіна)
9. Безпека введення імунобіологічних препаратів (Г.О.Потьомкіна)
- 10.Перспективи вакцин в лікуванні онкологічних та аутоімунних хвороб (А.М.Гаврилюк)

**Тема семінарського заняття №1. Основні гуморальні фактори вродженого та набутого імунітету – 2 год. (А.М.Гаврилюк)**

**Навчальна мета заняття:** навчити аспірантів найновішим знанням про ферментативні системи фагоцитів, цитокіни, основ знань про гуморальні фактори набутого імунітету

**Професійно орієнтована мета заняття:** дати аспірантам основи знань по інтерпретації даних визначення показників фагоцитозу та рівнів цитокінів

**Теми реферативних повідомлень:**

1. Основні положення знань про систему фагоцитів
2. Механізми внутрішньоклітинного знищення антигенів фагоцитами
3. Механізми позаклітинного знищення антигенів фагоцитами
4. Сучасна класифікація цитокінів, їх функції
5. Основні класи та підкласи імуноглобулінів

**Короткий зміст теми заняття**

Захист фагоцитуєчими клітинами полягає у знищенні чужорідних мікроорганізмів та аутологічного відпрацьованого та патологічно зміненого матеріалу. У цьому ключову роль відіграють їх лізосомальні та мітохондріальні ферменти.

**Фагоцитарна система** - це система клітин, яка забезпечує першу лінію захисту клітинною ланкою вродженого імунітету і здатна здійснювати фагоцитоз. До системи фагоцитів відносяться моноцити/макрофаги та гранулоцити - нейтрофіли, еозинофіли, базофіли.

**Фагоцитоз** – це внутрішньо- та позаклітинний процес, який полягає у ендоцитозі та екзоцитозі патогенних молекул, мікроорганізмів та інших клітин. Автофагоцитоз – це знищення клітиною її власних пошкоджених молекул та органелл. Найважливішими клітинами, здатними до фагоцитозу, є гранулоцити нейтрофіли та макрофаги (у меншій мірі моноцити), і дендритні клітини. Особливим пристосуванням для того, щоби не фагоцитувалися нормальні клітини, є експресія молекул CD47 на всіх клітинах, які передають макрофагові сигнал «не їж мене», і при цьому з'єднуються з рецептором SIRP $\alpha$  (signal-regulatory protein) на макрофагах. Навпаки, на клітинах, які підлягають знищенню, з'являються молекули речовин фосфатидилсерину та кальретикуліну, яких образно називають «з'їж мене».

Фагоцитоз розпочинається з розпізнавання і зв'язування гранулоцитом молекули або клітини, яка має бути знищеною, і оточення її цитоплазматичними «випустками», або «пастками». На відміну від макрофагів, зрілі нейтрофіли не синтезують нових ферментів, не відновлюють запаси енергії. У своїй діяльності нейтрофіли нагадують смертників-камікадзе. Опсонінами для нейтрофілів служать: антитіла, циркулюючі імунні комплекси (ЦК), компоненти комплементу, лектини. Завдячуючи відповідним рецепторам на фагоцитах, відбувається розпізнавання та безпосередньо визначається структура стінки збудника або розпізнаються певні імунні фактори, які вкривають чужорідну клітину, посилюючи фагоцитоз. Такий процес посилення фагоцитозу називають **опсонізацією**, а фактори, які посилюють фагоцитоз – **опсонінами**. Найважливішими опсонінами для моноцитів/макрофагів є антитіла, активований С3b компонент комплементу, фібрoneктин, лейкотрієни, тафтсин, маннозозв'язуючий білок, для яких ці клітини мають на своїй поверхні відповідні рецептори. Тому, індукований ними фагоцитоз називається **імунофагоцитозом**. Він запускається після реакції між відповідним рецептором (рецепторами) вкритого опсонінами об'єкта та мембраною гранулоцита. Якщо опсонінами є антитіла, то реакція з рецепторами до Fc-фрагментів антитіл (FcR) спричиняє: 1) індукцію фагоцитозу; 2) активацію антитілозалежної цитотоксичності (ADCC) клітин. FcR використовує для цього внутрішньоцитоплазматичні активуючі послідовності ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Відбувається зв'язування, агрегація лігандів, фосфорилування ITAM, внаслідок чого через тирозинові кінази активується гранулоцит. Існують ще й інші FcR, що не переносять активуючих сигналів, пригнічують активацію клітин, бо мають гальмуючі внутрішньоцитоплазматичні послідовності ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs).

Антитіла класу IgG є найкращими опсонінами. Індукований ними фагоцитоз залежить від присутності на гранулоцитах рецепторів до Fc-фрагменту IgG. Існує три типи рецепторів Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$  RIII та кілька

підтипів, всі вони належать до надродини Ig-подібних молекул і зв'язують послідовності стабільного фрагменту антитіла у регіоні важкого ланцюга  $\gamma$ .

Таблиця 1. Рецептори на гранулоцитах до Fc-фрагментів антитіл IgG.

№	Рецептор	CD	IgG	На яких клітинах експресуються
1.	Fc $\gamma$ RI	CD64	мономер	Моноцити/макрофаги, дендритні клітини; активовані нейтрофіли та еозинофіли
2.	Fc $\gamma$ RII	CD32	в комплексах	Моноцити/макрофаги, дендритні клітини, нейтрофіли, тромбоцити, В-лімфоцити, еозинофіли
3.	Fc $\gamma$ RIIIA	CD16a	в комплексах	Макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини, НК-клітини, еозинофіли, тучні клітини, лімфоцити Т $\gamma$ $\delta$ . Цей рецептор є найважливішим у запуску антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC)
4.	Fc $\gamma$ RIIIB	CD16b	Мономер	Моноцити/макрофаги, нейтрофіли

Крім вищеперелічених властивостей, FcR беруть участь у регуляції імунної відповіді, презентації антигенів, та зв'язують імунні комплекси, внаслідок чого нейтрофіли, моноцити та тромбоцити виділяють медіатори запальної реакції – IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ .

Гуморальні фактори вродженого імунітету – ензими - сприяють внутрішньоклітинному (головний механізм), позаклітинному знищенню та формуванню зовнішньоклітинних пасток.

Внутрішньоклітинне знищення реалізується кисневозалежним та кисневонезалежним механізмами. Кисневозалежний механізм фагоцитозу. Фагоцитоз мікроорганізмів протягом кількох секунд викликає в гранулоцитах збудження дихальних процесів та виникнення реактивних окислювачів, до яких належать токсичні кисневі зв'язки та окислені галогени. Для утворення таких речовин у гранулоцитах (у першу чергу нейтрофілах) відбуваються такі події: 1) розпочинається активація НАДФ-оксидази, яка є комплексом молекул (в тому числі цитохрому B<sub>558</sub>), які переносять електрони; 2) НАДФ-оксидаза каталізує утворення супероксиданіону O<sub>2</sub><sup>-</sup> внаслідок переміщення електрону з НАДФ на молекулярний кисень 2O<sub>2</sub>+НАДФН →НАДФ-оксидаза→ 2O<sub>2</sub><sup>-</sup> +НАДФ<sup>+</sup>+H<sup>+</sup> 3) внаслідок спонтанної або каталізованої супероксиддисмутазою дисмутації з супероксиданіону утворюється перекис водню 2O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sub>2</sub><sup>+</sup>→ супероксиддисмутаза→ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>, деяка частина H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> під дією каталази потім розпадається до O<sub>2</sub> та H<sub>2</sub>O; 4) за допомогою іонів заліза утворюються гідроксильні групи H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>→ Fe<sup>3+</sup>+OH<sup>-</sup> +\*OH; 5) внаслідок реакції, каталізованої мієлопероксидазою, утворюється гіпохлорна кислота H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Cl<sup>-</sup> →мієлопероксидаза→ HOCl + OH<sup>-</sup>; 6) внаслідок реакції гіпохлорної кислоти з амінами утворюються хлораміни. Найважливішим етапом в утворенні реактивних форм кисню є утворення активного комплексу НАДФ-оксидази. Цей

фермент, який забезпечує утворення супероксиданіону  $O_2^-$ , ініціює утворення всіх інших реактивних форм кисню. Комплекс НАДФ-оксидази складається з шести компонентів. Після того, як фагоцит поглинув мікроорганізми, цей шестикомпонентний комплекс вбудовується у мембрану фаголізосоми, у якій цитохром  $V_{558}$  формує каналець, через який транспортуються електрони, утворені оксидазою, на атоми кисню, які є у фагосомі. За допомогою цього механізму до фагосоми вливається від 1 до 4 моль/літр супероксиданіонів. Більшість реактивних форм кисню працюють у фаголізосомі. Вони є токсичними не тільки щодо бактерій, але також грибків, паразитів і навіть пухлинних клітин. Гідроксильні групи та синглетний кисень є найактивнішими серед усіх реактивних форм кисню. Перекис водню є менш активним та швидко інактивується. Реактивні форми кисню, які можуть частково вийти з фаголізосоми, є потенційно токсичними і щодо самого гранулоцита і можуть бути мутагенними для оточуючих клітин. Тому їх інактивують ферменти (антиоксиданти) – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіон-редуктаза, глутатіон-пероксидаза та тиреодоксини.

Відновлений глутатіон (GSH) – біологічно активна речовина, трипептид (L-гама-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин), який є одним з універсальних регуляторів біохімічного і фізіологічного гомеостазу організму. Його тіолова (сульфгідрильна) група є головною функціональною частиною трипептиду та легко піддається як ферментативному, так і неферментативному окисленню, в результаті чого утворюється дисульфідна (окислена) форма глутатіону (GSSG). Відновлений глутатіон (GSH) – це низькомолекулярний тіол. Реакція окислення відновленого глутатіону каталізується ферментами з різною специфічністю до акцепторів водню. Зворотний процес – відновлення окисленого глутатіону – відбувається за участі глутатіонредуктази (GR). Глутатіонредуктаза – фермент, котрий відновлює дисульфідний зв'язок окисленого глутатіону GSSG до його сульфгідрильної форми GSH. Відновлення глутатіону відбувається за рахунок енергії НАДФ-Н. Глутатіонпероксидаза (ГпО) – ензим, що відновлює  $H_2O_2$  до води, а органічні гідропероксидази – до гідрополук. Тривала активація ГпО можлива лише за умови достатньо високого внутрішньоклітинного рівня відновленого глутатіону GSH. ГпО, функціонування якої тісно пов'язане з активністю Гр та уповільненням інтенсивності пероксидних процесів.

Мітохондрії є основним місцем використання кисню та джерелом АФК. За рахунок одноелектронного відновлення молекулярного кисню може утворитися радикал супероксид аніон  $O_2^-$ , котрий дає початок утворенню інших АФК. Концентрація  $O_2^-$  в матриксі мітохондрії у 5-10 разів вища, ніж в цитоплазмі. Наявність у мітохондрії антиоксидантного захисту дозволяє зберегти її функції без значних пошкоджень. У найбільшій мірі запобігає або відновлює пошкодження мітохондріальний відновлений глутатіон mGSH. А інактивацію супероксид-аніону в мітохондрії здійснює марганець-залежна супероксиддисмутаза, котра дисмутує його з утворенням перекису водню  $H_2O_2$ , котрий може бути знешкоджений глутатіонпероксидазою, тобто, точніше, її

ізоформою GPx1, локалізованою головним чином в цитоплазмі, однак деяка її кількість присутня в матриксі мітохондрій.

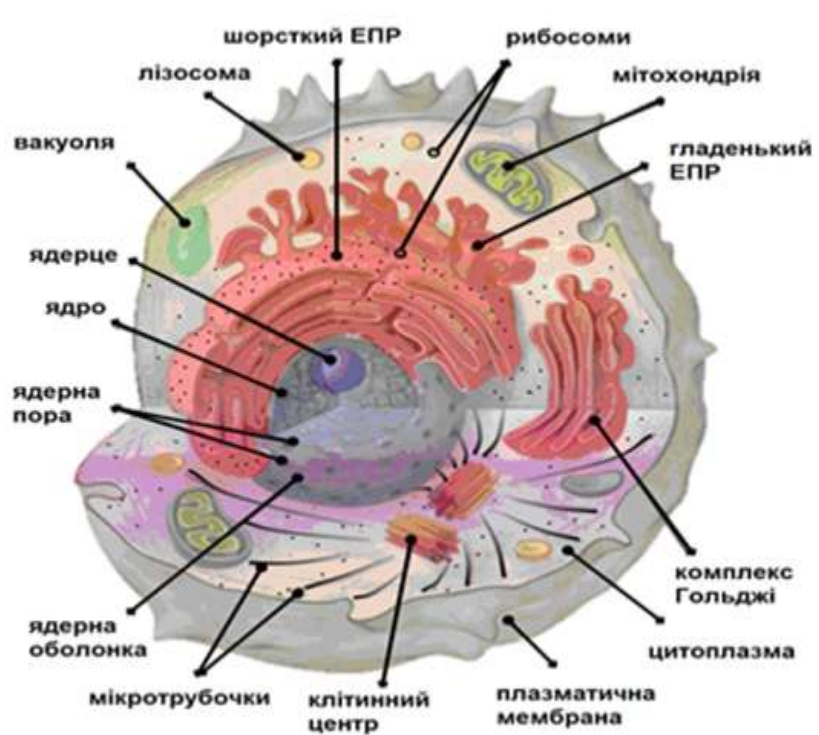


Рисунок 1.

Будова клітини з органеллами (мітохондрії у правому верхньому та лівому нижньому куті рисунку) (Аббас А.К., Ліхтман Е.Г., Піллай Ш., 2020)

Глутатіонпероксидаза є складовою частиною ферментативної системи внутрішнього захисту організму людини від оксидативного стресу. Існує кілька «родинних» ферментів глутатіонпероксидаз, кожна з яких асоційована з іншою тканиною чи органом. Наприклад, в тканині щитовидної залози експресується кілька видів глутатіонпероксидази (GPx1, GPx3 та GPx4), які беруть участь в метаболізмі тиреоїдних гормонів, захищають клітини від пошкоджуючої дії перекису водню ( $H_2O_2$ ) та вільних кисневих радикалів шляхом їх відновлення до води та спирту.

Мієлопероксидаза міститься у азурофільних гранулах нейтрофілів і моноцитів, але її немає у макрофагах. Тому кисневозалежні бактеріовбивчі механізми макрофагів залежать швидше від реактивних форм кисню, ніж від окислених галогенів. Хоч сама гіпохлорна кислота має бактеріоцидні властивості, однак деякі з хлорамінів можуть бути ще токсичнішими, тому є найефективнішими бактерицидними факторами, які виділяються нейтрофілами. До ефективних індукторів утворення реактивних форм кисню в макрофагах відносяться IFN- $\gamma$  та IL-4. IFN- $\gamma$  індукує в макрофагах синтез TNF, IL-1, оксиду азоту (NO). NO - важливий медіатор, який, крім участі у знищенні мікроорганізмів, багатоклітинних паразитів та пухлинних клітин, виконує значну роль у багатьох інших біологічних процесах – зменшує тонус судинної

стілки, зменшує агрегацію тромбоцитів, регулює функцію нейронів. NO утворюється внаслідок реакції за участю NO-синтетази, L-аргініну, кисню, НАДФ та тетрагідробіоптерину. Хоча сам оксид азоту є малоактивним бактерицидним фактором, він, реагуючи з киснем, утворює значно активніший двоокис азоту. Разом з супероксиданіоном утворює пероксиазотин ONOO<sup>-</sup>. Оксид азоту утворюється також і у нейтрофілах внаслідок їх збудження, а також у багатьох органах, крім імунних: епітеліальних клітинах та нервових. Інгібітором синтезу NO є глюкокортикостероїди, IL-4 та TGF-β.

Кисневонезалежні механізми та фактори, які беруть в них участь. Через кілька секунд після поглинання антигену/мікроорганізму та утворення фагосоми лізосоми зливаються з нею. Завдяки невеликому об'єму фагосоми концентрація білків, виділених із лізосоми, може бути дуже високою. Цей механізм сприяє знищенню гранулоцитами мікроорганізмів, в процесі фагоцитозу яких не синтезуються реактивні форми кисню. Найактивнішими щодо знищення мікроорганізмів є: 1) дефензини; 2) BPI – бактеріовбивчий фактор; 3) катепсин G; 4) лізоцим; 5) інші чинники у меншій кількості – лактоферин, азуроцидин, кателіцидин, кальпротектин, NRAMPI, MBP тощо. Дефензини (катіонні білки) – це катіонні білки, яких ще називають пептидними антибіотиками або антимікробними пептидами. Захисний механізм проявляється у прокладанні каналців у клітинних стінках бактерій та їх знищенні внаслідок взаємодії білків з катіонним зарядом з клітинною стінкою з аніонним зарядом. У залежності від будови діляться на дві групи: дефензини-α (DEFA) та -β (DEFB). DEFA -1, -2, -3, -4 називають також HNP -1, -2, -3, -4 (human neutrophil peptides), DEFA -5 і -6 синтезуються в криптах тонкого кишківника. Епітеліальні клітини багатьох органів синтезують DEFB – дефензини β, які ще називають HBD (human β defensins). Подібну до дефензинів функцію виконують кателіцидини та убіквіцидин. Дефензини виконують різні функції, а саме: 1) антибактерійна, антигрибкова, антипаразитарна, антивірусна щодо окремих типів вірусів дія; 2) індукція синтезу прозапальних цитокінів IL-1, CXCL8 (IL-8), TNF-α; 3) є сильними хемоатрактантами для дендритних клітин та Т-лімфоцитів; 4) гальмують синтез глюкокортикостероїдів; 5) посилюють проліферацію лімфоцитів; 6) зв'язують та нейтралізують бактерійні токсини, в тому числі LPS; 7) гальмують фібриноліз; 8) сприяють дегрануляції тучних клітин; 9) здійснюють протипухлинну дію. З огляду на те, що дефензини стимулюють макрофаги та тучні клітини до продукції TNF-α, їх відносять до алармінів, які попереджують імунну систему про загрозу інфекції. BPI (бактеріовбивчий/посилюючий проникливість фактор) є також катіонним білком з подібними функціями, який присутній в основному в азурофільних зернах нейтрофілів людини, в меншій мірі моноцитів, еозинофілів та епітеліоцитів. Знищує переважно грамнегативні бактерії, неієвий проти грампозитивних бактерій та грибів. Катепсин G є глікопротеїном і також знаходиться в азурофільних зернах нейтрофілів людини, знищує у першу чергу грампозитивні бактерії та гриби безпосередньо або опосередковано, посилюючи дію лізоциму та еластази.

Позаклітинне знищення великих патогенів (паразитів, червів) еозинофілами внаслідок їх дегрануляції. Характерною рисою таких інфекцій є периферична та місцева (тканинна) еозинофілія. У таких випадках частка еозинофілів серед лейкоцитів становить 50%. Причини еозинофілії: 1) вплив до місця паразитарної інвазії клітин неспецифічних лімфоїдних клітин ІLC2; 2) синтез Тх2- цитокінів, які стимулюють диференціацію та активацію еозинофілів – ІL-3, -4,-5, GM-CSF, завдяки яким період виживання еозинофілів у тканинах продовжується з 48 годин до 14 днів. Еозинофіли – одні з найважливіших ефекторних клітин у антипаразитарній відповіді. Вони беруть участь у реакції антитілозалежної клітинної цитотоксичності, а також виділяють медіатори, які безпосередньо пошкоджують клітини паразита (головний основний протеїн – major basic protein - MBP, становить половину всього вмісту зерен еозинофілів, утворює кристалічну субстанцію, якщо всередині зерен містяться катіонний білок еозинофілів та пероксидаза, MBP є токсичним щодо червів, простіших та мікроорганізмів, напр. E. coli, Staphylococcus aureus. Еозинофільний катіонний білок (eosinophil cationic protein – ECP), еозинофільний нейротоксин (eosinophil-derived neurotoxin – EDN), подібно до MBP, є токсичними щодо червів, простіших та мікроорганізмів. Еозинофільна пероксидаза бере участь у регенерації пошкоджених тканин та усуненні зруйнованих клітин. Еозинофіли здатні «вистрілювати» свої мітохондрії, у яких утворилися реактивні форми кисню, до пори до часу стримувані у своїй активності мітохондріальним ДНК, в сторону клітин патогенів.

Крім еозинофілів, механізмом позаклітинного знищення володіють також активовані нейтрофіли та макрофаги. «Викинуті» зсередини клітини нитки ДНК, як павутина, опутують патогенні мікроорганізми. Називається це явище позаклітинними нейтрофільними пастками (neutrophil extracellular traps – NET). Знерухомлені у такий спосіб мікроорганізми та грибки знищуються виділеними з нейтрофільних зерен бактеріо- та грибовбивчими речовинами, які виділяються позаклітинно разом з генетичним матеріалом. ДНК, яка «викидається» з клітини, здійснюючої екзоцитоз, має ядерне походження, тому цей процес закінчується апоптозом нейтрофіла. Деякі бактерії обороняються, виділяючи ДНК-азу. За інших обставин нейтрофіли та еозинофіли «викидають» мітохондріальну ДНК, тому процес не закінчується їх загибеллю. Трапляється навіть так, що виділені позаклітинно зерна нейтрофілів поглинаються макрофагами, які завдяки «додатковому озброєнню» успішніше знищують патогенні мікроорганізми.

### **Напрямки дискусії:**

1. Які Ви знаєте рецептори на фагоцитах, їх зв'язок з опсонізацією і якістю фагоцитозу
2. Які цитокіни відносяться до прозапальних, а які – до антизапальних
3. Які найважливіші субпопуляції лімфоцитів з цитотоксичною функцією
4. Що таке імунні комплекси і чи доцільно їх визначати

### **Використана література:**

1. Байляк М.М. Біологічні мембрани: курс лекцій. Івано-Франківськ: в-во Інституту природничих наук Прикарпатського національного університету ім. В. Стефаника, 2013, 83 с.
2. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA. 2017. – 497 s.
3. Broz P., Dixit V.M. Inflammasomes: mechanisms of assembly, regulation and signaling. *Nature Rev.Immunol.*2016;16:407-420.
4. Cao X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signaling in health and disease. *Nature Rev.Immunol.*2016;16:35-50.
5. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity* 2016; 44:463-475.
6. Levin R., Grinstein S., Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol. Rev.* 2016; 273:156-179.
7. Н. О. Салига Активність глутатионової системи антиоксидантного захисту в щурів за дії L-глутамінової кислоти *Укр. біохім. журн.*, 2013, т. 85, № 4
8. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. *Успехи биологической химии*, - 2014. -Т. 54, №4. – С. 299–348
9. Іскра Р.Я., Янович В.Г. Інтенсивність пероксидних процесів і активність антиоксидантних ензимів у тканинах щурів за підвищеного рівня хрому в раціоні *Укр.Biochem.J.* 2011 Том 83, № 3, С. 25-35
10. Аббас А.К., Ліхтман Е.Г., Піллай Ш. Основи імунології. Функції та розлади імунної системи (переклад 6-го англійського видання). К.: ВСВ «Медицина», 2020. -327 с.

### **Цитокіни: класифікація, функції, терапевтичне застосування.**

Цитокіни — клас невеликих пептидів та білків (8-30 кДа), що регулюють міжклітинні і міжсистемні взаємодії в організмі, включаючи виживання клітин, стимуляцію або пригнічення їх росту, диференціацію, функціональну активність і апоптоз, а також забезпечують узгодженість дії імунної, ендокринної і нервової систем в нормальних умовах і у відповідь на патологічні дії. Термін «цитокіни» був запропонований американським вченим-біологом Стівеном Коеном в 1974 р. Базові властивості цитокінів: 1) плейотропність (здатність одного цитокіну до впливу на різні клітини та різних функцій); 2) монофункціональність (здатність цитокінів до здійснення однієї дії); 3) антагонізм (блокування дії одного цитокіну іншим); 4) синергізм (співдружнтя дія різних цитокінів для посилення однієї функції); 5) аутокринність (дія на ті ж клітини, які їх виділяють); паракринність (дія на сусідні клітини); 6) ендокринність (дія на клітини з інших органів).



Чутливість лімфоцитів до дії цитокінів залежить від: 1) попереднього розпізнавання антигену через TCR та BCR; 2) експресії відповідних рецепторів до цитокінів на лімфоцитах; 3) цитокіни, синтезовані навіть у великих кількостях, не будуть діяти на всі лімфоцити, а тільки на ті клітини, котрі специфічно розпізнають антиген і готові до виконання ефекторних функцій. Більше того, дія багатьох цитокінів є зв'язана з їх локальним синтезом, наприклад, до імунологічного синапсу, завдяки чому вони місцево мають велику концентрацію. Тому часто важко отримати ефективність від терапевтичного застосування, подаючи рекомбінантні цитокіни довенно. Щоби добитися відповідної концентрації в клітинному оточенні, потрібно було би подавати їх великі концентрації, що викликало би загальносистемну токсичність. З цього приводу тільки невелика кількість цитокінів застосовується в клініці.

Цитокіни можуть здійснювати свій вплив тільки через рецептори на клітинах-мішенях. Дослідження структури цих рецепторів і шляхи переказу сигналів є вкрай важливими. Будова рецепторів для цитокінів: зовнішньоклітинні фрагменти збудовані з особливих доменів, які відповідають за точність зв'язування з лігандами, формування комбінованих рецепторів та спосіб передачі сигналів; та внутрішньоклітинних домерів, які відповідають за ініціацію сигналів у клітині. Зовнішня частина з'єднана з внутрішньою (цитоплазматичною) трансмембранними фрагментами рецептора. Загалом рецептори для цитокінів поділяються на 5 типів: 1) Ig-подібні; 2) до цитокінів I-го класу (гематопоеитинів); 3) до цитокінів II-го класу (інтерферонів) та родини IL-10; 4) до молекул надродини TNF; 5) спряжені з G-білками (до хемокінів). Рецептори, котрі тільки раз проникають через клітинну мембрану, під впливом цитокіну піддаються ди- і тримеризації. Передача сигналу відбувається у результаті зближення і фосфорилування цитоплазматичних фрагментів і асоційованих з ними білків. Зв'язування цитокінів з рецепторами у клітинній мембрані призводить до активації передачі сигналу, яку забезпечують активовані у різний спосіб GTP-ази, MAP-кінази, SRC-, JAK (Janus kinases)- та TEC-подібні тирозинові кінази, кінази-3 фосфатидилінозитолу (PI-3K) та білки STAT (signal transducers and activators of transcription). Після активації клітини білки STAT утворюють димери і переміщуються до ядра, працюючи як транскрипційні фактори. Сигнали, які переказують JAK- STAT, гальмуються білками SOCS (suppressor of cytokine signaling).

Міжнародна класифікація цитокінів: 1) інтерлейкіни; 2) інтерферони; 3) хемокіни; 4) надродина пухлинонекротизуючого фактора; 5) інші цитокіни (MIF, TGF- $\beta$  тощо). За функціями цитокіни поділяються на: 1) **прозапальні, які підвищують рівень експресії молекул адгезії та головного комплексу гістосумісності (МНС), активують Т і В-клітини, пригнічують супресорні механізми (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ ); 2) протизапальні (антизапальні), котрі обмежують розвиток запалення (IL-4, IL-10, ТФР- $\beta$ ); 3) регулятори клітинного і гуморального імунітету - природженого або набутого, котрі володіють власними ефекторними функціями (протівірусними,**

цитотоксичними тощо). багато цитокінів, крім про- чи антизапальними властивостей, маже здійснювати регуляторну функцію (див. таблиці 2, 3).

Таблиця 2. Властивості найважливіших прозапальних цитокінів.

№ п/п	Цито-кін	Рецептори до нього	На яких клітинах присутні рецептори, якими продукується	Функції	Терапевтичне застосування
1.	IL-1 $\beta$	IL-1R1, IL-1R2, IL-1RacP (IL-1R accessory protein)	Моноцити, макрофаги, В-лімфоцити (IL-1R2)	Бере участь у запальній реакції: індукує продукцію CXCL8(IL-8), посилює виділення гістаміну, дегрануляцію еозинофілів, вивільнення арахідонової кислоти з фосфоліпідів, синтез простагландинів. Посилює проникливість ендотеліального шару, прокоагуляційну активність, стимулює виділення тромбоцитарного фактора, посилює продукцію селектину E та адгезивних молекул ICAM-1, VCAM-1. Асоційований з підвищенням температури тіла.	Рекомбінований антагоніст рецептора IL-1Ra (анакіра) зв'язується з рецепторами IL-1R1, IL-1R2 і таким чином блокує дію IL-1 $\beta$ ; моноклональні антитіла (МАТ) анти-IL-1 $\beta$ (канакінумаб); рекомбінантний білок, який містить IL-1R1 та IL-1RacP, з'єднані з Fc фрагментом IgG (рилонацепт)
2.	IL-2	Рецептори до IL-2 (IL-2R) складаються з трьох ланцюгів $\alpha$ (CD25), $\beta$ (CD122), $\gamma$ (CD132), присутні на активованих Т- і В-лімфоцитах,	Продукується Тх1, Т-цитотоксичними	Регулює активність Т-лімфоцитів, охороняє перед автоімунізацією (IL-2 є чинником росту для Т-регуляторних, Т-хелперів, НК-клітин, неспецифічних лімфоїдальних клітин ILC), сприяє дозріванню антигенспецифічних Т-цитотоксичних лімфоцитів CD8 <sup>+</sup> , індукує синтез цитокінів: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , самої себе, IL-6, GM-CSF)	Для профілактики гострого відторгнення трансплантату, лікування Т-лімфом, автоімунних хвороб застосовують МАТ проти IL-2R (даклізумаб та базиликсумаб),

		Т-регуляторних, моноцитах. Найактивніші у передачі сигналу $\beta$ (CD122) та $\gamma$ (CD132)			а також інфузійний білок дифтитокс – комбінація ІЛ-2 з токсином полину.
3.	ІЛ-6	Розчинні рецептори до ІЛ-6 (sІЛ-6R) складаються з різних $\alpha$ -ланцюгів, зв'язуючих ліганд, та ідентичного $\beta$ -ланцюга (gp130, CD130), який переносить сигнал всередину клітин	Продукуються моноцитами та макрофагами внаслідок індукції ІЛ-1 $\beta$ , ІFN, TNF- $\alpha$ , LPS	Один з найважливіших регуляторних цитокінів: регулює протиінфекційний імунітет, продукцію гострофазових протеїнів та кровотворення. Стимулює проліферацію та диференціювання В-лімфоцитів, синтез антитіл, коstimулює Т-лімфоцити, кахексію, резорбцію кістки, виділення лептину (адипокін), асоційований з підвищенням температури тіла.	МАТ анти-ІЛ-6R (тоцилізумаб) та анти-ІЛ-6 (силтуксимаб) використовують у лікуванні хвороби Кастельмана та ревматоїдного артрити
4.	ІЛ-8 (або хемоатрактант для нейтрофілів CXCL8)	Рецептори CXCR1 CXCR2	Продукуються моноцитами, Т-лімфоцитами	Активатор ефektorних механізмів протиінфекційного захисту: стимулює адгезію і дегрануляцію нейтрофілів, посилює фагоцитарну функцію та бактерицидні властивості нейтрофілів.	-
5.	ІЛ-11	В склад рецепторів до ІЛ-11 входять: ланцюг ІЛ-11R $\alpha$ та gp30 (CD130)	Синтезують клітини кровотокових органів	ІЛ-11 разом ІЛ-3 та тромбopoетином стимулює виникнення колоній мегакаріоцитарних, еритробластичних; тромбоцитів, гранулоцитів, макрофагів; посилює продукцію антитіл В-лімфоцитами, посилює синтез гострофазових білків, гальмує синтез прозапальних цитокінів макрофагами; знижує активність ліпопротеїнової ліпази і	-

				диференціювання адипоцитів; спільно з LIF впливає на імплантацію зародка; впливає на диференціювання нейронів	
6.	IL-12	Рецептор до IL-12 складається з двох складових частин: p35 та p40	Продукується макрофагами та дендритними клітинами, у меншій мірі – кератиноцитами, гранулоцитами та тучними клітинами	IL-12 стимулює проліферацію, активацію та цитотоксичність Т-лімфоцитів та НК-клітин та синтез ними IFN- $\gamma$ та TNF- $\alpha$ ; індукує виникнення Th1. Посилює їх активність та проліферацію; посилює продукцію деяких підкласів антитіла IgG	Препарат IL-12 застосовують у лікування онкохворих, він має антиангіогенну дію. Активує цитотоксичну функцію Т-цитотоксичних, НК, макрофагів, гранулоцитів
7.	TNF- $\alpha$ – розчинна форма; Кахексин (лімфотоксин) – мембранозв'язана форма	Два типи рецепторів до TNF $\alpha$ – TNFR1 (p55, CD120 $\alpha$ ) – зв'язує розчинну і мембранну форми TNF- $\alpha$ , TNFR2 (p75, CD120 $\beta$ ) – тільки мембранну	TNF- $\alpha$ продукується моноцитами/макрофагами, лімфоцитами – активованими LPS лімфоцитами	TNF- $\alpha$ є одним з головних цитокінів запальної імунної відповіді. Раптове виділення великої кількості TNF- $\alpha$ призводить до шоку, зростання виділення катаболічних гормонів, високої гарячки, дихальної недостатності, посилення внутрішньосудинного згортання крові і т.д. Хронічне повільне підвищення рівня TNF- $\alpha$ призводить до втрати маси тіла, втрату апетиту, катаболізм білків та ліпідів, збільшення розмірів печінки та селезінки, толерантність до інсуліну. TNF- $\alpha$ регулює практично кожен елемент імунної відповіді людини. Володіє цитотоксичною, імуномодуючою, протівірусною, протипухлинною дією. TNF- $\alpha$	Блокувати високий рівень TNF- $\alpha$ можна застосуванням МАТ анти- TNF- $\alpha$ або препарат для інфузії – розчинні рецептори до TNF- $\alpha$ (TNFR1), з'єднані з Fc-фрагментом IgG

				безпосередньо впливає на пухлинні клітини; індукує зміни кровоносних судин, пронизуючих пухлину; активує протипухлинну імунну відповідь. Лімфотоксин, синтезований В-лімфоцитами, стимулює дозрівання дендритних клітин у лімфовузлах.	
8.	IFN- $\gamma$ (інтерферон типу II)	Найважливішими рецепторами, стимулюючи синтез інтерферонів, є внутрішньоклітинні TLR (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), рецептори AIM2-подібні, гелікази RNA (RIG-1, MDA-5, LGP-5), білки типу NLR; Основний рецептор для IFN- $\gamma$ складається з двох частин – IFNGR1 IFNGR2	Синтезується Т-лімфоцитами, які стимульовані антигенами, цитокінами або мітогенами; НК-клітинами, стимульованими цитокінами, клітинами НКТ	IFN- $\gamma$ посилює синтез антигенів, присутніх на пухлинних клітинах, чим полегшує їх розпізнавання імунною системою. Такі пухлинні клітини стають більш чутливими до захисних імунологічних механізмів. Стимульовані IFN- $\gamma$ макрофаги, набувають цитотоксичних властивостей проти пухлинних клітин. IFN- $\gamma$ діє на клітини, стимулюючи синтез ними противірусних факторів – олігоізоаденіланової синтази, протеїнкінази R (PKR), адезинової деамінази. IFN- $\gamma$ посилює цитотоксичність Т-цитотоксичних лімфоцитів, клітин НК; посилює експресію молекул МНС; активує макрофаги та посилює фагоцитоз, індукує синтез цитокінів IL-1, -6, -15; TNF- $\alpha$ ; CCL10(IP10), CCL9 (MIG).	Рекомбінантний IFN- $\gamma$ використовується в лікуванні вірусних гепатитів В, С і D, а також у лікуванні папіломавірусної інфекції; в онкології – для лікування меланоми та раку нирки

Таблиця 3. Властивості основних протизапальних цитокінів

№ п/п	Цитокін	Рецептор до нього	Які клітини його синтезують	Функції	Терапевтичне застосування
1.	IL-4	Дволанцюговий	Активовані антигеном чи мітогеном	Стимулює експресію на В-лімфоцитах молекул I-го, II-го класу HLA,	Препарати IL-4 посилюють експресію

		IL-4R – високоафінний $\gamma$ -ланцюг та IL-2R $\gamma$ (спільний ланцюг $\gamma$ s)	Th2, лімфоцити НКТ, тучні клітини, базофіли. Рецептори до IL-4 виявлені на Т-, В-лімфоцитах, тучних клітинах, макрофагах, фібробластах	молекул B7.1 (CD80) та CD23, проліферацію активованих В-лімфоцитів та синтез IgE, переключає синтез IgG1 на синтез IgG4; індукує цитотоксичність Т-лімфоцитів, їх проліферацію в сторону Th2, синтез ними GM-CSF та G-CSF; активує тучні клітини, еозинофіли та фібробласти та експресію на них молекул I-го, II-го класу HLA та молекул CD23; активує фагоцитарну та цитотоксичну функцію моноцитів та макрофагів, продукцію ними M-CSF та G-CSF	з субстанцій антимікробною дією
2.	IL-10	Рецепторний комплекс складається з двох: IL-10R1 та IL-10R2 (раніше називали CRF2-4)	Th2, Th3, моноцити, В1-лімфоцити, кератиноцити	володіє регуляторною функцією; пригнічує синтез цитокінів, які продукують Th1 (інтерферонів, TNF, IL1, IL3, IL12, хемокінів);	У терапії запальних хвороб використовують препарати-інгібітори IL-10 та IL-10/IL-10R
3.	ТФР- $\beta$ (три типи $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3)	TGF- $\beta$ R1 TGF- $\beta$ R2 TGF- $\beta$ R3	Макрофаги, нейтрофіли, тромбоцити, лімфоцити	Гальмує проліферацію Т- і В-лімфоцитів, функції НК-клітин, активацію макрофагів. Стимулює диференціацію Th17, продукцію IgA, синтез ангіогенних факторів, колагену	Застосовують у лікуванні та профілактиці остеопорозу. Препарати ТФР- $\beta$ стимулюють проліферацію та диференціювання остеобластів, синтез колагену I-го типу, протеогліканів та

Важливо розуміти, що в процесі запалення продукується багато цитокінів, причому різними клітинами, не тільки імунокомпетентними. Разом їх дія нагадує «бурю», тобто неконтрольований процес. Наслідки «бурі» можуть бути для людини даволі трагічними, як ми це можемо бачити при гострій інфекції COVID-19. Взаємовідносини між різними клітинами можуть мати неочікуваний ефект. На рисунку 2 представлені тальки деякі цитокіни, які беруть участь у цьому процесі.

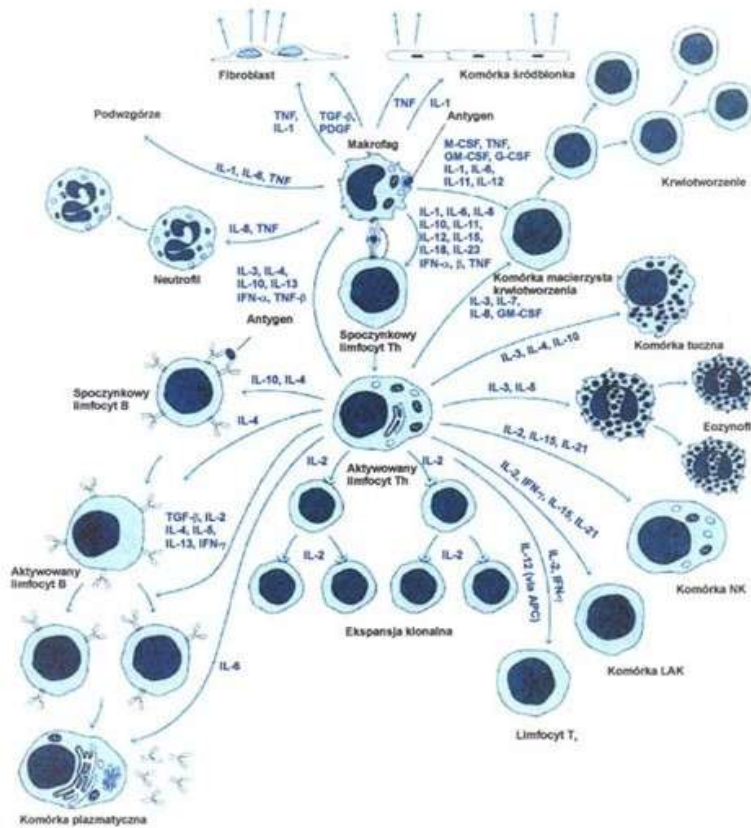


Рисунок 2.

Цитокинова буря в процесі запальної реакції (Golab J. et al., 2017)

Гіперцитокінемія, або “цитокіновий шторм”, є ключовим фактором, який спричиняє: “текучість” плазми, підвищену проникливість судин, дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові, гострий респіраторний дистрес синдром і тому подібні ускладнення.

#### Використана література:

1. Аббас А.К., Ліхтман У.Г., Піллай Ш. Основи імунології (функції та розлади імунної системи) під ред проф. Чопяк В.В.-К:ВСВ Медицина.2020. – 328 с.

2. Бережная Н.М. Семейства интерлейкинов: биология и онкогенез. К: Наукова думка, 2013. – 574 с.
3. Дранник Г.М. Клиническая иммунология и аллергология. Киев:ООО Полиграф плюс, 2010. - 552 с.
4. Корж Н.А., Дедух Н.В. Использование оссеин-гидроксиапатитного комплекса в лечении остеопороза и переломов. Ортопедия, травматология и протезирование. - 2016.- № 2. - С. 120 – 129
5. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa;W-wo naukowe PWN SA, 2017. – 497 s.

### **Імуноглобуліни, їх будова, види та функції**

**Антитіла (імуноглобуліни)** – одні з найважливіших гуморальних факторів набутого імунітету. Молекула імуноглобуліну складається з двох фрагментів: Fab (F antigen binding) – будуючого (взаємодіє з антигеном) та Fc-кристалічного (взаємодіє з компонентами комплементу та відповідними рецепторами). Кожний з цих фрагментів складаються з двох ідентичних важких ланцюгів (**H** - heavy) та двох ідентичних легких ланцюгів (**L** - light). Легкі ланцюги можуть бути двох типів: лямбда ( $\lambda$ ) та каппа ( $\kappa$ ), а важкі – 5 типів: альфа ( $\alpha$ ), мію ( $\mu$ ), гама ( $\gamma$ ), дельта ( $\delta$ ), епсилон ( $\epsilon$ ). Важкі ланцюги визначають клас імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD). Легкі і важкі ланцюги зв'язані між собою дисульфідними (ковалентними) і нековалентними зв'язками. Кожна молекула імуноглобуліну має варіабельну зону, яка змінюється відповідно до структури антигену та константну зону, яка стабільна протягом життя і характерна для кожної особи (рисунок 3). Відповідно до кількості та структури важких ланцюгів імуноглобуліни поділяються на підкласи: IgG – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; IgM – IgM1, IgM2; IgA – IgA1, IgA2. Найбільш специфічні антитіла – це антитіла класу IgG, найменш специфічні – IgM.

**Специфічність антитіл** забезпечується просторовою конфігурацією змінних фрагментів важких та легких ланцюгів, яку визначає послідовність амінокислот у цих частинах ланцюгів. Змінні частини, які входять в склад Fab антитіла, є різними у антитіл, які зв'язують різні епітопи, Стабільні частини є ідентичними в антитіл одного класу і підкласу.

В-лімфоцити синтезують імуноглобуліни, котрі вбудовуються своїм C-кінцевим фрагментом в їх мембрану і стають рецепторами, зв'язуючими антиген (B cell receptor – BCR) та вільні, або циркулюючі імуноглобуліни. Вільні імуноглобуліни можуть продукуватися навіть без попереднього контакту з антигеном (натуральні). Всі молекули імуноглобулінів містять вуглеводні ланцюги. Є три різновидності імуноглобулінів: 1) ізотипові – маючи певні принципові відмінності будови тяжких та легких ланцюгів, надаються до поділу на класи та підкласи; 2) алотипові – мають невеликі відмінності між собою, обумовлені різними варіантами послідовностей амінокислот у стабільних частинах важких та легких ланцюгів внаслідок поліморфічних змін кодуючих їх генів; 3) ізотипові - відмінності між собою обумовлені також різними варіантами послідовностей амінокислот, але у змінних частинах важких та легких ланцюгів.



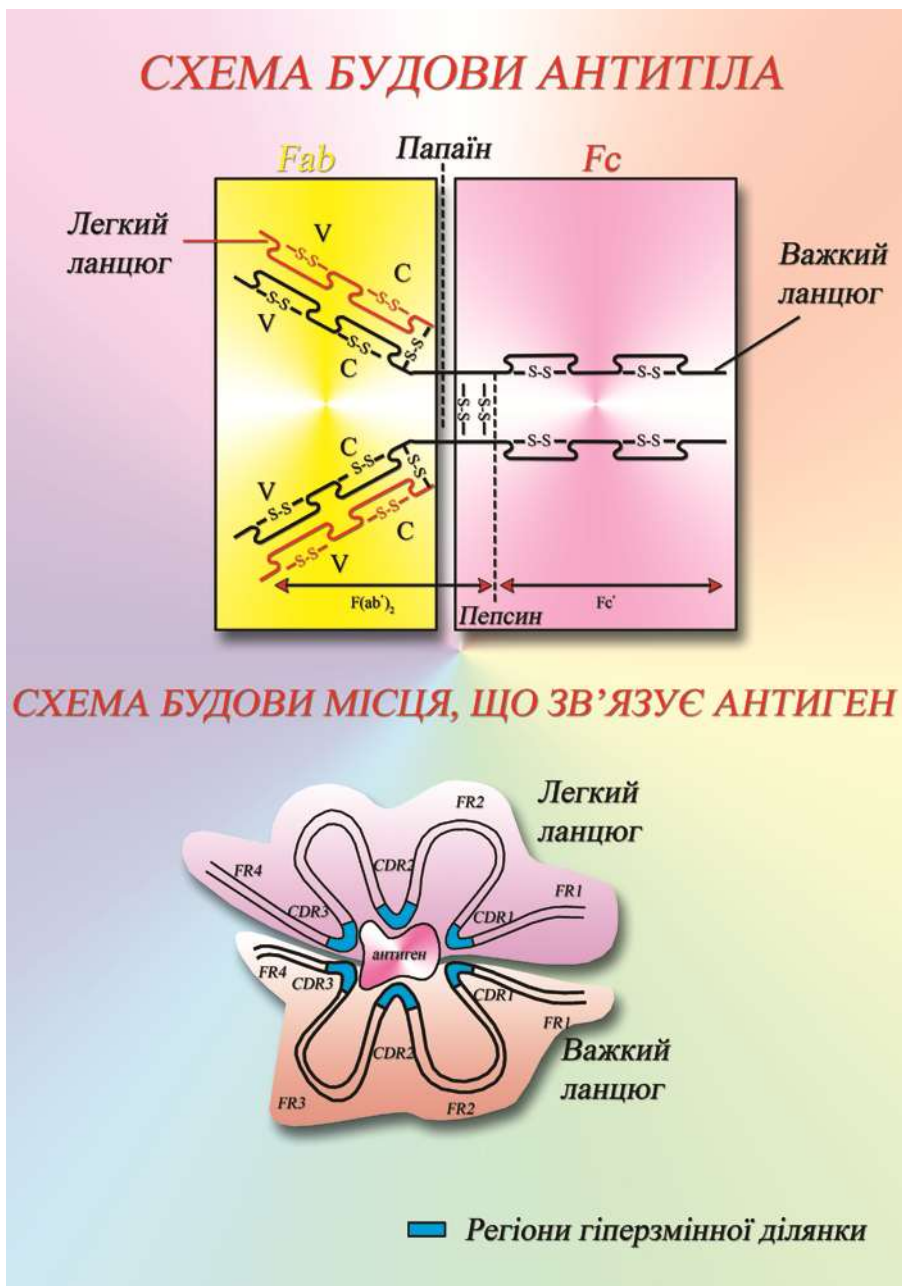


Рисунок 3.  
Схема будови імуноглобуліну (антитіла) та його антигензв'язуючого фрагменту (Golab J. et al., 2017)

**Авідність** (ступінь відповідності будови антитіла структурі антигену, завдяки якій воно здатне зв'язати максимальну кількість його епітопів) та **афінність** (сила зв'язування антитіла з антигеном) – це **властивості** імуноглобулінів, від яких залежить їх здатність зв'язуватися з антигенами. У залежності від характеристик об'єкту (антигену), антитіла (імуноглобуліни) проявляють такі **функції**: 1) зв'язують розчинні антигени у нативній формі, антигени на поверхні клітин, зокрема інфікованих вірусами чи пухлинних, та знищують їх, індукуючи активацію комплементу, імунофагоцитоз, антитілозалежну цитотоксичність; 2) зв'язують антигени на поверхні

мікроорганізмів, спричиняючи аглютинацію та перешкоджаючи їх проникненню у тканини; токсини, блокуючи їх дію; проявляють ензиматичні властивості (абзими) щодо антигенів.

Відмінності у будові важких ланцюгів є підставою для поділу антитіл на класи та підкласи (таблиця 4).

№ п/п	Властивості	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
1.	Форма	мономер	Мономер, димер	пентамер	мономер	мономер
2.	Підкласи	IgG1- IgG4	IgA1, IgA2	-	-	-
3.	Інші ланцюги	-	J секреторний фрагмент	J	-	-
4.	Період піврозпаду (дні)	23	5,8	5,1	2,8	2,5
5.	Синтез (мг/кг маси/день)	34-44	65-66	7,9	0,4	0,016
6.	Концентрація в сироватці крові (мг/мл)	8-16	1,4-4	0,5-2	0,04	0,00002- 0,0005
7.	Активация комплекменту (класичний шлях)	+*	-	+	-	-
8.	Перехід через плаценту	+	-	-	-	-
9.	Зв'язування з тучними клітинами	-*	-	-	-	+
10.	Молекулярна маса ( $\times 10^3$ ) кДа	150	160 (мономер)	970	185	190
11.	Відсоток від інших імуноглобулінів сироватки	80	13	6	0,001	0,000003
12.	Відсоток вуглеводнів у фрагменті Fc	2-3	7-11	12	9-14	12

Таблиця 4.

Базові властивості імуноглобулінів різних класів та підкласів (Golab J. et al., 2017). Примітка: \* - за винятком IgG4

Крім вищеперіченої у таблиці інформації, різні класи та підкласи антитіл мають ще свої особливості. Антитіла класу **IgM** синтезуються спочатку імунної відповіді. В процесі первинної імунної відповіді афінність IgM до антигену є малою. Але, маючи аж 10 фрагментів Fab, пентамери IgM високоавідно з'єднуються з антигеном, який має багато епітопів. Після зв'язування антигенних епітопів Fab-фрагментами зростає експозиція Fc-фрагментів, що сприяє активації системи комплементу (зі всіх імуноглобулінів IgM робить це найактивніше), фіксації до FcR на гранулоцитах та фагоцитозу.

Імуноглобулін **IgG** у людини перебуває у вигляді 4-ох підкласів, або ізотипів IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Багато клітин має рецептори до фрагменту Fc антитіл класу IgG (FcγR), завдяки яким власне цим класом антитіл запускається імунофагоцитоз та антитілозалежна цитотоксичність. Щодо підкласів, то IgG3 має найдовший змінний регіон, тому після зв'язування з антигенами утворює гексаметричну структуру, яка найкраще активує комплемент. Імуноглобуліни IgG1, IgG2 та IgG4 здатні до розпізнавання та започаткування знищення мікроорганізмів, пухлинних клітин та вірусів. Fc-фрагмент IgG1, IgG2 та IgG4 зв'язується з основними антигенами патогенних мікроорганізмів - білком А стафілококів, білком G паличковидних бактерій і таким чиномохороняє їх від знищення антитілозалежними механізмами.

**IgA** існує у двох формах – сироватковій та секреторній. У сироватці чи плазмі крові IgA знаходиться на 80-95% у формі мономеру. У секретах, таких як сльози, піт, виділення із залоз травного, респіраторного та сечо-статевого трактів, IgA знаходиться у формі димерів, з'єднаних ще додатково зв'язуючим ланцюгом J, який через дисульфідні мостики фіксується на «хвостовій» частині IgA. Разом вони формують секреторний IgA, або SIgA (secretory IgA). SIgA становить 5-10% полімерних IgA у сироватці крові, вони діляться на підкласи IgA1 та IgA2. IgA1 має видовжений змінний регіон (20 амінокислот), а IgA2 – короткий (7 амінокислот). У сироватці крові міститься 80-90% підкласу IgA1 і дуже мало IgA2, у секретах ця пропорція є іншою, бо суттєво переважає IgA2. Короткий змінний регіон робить IgA2 невразливими до дії бактерійних протеаз, які, проте, здатні «перерізати» і зробити нефункціональними молекули IgA1.

**IgE**, подібно до IgM, містять чотири домени в стабільних фрагментах важких ланцюгів, але не мають змінного регіону. IgE, зв'язуючись з відповідними рецепторами FcR на тучних клітинах, викликають їх дегрануляцію після приєднання алергену. Імуноглобуліни класу E найактивніше працюють у протипаразитарному захисті та у реалізації алергічних реакцій I-го типу.

Функція імуноглобулінів **IgD** є до кінця недослідженою. IgD разом з IgM у великій кількості фіксовано знаходяться на поверхні «наївних» В-лімфоцитів, виконуючи функцію їх імуноглобулінових рецепторів. Циркулюючих у біологічних рідинах IgD є досить мало.

**Різноманітність специфічностей антитіл є генетично детермінованою.** Антитілопродукуючі клітини (плазмоцити) здатні продукувати біля 10 біліонів антитіл різних структур. У зв'язку з тим, що кожне антитіло має унікальну

амінокислотну послідовність, воно повинно бути кодованим іншим геном. Однак, гіпотеза “один ген – одне антитіло” не є коректною тому, що людина має від 50 000 до 100 000 генів. Існують різні механізми, які відповідають за утворення антитіл різної специфічності: 1) множинні «зародкові лінії» імуноглобулінових генів імуноглобулінів - кожен важкий і легкий ланцюг імуноглобулінів може містити більше, ніж 80 різних сегментів регіону V, 6 різних сегментів регіону J та 30 різних сегментів регіону D, які локалізовані в «зародковій лінії»; 2) соматична рекомбінація (VDJ рекомбінація), яка формується для важкого ланцюга окремо і є альтернативним до рекомбінації «зародкових ліній» процесом і також може генерувати велике число різних типів молекул антитіл; 3) об'єднання різноманітностей: так як сегменти регіонів V, J та D об'єднуються, структура цієї композиції допасовується до місця їх прикріплення, що сприяє утворенню багатьох варіацій в амінокислотній послідовності антитіл; 4) соматична гіпермутація – кількість мутацій генів, які кодують будову імуноглобулінів та визначають їх пептидзв'язуючі властивості, збільшується приблизно до  $10^3$ ; 5) множинні комбінації важких та легких ланцюгів, які також можуть формувати імуноглобулінові молекули. Отож, реалізація кожного з вище вказаних механізмів приводить до появи антитіл різноманітної специфічності. Завдяки цим механізмам можлива продукція від  $10^{10}$  до  $10^{14}$  відмінних один від одного антитіл.

**Механізми переключення синтезу одного класу імуноглобуліну на інший.** Індукція специфічної імунної відповіді проти алергену чи антигену розпочинається у лімфовузлі. Кожен В-лімфоцит спочатку синтезує антитіла класу IgM, після його активації синтез переключається на інший клас імуноглобуліну без зміни антигенної специфічності. В-лімфоцит для цього повинен отримати певні сигнали: 1) зв'язування антигену (алергену) поверхневими імуноглобуліновими рецепторами, які формують В-клітинний рецептор (B cell receptor – BCR); 2) синтез цитокінів Т-лімфоцитами, котрі «приймають рішення» про початок синтезу амінокислот стабільного фрагменту визначеного класу імуноглобуліну: лімфоцити T<sub>H</sub>2 продукують IL-4 або IL-13, котрі активують у В-лімфоциті транскрипційний фактор STAT6, що стимулює переключення синтезу IgE В-лімфоцитом, а також IL-5, який індукує синтез IgA; лімфоцити T<sub>H</sub>1 синтезують IFN- $\gamma$ , котрий впливає на запуск синтезу IgG1; 3) взаємодія поверхневих лігандів CD40 (CD40L або CD154) на Т-лімфоцитах та молекул CD40 на В-лімфоцитах. Якщо йдеться про продукцію IgE, то після вищеперелічених процесів ген C $\epsilon$  (для стабільного фрагменту ланцюга  $\epsilon$ ) з'єднується із зрекомбінованими вже раніше сегментами генів V, D та J – і починається синтез молекул імуноглобуліну.

Здавалося би, імуноглобуліни – одні з найкраще вивчених гуморальних факторів імунної відповіді. Тим важливіше продовжити їх дослідження у світлі сучасних підходів до вивчення цих складних білкових молекул. Уточнення

будови та функцій імуноглобулінів різних класів та підкласів, визначення генетичного детермінування їх структур і специфічностей, створення експериментальних моделей конструювання молекул імуноглобулінів *in vitro* для терапевтичного використання є постійно актуальними завданнями для імунологів-науковців.

### **Використана література:**

1. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2017, 497 s.
2. Lydyard P.M., Whelan A., Fanger M.W. Instant Notes in Immunology (Immunologia: krotkie wyklady). Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2006, 362 s.
3. Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., White R.L. Medical Genetics. Mosby: A Times Mirror Company, 2009, United States, 372 p.

### **Тема семінарського заняття №2. Методи імунологічних досліджень клітин та молекул – 2 год. (А.М.Гаврилюк)**

**Навчальна мета заняття:** дати аспірантам сучасні знання про імунологічну лабораторну діагностику

**Професійно орієнтована мета заняття:** навчити аспірантів підбирати методи дослідження хворих при різних патологіях

### **Теми реферативних повідомлень:**

1. Що таке комплексне лабораторне обстеження
2. Значення загальноклінічного аналізу крові у оцінці стану імунної системи пацієнта
3. Основні методи вивчення природженого імунітету людини
4. Основні методи визначення набутого імунітету людини

### **Короткий зміст теми заняття**

Комплекс імунологічних лабораторних досліджень часто називають імунограмою. Надалі у тексті ми будемо використовувати саме цей термін, але необхідно підкреслити, що для оцінки стану імунної системи можна і потрібно використовувати результати загально-клінічних лабораторних обстежень, які при деяких обставинах дають чіткіше уявлення про ситуацію, ніж самі тільки імунологічні дослідження. Сьогодення діагностики імунопатології є таким, що методи, які традиційно раніше використовувалися в інших лабораторних підрозділах (біохімічному, медико-генетичному, бактеріологічному, патоморфологічному тощо) є часом на першому місці в порівнянні з імунологічними. Потрібно також враховувати, що далеко не кожен лікар працює

у медичному закладі, оснащеному сучасною імунологічною лабораторією, і тому повинен вміти скласти собі хоча би поверхневу уяву про стан імунної системи пацієнта за даними загально-клінічних чи інших лабораторних досліджень.

У зв'язку з цим сформовано наступні **рівні обстеження пацієнтів з підозрою на імунопатологію: перший рівень (скринінговий)**, який виконується у клініко-діагностичних лабораторіях медичних закладів районного/міського підпорядкування; **другий рівень або рівень кількісної оцінки імунологічних параметрів**, який виконується у імунологічних відділах лабораторій міського/обласного підпорядкування; та **третій рівень – ефекторний або функціональний**, який виконується в імунологічних лабораторіях спеціалізованих центрів обласного/регіонального підпорядкування. Існує також **четвертий рівень** імунологічного обстеження, який в основному використовується у **наукових дослідженнях** відповідних кафедр або науково-дослідних інститутів, і для виконання якого об'єднують ряд імуногенетичних та молекулярно-генетичних методів дослідження.

### **Лабораторні методи, які найчастіше використовуються в клінічній імунології:**

1. **Лейкограма (лейкоцитарна формула)** – загальноклінічне лабораторне дослідження, яке полягає у обрахуванні загальної кількості лейкоцитів, а також процентного вмісту у них нейтрофілів (в тому числі клітин із паличковидною та сегментовидною формою ядра), моноцитів, базофілів, еозинофілів, лімфоцитів тощо. Для лікаря-клінічного імунолога важливо знати відсоток цих клітин (підрахований або у мазку, або за допомогою автоматичного лічильника), а також їх абсолютну кількість (підраховану за загальною кількістю лейкоцитів).

2 **Визначення показників гемостазу (коагулограма)** – виконується на напів- або автоматичних аналізаторах, принципом роботи яких є коагулометрія та колориметрія.

3. **Методи визначення гострофазових білків** – розрізняють: 1) загальне їх розділення за подібністю у молекулярних масах методом електрофорезу; 2) визначення концентрації окремих білків турбідометричним або нефелометричним методами. Загальне визначення білкових фракцій – для розділення білків сироватки на фракції (альбумін,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобуліни) згідно із молекулярною масою використовується **електрофорез** на целюлозній пластині, який проводиться в електрофоретичній камері. Розділення відбувається при постійній та низькій напрузі (200 – 250V) протягом 20 хв. Утворюються полоси, які зафарбовують та денситометрують для визначення концентрації білка в окремих фракціях. Турбідиметрія та нефелометрія – використовуються для визначення концентрації окремих білків або антигенів, які зв'язалися із специфічними антитілами та утворили імунні комплекси в розчині. **Турбідиметрія** полягає у вимірюванні кількості заломленого світла, яке пройшло через розчин. Світло відповідної довжини, яке проходить через скляну кювету, спочатку розпорошується, а потім, проходячи через ряд лінз, зосереджується на фотодетекторі. Електричний сигнал є пропорційним до інтенсивності розпорошеного світла і відповідно до цього до рівня антигену. **Нефелометрія** вимірює кількість світла, розсіяного під прямим кутом;

фотосенсор розташований під кутом  $90^\circ$  до джерела освітлення, абсолютно прозорий розчин не заломлює світло. Нефелометрія найбільш чутлива до малих концентрацій досліджуваних речовин. Поетапна нефелометрія – це кінетичне вимірювання формування агрегатів. Час, за який вигин кривої “дисперговане світло – час” сягає максимуму, є пропорційним вмісту антигену (білка, який визначається). Концентрацію антигену в зразку визначають за допомогою калібрувальних кривих.

5. **Тести оцінки імунологічної компетентності** в основному стосуються оцінки фагоцитуючих клітин. Першим із них потрібно виконувати тест на поглинання та внутрішньоклітинне знищення мікроорганізмів. Виділені із периферичної крові нейтрофіли інкубують із живими бактеріями (найчастіше із суспензією дводенної культури *Staphylococcus aureus*), через 30 хв та 2 год виготовляють мазки. Їх фарбують та оцінюють у світловому мікроскопі – виявляють наявність в нейтрофілах маркерних мікроорганізмів. Здатність фагоцитів до внутрішньоклітинного знищення оцінюють, підраховуючи кількість клітин, які містять всередині бактерії (**фагоцитарне число** або **фагоцитарний показник**). Потім ділиться кількість поглинутих бактерій через 2 год на кількість поглинутих бактерій через 30 хв. Показник  $<1$  визнається добрим результатом і характеризується поняттям “завершений фагоцитоз”, а показник  $>1$  свідчить про незавершеність процесу фагоцитування. Також для оцінки якості фагоцитозу, а, точніше, його кисневозалежної ланки, виконується тест з відновленням нітросинього тетразолію (**НСТ-тест**). Нейтрофіли, у яких фагоцитоз відбувається із потужною активацією киснево-залежних процесів, “переварюють” жовтий барвник НСТ, в результаті чого утворюється темно-голубий осад формазану. Цей тест складається із двох етапів – спонтанного та стимульованого (найчастіше бактеріальним антигеном зимозаном). Його результати також оцінюють під світловим мікроскопом і вираховують індекс стимуляції.

6. **Посереднє визначення антигенів та антитіл** можливе за допомогою фіксації субстратів реакції на носіях - це **реакція зв'язування комплекменту** та виявлення антигенів та антитіл за допомогою мітки. Реакція зв'язування комплекменту відбувається після з'єднання сироватки хворого (яка містить комплекмент, рівень якого потрібно визначити), гемолітичної сироватки та суспензії еритроцитів барана. Реакція антиген-антитіло є видимою, інтенсивність її забарвлення залежить від ступеня гемолізу еритроцитів барана. Результат реакції вираховують за допомогою калібрувальної кривої. До методів виявлення антигенів та антитіл за допомогою мітки відносяться **імунофлуоресценція** – метод, який ґрунтується на зв'язуванні специфічних антитіл з флуорохромами. Після збудження їх світлом, відповідної довжини хвилі, ці субстанції починають світитися, завдяки чому структури, які містять даний антиген, починають бути добре помітними у флуоресцентному мікроскопі. Тест безпосередньої флуоресценції використовується для виявлення антигену в зрізах тканин, препаратах ізольованих клітин або мікробіологічних мазках, які попередньо були оброблені флуоресцентним барвником. Тест посередньої флуоресценції використовується для виявлення у сироватці крові

антитіл проти антигену, зафіксованих на якомусь носії, за допомогою барвникової мітки флуоресцеїном – по суті це зв'язування антитіл антитілами проти них. Існує ще **метод хемілюмінесценції** – це варіант імунохімічного тесту, при якому маркують досліджувані молекул люмінісцентним барвником, який генерують таке випромінювання.

#### 7. **Імунологічні методи, які ґрунтуються на використанні лігандів.**

**Радіоімунний метод** – це метод кількісного визначення антигенів. Антиген, який досліджується, та антиген, мічений радіоактивним йодом, в процесі проведення методики конкурують щодо обмеженої кількості антитіл. Імунні комплекси, які утворюються, усуваються із реакційної суміші адсорбцією або преципітацією іншими антитілами. Активність випромінювання зворотно пропорційна до рівня антигену, який визначається.

**Імуноферментний метод** – це імунологічний метод визначення антитіл або розчинних антигенів в біологічних рідинах. Антиген або антитіло мітяться ферментом. Для того, щоб реакція була видимою, додається субстрат, який після розкладання ферментом змінює колір. Ця зміна кольору вимірюється при певній довжині хвилі як оптична густина. Найбільш відомими є методи ELISA або твердофазний імуноферментний аналіз (enzyme linked immunosorbent assay) та EIA – імуноферментний аналіз. EIA буває в колориметричному варіанті (використовуються хромогенні субстрати) та в хемілюмінесцентному (використовуються хемілюмінесцентні субстрати). При проведенні визначень за методом ELISA часто застосовується так званий “сандвіч”-метод (посилює специфічність виявлення). При його виконанні чергові етапи реакції розділяються між собою відмиванням. Існують також: конкурентний метод – насамперед змішується досліджувана речовина та антиген, зв'язаний із біотином, а потім додаються парамагнітні мікрочасточки, зв'язані із стрептавідином (тобто імунні комплекси іммобілізуються магнітним способом) та метод “bridging” – подібний до методу “сандвіча”, але скерований на визначення антитіл і включає антиген, зв'язаний із біотином.

**Імуноблотинг** (western blotting) – метод полягає у електрофоретичному розділенні білків на целюлозній пластині, їх фіксації, інкубації пластини із сироваткою пацієнта та її відмиванні. Антитіла, зв'язані із відповідними білками, проявляються після додавання міченого ферментом другого антитіла і субстрату. Після того оцінюється кількість полосок ті їх ширина.

9. **Мікробіологічні методи** (для визначення бактеріальних антигенів). Швидке виявлення мікроорганізмів та вивчення їх морфології, необхідне для мікробіологічної діагностики, здійснюється за допомогою мікробіологічного дослідження. Мікробіологічні препарати можуть бути свіжими (досліджуваний матеріал поміщається між предметним та покривним скельцями та оглядається у *фазовоконтрастному мікроскопі*), а також зафіксованими та пофарбованими (матеріал досліджується у *світловому мікроскопі під імерсією*). Найчастіше з досліджуваного матеріалу роблять два *мазки*, один фарбується **по Граму (для виявлення бактерій)**, другий – **по Романовському-Гімза (для визначення клітинного складу)**. Майже всі бактерії, які мають клінічне значення, можуть бути виявленими мікроскопічно за допомогою таких



фарбувань. Виняток складають бактерії, які знаходяться в середині клітини (наприклад, хламідія) та у клітинній стінці (мікоплазма і уреоплазма), і ті, які мають недостатній розмір для візуалізації в мікроскопі (спірохета).

10. **Культивування.** Велике діагностичне значення має вирощування та розмножування бактерій у поживних середовищах. Ідентифікація бактерій полягає не тільки у визначенні їх мікроскопічних характеристик, але і фізіологічних, що можна визначити тільки в умовах *in vitro*. **Чисту культуру бактерій** застосовують для виділення патогенних мікроорганізмів із патологічного біологічного матеріалу, ідентифікації патогенних антигенів та визначення їх чутливості до антибіотиків з метою ініціації та моніторингу антибактеріальної терапії. Дедалі ширшого розповсюдження набуває **культивування імунокомпетентних клітин** у поживних середовищах з додаванням факторів росту та інших цитокінів. Метою такого культивування є або вивчення продуктів синтезу імунних клітин (найчастіше цитокінів), або дорошування незрілих клітин, взятих з біологічного матеріалу пацієнта, до зрілого функціонального стану (дендритні клітини, стовбурові клітини).

11. **Цитологічні та гістологічні методи.** Їх використовують для визначення ступеня інфільтрації тканин організму людини імунокомпетентними клітинами. **Імуноцитохімічні та імуногістохімічні дослідження** допомагають визначити ступінь зрілості цих клітин та їх фенотип. Велике діагностичне значення має імуногістохімія із застосуванням флуоресцентного забарвлення, що дозволяє визначити клас антитіл у депонованих у тканинах імунних комплексах. Найновішим методом із цієї групи є **рідинна тонкошарова цитологія**, яка допомагає визначити в тканині не тільки атипично змінені клітини, але і клітини, які зазнали змін під впливом внутрішньоклітинних інфекцій, наприклад, папіломавірусів.

12. **Визначення кількості лімфоцитів та їх субпопуляцій.** Метод розеткоутворення є найдешевшим серед методів кількісного визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів і ґрунтується на феномені прилипання до поверхні клітини корпускулярних часток.

**Імунофлуоресцентна ідентифікація** окремих популяцій та субпопуляцій імунокомпетентних клітин (лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів) ґрунтується на феномені зв'язування молекул антитіл до антигенів диференціації лімфоцитів (CD – clusters of differentiation), які знаходяться на їх поверхні, з молекулами флуоресцентних барвників. Найчастіше це флуоресцину ізотіоціанат (ФІТЦ), який дає в ультрафіолетових променях зеленувате свічення. Результати обраховують за допомогою проточного цитофлуориметра, який ідентифікує клітини за розмірами (популяції лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів) та за інтенсивністю світіння (чисельність субпопуляцій, щільність рецепторів на мембранах клітин). Для підрахунку клітин можна також використовувати флуоресцентний мікроскоп. При огляді клітин, оброблених міченими антитілами, у мікроскопі потрібно звернути увагу на характерні зони свічення у вигляді кіл (німбів), які вказують на експресовані відповідні антигени диференціації.

**Проточна цитометрія** – це метод виявлення поверхневих антигенів на лімфоцитах (моноцитах, нейтрофілах, базофілах). Для його проведення

використовуються моноклональні антитіла, мічені різними флюоресцентними барвниками, які зв'язуються із мембранами досліджуваних клітин і після збудження лазерним променем відповідної довжини хвилі випромінюють світло. Використовуючи два чи три різних барвники, можна виявити систему антигенів, які експресуються на мембрані (наприклад, у клітини на відповідному ступені її активації). Досліджувані клітини розділяються у проточному цитометрі згідно із ступенем випромінювання світла і ідентифікуються згідно із профілем їх мічення. Оцінці підлягають до 20 000 клітин, результати перераховують на абсолютні числа. За допомогою методу проточної цитометрії можна також визначати активність фагоцитозу. Особливістю методу є застосування мікробного реагенту (*Escherichia coli*, мічені флюоресцентною міткою) та формування в процесі роботи “позитивного” та “негативного” контролю (інкубація клітин з реагентом при +37°C та +4°C). Перед проведенням зчитування лазерними променями інтенсивності світіння (яке означає, що ці клітини фагоцитували мікроорганізми) до суспензії для ідентифікації живих клітин додають пропідій йодид. Результат відображає кількість нейтрофілів, здатних до поглинання.

**Імуноферментний метод** визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів передбачає використання немічених моноклональних антитіл, які інкубують з клітинами. Візуалізація реакції здійснюється за допомогою допоміжних антитіл, до яких приєднується пероксидазна мітка, внаслідок чого при взаємодії фермент-субстрат виникає реакція, яку можна спостерігати за допомогою мікроскопу.

12. **Методи визначення функціонального стану лімфоцитів.** Це в першу чергу **реакція бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ)** – метод, який ґрунтується на використанні культури клітин лімфоцитів. Застосовується для дослідження функціонального стану лімфоцитів. Інтенсивність проліферативної відповіді лімфоцитів (спонтанна, індукована мітогенами – фітогемаглютиніном, конканаваліном А, мітогеном лаконосу, ліпополісахаридом *Escherichia coli*, ліками) є відображенням їх функціональної активності. Після 72-х годинного культивування результати реакції можна оцінити: 1) морфологічним методом; 2) радіоімунним (за швидкістю розпаду радіоактивного тимідину). Морфологічний метод полягає у приготуванні мазка, його фіксації, фарбуванні і підрахунку у світловому мікроскопі бластних форм (властивих більш молодим лімфоцитам). Вирахування співвідношення між стимульованою та спонтанною бласттрансформацією виражається у індексі стимуляції. Облік результатів за допомогою включення радіоактивної мітки є точнішим, але потребує наявності сцинтиляційного лічильника радіоактивного випромінювання (для реєстрації  $\gamma$ -променів). Принциповою відмінністю є те, що за 4 – 6 год до закінчення культивування у пробірці із лімфоцитами вносять  $^3\text{H}$ -тимідин. Рівень включення радіоактивної мітки оцінюють, фіксуючи кількість і частоту імпульсів  $\gamma$ -випромінювання. Результати виражають у імпульсах на 1 хв або у вигляді індексу стимуляції.

Для визначення функціонального стану імунокомпетентних клітин використовують також **метод проточної цитометрії**. Використовуючи два чи

три різних барвники, можна виявити систему антигенів, які експресуються на мембрані клітини на відповідному ступені її активації).

13. **Молекулярно-біологічні методи.** Для визначення ДНК у біологічному матеріалі (у його найменших кількостях) проводять **ланцюгову полімеразну реакцію**. Перший етап методу полягає у тому, що ДНК, взята із матеріалу, ампліфікується (збільшується) у мільйони разів. Потім її поєднують із так званими стартовими молекулами (частіше їх називають праймерами) – це два коротких одониткових олігонуклеотиди. Один праймер повинен бути комплементарним до фрагменту ДНК від 3'– 5'-кінця, другий – від 5'– 3'- кінця ДНК. Далі для синтезу нової ДНК використовуються ДНК-полімераза та трифосфорани дезоксирибонуклеозидів (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Всі етапи реакції є дуже термозалежними, зокрема, денатурація ДНК (для отримання окремих її ланцюгів) відбувається при температурі +94°C, зв'язування праймерів – в межах +37 – 65°C, синтез нової ДНК (полімеризація) – при температурі +73°C. Коли температура знову зростає до 94°C, полімеризація припиняється і цикл розпочинається знову. Цей цикл повторюється від 20-ти до 30-ти разів. Результатом цієї ланцюгової реакції стає збільшення досліджуваної послідовності ДНК у сотні тисяч разів. Ці послідовності в майбутньому можуть бути ідентифіковані за допомогою гель-електрофорезу чи блотінгу. На цьому етапі вони порівнюються із так званими маркерами – зразками ДНК-послідовностей відомих мікроорганізмів чи антигенів іншої (немікробної) природи. Якщо в електрофоретичній картині підтверджується їх ідентичність, це дає безперечну підставу підтвердити присутність у пацієнта даного антигену. Зазвичай антиген визначають не тільки у біологічних рідинах, але і у зішкрябах тканин. Крім якісного підтвердження його наявності, за допомогою методу **ланцюгової полімеразної реакції в режимі Real-time** можна визначити сумарне вірусне навантаження. Особлива комп'ютерна програма перераховує кількість вірусних часток на кількість клітин людини, взятих під час забору, що дозволяє стандартизувати результат аналізу.

14. **Генетичні методи.** Молекулярна **діагностика за допомогою ДНК-зондів** – ґрунтується на принципі здійснення гібридизації амінокислот. Зонди найчастіше мітять флюоресцентними фарбами (хоча можна застосувати радіоактивні мітки). Мічений фрагмент ДНК використовується як зонд для виявлення комплементарних послідовностей ДНК в досліджуваному матеріалі (наприклад, хромосомному препараті). Якщо зв'язування відбулося, значить, у обстежуваного послідовність нуклеотидів (яка формує ген) є правильною, і при мікроскопуванні хромосома має цілісне забарвлення. Якщо ген у пацієнта є дефектним за будовою, зв'язування із зондом не відбудеться, і у досліджуваній хромосомі при мікроскопії у цьому місці буде прогалина, яка має вигляд чорної плями. Цей варіант методу використовується для виявлення дефектних генів у хромосомах. Є ще варіант методики, названий “гібридизація in situ”. При цьому мічений зонд може накладатися на зріз тканини або цитологічний мазок, у яких зв'язується із тими клітинами, які містять комплементарні послідовності ДНК. В такому випадку сигнал зонду виявляють ауторадіографічно або ферментативно (залежно від способу мічення).

В наукових дослідженнях відповідних кафедр або науково-дослідних інститутів використовують особливий (*четвертий рівень*) імунологічного обстеження. Для його виконання об'єднують ряд імуногенетичних та молекулярно-генетичних методів дослідження.

До досліджень **четвертого рівня** відносять:

1. Типування HLA-антигенів I класу (локуси A, B, C) та II класу (локус D: DR, DP, DQ). Набір HLA-антигенів людини визначають шляхом фенотипування. Методи визначення HLA-антигенів включають: *серологічне типування* (реакція зв'язування специфічних антитіл з антигенами на поверхні клітин, найчастіше лімфоцитів) – для HLA I класу; *клітинне типування* (стимуляція проліферації лімфоцитів у змішаній культурі, в якій відсутні дані антигени) – для HLA II класу; *генетичне типування* (аналіз поліморфізму на рівні ДНК: метод гібридизації, метод ланцюгової полімеразної реакції з урахуванням специфічних послідовностей нуклеотидів, метод секвестрування ДНК).

2. Визначення поліморфізму генів Toll-like рецепторів (TLR) та функціональні наслідки мутацій у цих генах. Визначення проводиться за допомогою *різновидності ланцюгової полімеразної реакції* для проведення мутагенезу (внесення змін в нуклеотидну послідовність ДНК) з наступним аналізом біологічного матеріалу.

3. Визначення мутацій генів для діагностики первинних імунодефіцитів. Це визначення проводиться в основному за допомогою *мічених флюоресцентною фарбою ДНК-зондів* – так званий метод FISH, описаний вище.

Найважчим розділом імунологічної лабораторної діагностики є інтерпретація результатів. Її необхідно проводити тільки після збору імунологічного та генетичного анамнезу та клінічного огляду хворого.

### Напрямки дискусії:

1. Сучасні методи фенотипування лімфоцитів. Визначення активаційних маркерів лімфоцитів.
2. Дослідження фагоцитозу на проточному цитометрі.
3. Сучасні методи визначення вірусного навантаження у пацієнта
4. Основні підходи до інтерпретації імунограми.

### Використана література:

1. Лабораторный справочник СИНЭВО / О. В. Небыльцова, Ж. А. Климова, Г. А. Носенко [и др.] – К.: Доктор-Медиа, 2013. – 644 с.
2. Навчальний посібник з клінічної імунології та алергології (для аудиторної роботи студентів) / В. Є. Казмірчук, Г. М. Драннік, Д. В. Мальцев [та ін.] – К.: Поліграф плюс, 2008. – 263 с.
3. Hyde R. M. Immunologia / R. M. Hyde. – Wroclaw: Medyczne Urban & Partner, 1997. – 362 s.
4. Kokot F., Kokot S. Badania laboratoryjne (zakres norm i interpretacja) / F. Kokot, S. Kokot. – Warszawa: Lekarskie PZWL, 2005. – 280 s.

5. Neumeister B. Diagnostyka laboratoryjna (poradnik kliniczny) / B. Neumeister, I. Besenthal, H. Liebich. – Wrocław: Medyczne Urban & Partner, 2003. – 820 s.

### **Тема семінарського заняття №3. Генетичні методи в діагностиці імунодефіцитів – 2 год. (Л.В.Костюченко)**

**Навчальна мета семінарського заняття:** сформувані сучасні знання про необхідність проведення генетичних досліджень при підозрі на первинний імунодефіцит, вибір та можливості генетичних методів та їх інтерпретацію .

**Професійно орієнтована мета заняття:** навчити аспірантів правильно призначати генетичну діагностику при підозрі на первинний імунодефіцит та інтерпретувати отримані результати.

#### **Теми реферативних повідомлень:**

1. Генетичні основи первинних імунодефіцитів (ПД).
2. Значення генетичних тестів в діагностиці ПД.
3. Сучасні методи генетичної діагностики ПД.
4. Інтерпретація результатів генетичної діагностики ПД.
5. Неонатальний скринінг в діагностиці ПД.
6. Генетичне консультування та пренатальна діагностика в сім'ях з ПД.

#### **Короткий зміст теми заняття:**

Первинні імунодефіцити (ПД) – це велика група захворювань, зумовлених різноманітними вродженими генетичними порушеннями механізмів імунного захисту організму, що веде до розвитку важких, рецидивних/ хронічних інфекцій, імунодисрегуляторних феноменів, підвищеної схильності до виникнення онкопатології , часто з загрозою для життя чи інвалідизацією в ранньому віці за рахунок формування незворотних змін в органах і тканинах. Для більшості ПД на сьогодні ідентифіковані генетичні дефекти, що призводять до порушення функцій імунного захисту. Переважна більшість з них – моногенні захворювання, при яких мутація гена зумовлює дефект одного з компонентів системи імунітету і, як наслідок, – порушення комплексу взаємопов'язаних реакцій, необхідних для елімінації сторонніх агентів з організму і розвитку адекватної запальної відповіді. На даний час описано понад 430 молекулярних дефектів з встановленим патогенетичним механізмом впливу на функції імунної системи, і цей перелік щорічно поповнюється новими нозологіями. Діагностика ПД ґрунтується на клінічній картині, імунологічних лабораторних методах, проте ускладнюється існуванням великої кількості нозологічних форм, що мають схожу клінічну картину, та значною варіабельністю клініки у різних пацієнтів при наявності одного і того ж самого генетичного дефекту (в межі однієї нозологічної форми ПД).

Успадкування при ПД, як правило, підпорядковується менделівським законам. Основними типами успадкування, що спостерігаються при ПД, - автосомно-рецесивний, Х-зчеплений рецесивний, рідше – автосомно-домінантний. При автосомно-домінантному типі успадкування досить мутантного гена лише в одній алелі для появи клінічної картини відповідного захворювання. В такому випадку симптоми хвороби можуть спостерігатися у одного з батьків, однак частіше можливе виникнення мутації *de novo*. Але в деяких випадках успадкування ПД відбувається не за менделівськими законами. Фактори оточуючого середовища, соматичні мутації і роль генів-модифікаторів розглядають як компоненти, що впливають на формування фенотипу імунодефіциту. Імовірно, епігенетичні фактори є однією з причин феномена неповної пенетрантності дефекта при автосомно-домінантному типі успадкування, коли при наявності генетичного дефекта фенотип хвороби не проявляється або проявляється неповною клінічною картиною.

Для ідентифікації відомого генетичного дефекту або для пошуку нових мутацій проводять молекулярно-генетичні дослідження. Значна частина цих тестів зараз є комерційно доступними, а деякі проводять лише у високоспеціалізованих наукових лабораторіях. Ідентифікація мутацій у кожного конкретного пацієнта не тільки остаточно підтверджує діагноз, а й робить можливим генетичне консультування сім'ї для визначення носійства дефектних генів і відкриває перспективи для пренатальної діагностики при наступній вагітності. Отримана інформація про аномалію певного гена дозволяє встановити характер успадкування (домінантний, автосомно-рецесивний, зчеплений з Х-хромосомою тощо), а також виявити носіїв і членів сім'ї з атиповими клінічними проявами та імунологічними аномаліями. Ці техніки також використовують для дослідження ще невідомих імунних дефектів і дозволяють ідентифікувати нові нозологічні форми імунодефіцитів. Корисним може бути збереження генетичного матеріалу пацієнта та членів сім'ї, навіть якщо ідентифікація генетичної аномалії на даний час неможлива. Ідентифікація генетичного дефекту є важливою також з огляду на те, що в останні роки розпочались активні дослідження щодо можливостей генної терапії.

Генетична інформація зберігається в нуклеотидних послідовностях ДНК або РНК організму. Процес визначення правильного порядку нуклеотидів у заданому фрагменті (в гені, скупченні генів, хромосомі та повному геному) відомий як секвенування (визначення нуклеотидних послідовностей). Метою генетичного дослідження є аналіз структури та функції генів. Існують різні типи методів секвенування, розроблені вченими. Серед них секвенування за Сангером, розроблений Фредеріком Сангером у 1977 році, широко використовувалося та популяризувався протягом тривалого періоду часу, поки секвенування наступного/нового покоління не замінила його. Цим методом проводили переважно вивчення нуклеотидних послідовностей окремих заданих генів (single-gene sequencing, SGS). Секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) - термін, що використовується для позначення сучасних процесів секвенування з високою пропускнуою здатністю. Він описує

низку різних сучасних технологій послідовності, які зробили революцію в геномних дослідженнях та молекулярній біології. Це методи секвенування Illumina, секвенування Roche 454, секвенування іонного протона та послідовності SOLiD (секвенування шляхом виявлення лігації Оліго). Системи NGS швидші та дешевші. Чотири основні методи секвенування ДНК використовуються в системах NGS, а саме: піросеквенціювання, секвенування синтезом, секвенування шляхом лігування та іонного напівпровідникового секвенування. Велика кількість ниток ДНК або РНК (мільйони) може бути секвенсована паралельно. Це дозволяє секвенувати задані фрагменти ДНК, обрані гени (таргетні панелі генів), екзом чи навіть весь геном організмів за короткий проміжок часу, на відміну від Сангерського секвенування, яке займає більше часу. NGS має багато переваг перед звичайним методом Сангера. Це швидкісний, більш точний і економічно вигідний процес, який можна виконати з невеликим розміром вибірки. NGS може бути використаний у метагеномічних дослідженнях, при виявленні варіацій в межах індивідуального геному за рахунок вставки та делеції тощо та в аналізі експресії генів.

Прилади, на яких виконується секвенування нового покоління, використовують технологію "секвенування за допомогою синтезу" (sequencing-by-synthesis, SBS). Одна із застосовуваних технологій в обладнанні такого роду - це детекція сигналів іонів водню ( $H^+$ ), які з'являються при роботі ДНК полімерази в процесі інкорпорації нуклеотидів. По суті, такий прилад являє собою дуже чутливий рН-метр. Кожен чіп, який використовується для дослідження, містить мільйони іон-чутливих напівпровідникових транзисторних (ion-sensitive field-effect transistor, ISFET) сенсорів, що дозволяють паралельну детекцію безлічі реакцій секвенування. Технологія "секвенування за допомогою синтезу" дозволяє отримувати більш довгі послідовності ДНК на відміну від інших технологій. Перевагами напівпровідникової технології є: порівняно низька ціна виробництва приладів, чіпів і реагентів і швидкий процес секвенування одночасно великій кількості пацієнтів.

Цільове/таргетне секвенування генів (TGS) – це одночасне секвенування вибраних екзонів у генах, які, як відомо, спричиняють специфічні захворювання, такі як різні форми ПІД з подібною клінічною картиною. Гени та специфічні екзони, включені до TGS, зазвичай відбираються на основі опублікованих раніше даних. Панелі генів для TGS, пропонувані комерційними лабораторіями, класифікуються залежно від визначених клінічних фенотипів. Деякі приклади цих панелей наведені в таблиці 2 (автори не підтримують жодної конкретної лабораторії для генетичного тестування). TGS аналізує лише конкретні екзони, що містять відомі патогенні варіанти, також воно може включати деякі флангові інтронні та регуляторні області. При виборі відповідної групи клінічний фенотип повинен узгоджуватися з імунологічним дефектом певного типу. Остаточний діагноз ПІД залежить від підтвердження патогенності варіанту за допомогою або раніше опублікованих у літературі даних, або подальших функціональних досліджень нещодавно ідентифікованого мутантного білка. Повноекзомне секвенування (WES) дає інформацію про послідовність ДНК усіх

кодуючих білки областей, або екзону, з усіх приблизно 20 000 генів в геномі людини. Цей метод широко використовується для діагностики ПДД зі значною генетичною і фенотиповою варіабельністю, де TGS не виявилося інформативним. Як правило, це пацієнти з неясним діагнозом, неповною або нетиповою клінічною картиною хвороби. Точність WES істотно зростає при одночасному проведенні цього тестування близьким родичам пробанда. Найчастіше обстежують «тріо» - пробанда і його батьків. Використання WES у ПДД дає можливість встановити молекулярний діагноз приблизно до 40% пацієнтів з атиповим перебігом і дає можливість модифікувати лікування у 10-25% з них.

Повногеномне секвенування (WGS) – визначення послідовностей як кодуючих, так і некодуючих областей геному, а також може включати дані про мітохондріальну ДНК. Роль некодуючих регіонів, які становлять приблизно 99% геному, при ПДД залишається в основному невідомою, хоча вона включає регуляторні елементи, які можуть модифікувати експресію генів. WGS може включати варіанти дефектів, не охоплених WES, але WGS вимагає значно більше часу на аналіз і є значно дорожчим, ніж інші методи, через великий обсяг даних, що генеруються. Кінцевою метою генетичного тестування пацієнта є підтвердження/встановлення генетичного дефекту, включно з можливістю відкриття нових, раніше невідомих генетичних дефектів. Саме генетична верифікація діагнозу надає лікарю впевненості у виборі подальшої тактики лікування, прогнозувати перебіг хвороби, планувати тактику лікування, зокрема приймати складні рішення щодо радикальних методів терапії – трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку, при деяких формах ПДД - генно-інженерної терапії.

Велика кількість ПДД можна діагностувати пренатально з використанням біопсії ворсин хоріона, вивчення культури клітин амніотичної рідини або аналізу фетальної крові, але ці дослідження використовуються тільки у випадку відомої мутації у когось з членів родини (як правило, у попередньої в сім'ї дитини з генетично верифікованим ПДД). Так, наприклад, можна пренатально діагностувати хворобу Брутона, синдром Віскота-Олдрича, атаксіо-телеангіектазію, Х-зчеплений лімфопроліферативний синдром, всі форми важких комбінованих імунодефіцитів (з використанням теста TREC), всіх форм хронічної гранулематозної хвороби та ін. Стать дитини можна встановити при УЗД чи каріотипуванні, що дає можливість виключити зчеплені з Х-хромосомою захворювання у дівчинки.

### **Напрямки дискусії:**

1. Чому важливо проводити генетичну діагностику хворим на ПДД?
2. Як змінився діагностичний підхід до генетичної верифікації при підозрі на ПДД?



3. Які методи генетичної діагностики слід обрати для пацієнта з підозрою на ПІД (синдром ДіДжорджа, хвороба Брутона, гіпер-IgE синдром та при нетиповій клініко-лабораторній картині ПІД)?

4. В яких випадках доцільно проводити пренатальну діагностику ПІД?

#### **Використана література:**

1. J.Chinen, M. Lawrence, M.Dorsey, et al. Practical approach to genetic testing for primary immunodeficiencies. *Ann Allergy Astma Immunol* 123(2019), 433-439.
2. Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol*. 2018;38:96e128.
3. Ochs HD, Petroni D. From clinical observations and molecular dissection to novel therapeutic strategies for primary immunodeficiency disorders. *Am J Med Genet A*. 2018;176:784e803.
4. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15:565e574.
5. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405e424.
6. Puck JM. Prenatal diagnosis of primary immunodeficiency diseases. In: Milunsky A, Milunsky JM, eds. *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention, and Treatment*. 7th edition. Hoboken, New Jersey: Wiley Blackwell; 2016:xv, 1188 pp.
7. Drury S, Hill M, Chitty LS. Cell-free fetal DNA testing for prenatal diagnosis. *Adv Clin Chem*. 2016;76:1e35.

#### **Тема семінарського заняття №4. Сучасна молекулярна алергодіагностика алергічних хвороб – 2 год. (С.О.Зубченко)**

**Навчальна мета заняття:** сформувати у лікарів-слухачів знання про сучасні підходи до діагностики респіраторних і шкірних проявів алергічних хвороб з використанням молекулярних методик.

**Професійно орієнтована мета заняття:** навчити лікарів-слухачів інтерпретувати результати сучасного методу компонентної алергодіагностики.

#### **Теми реферативних повідомлень:**

1. Поняття молекулярної діагностики.
2. Структура окремих компонентів алергенів.
3. Основні принципи молекулярної діагностики.

4. Коротке визначення основних понять в молекулярній діагностиці.
5. Можливості молекулярної діагностики в Україні.
6. Принципи вибору АСІТ на підставі молекулярної діагностики.

### Короткий зміст теми заняття

Значним кроком у вирішенні діагностичних проблем в царині алергології стало використання окремих алергенних молекул (замість екстрактів), що запровадило нову область молекулярної (МО) або компонентної діагностики алергії. Вона дозволяє виявити окремі молекули, до яких пацієнт є чутливим. За останні 30 років фахівцям з молекулярної біології вдалося детально виявляти і охарактеризувати структуру окремих алергенів на молекулярному рівні. Сьогодні для науковців і клінічних алергологів доступною є база даних про алергени ([www.allergen.org](http://www.allergen.org), [www.allergome.org](http://www.allergome.org)), яка з кожним роком поповнюється. У даний час, описано понад 3000 різних алергенів (плюс приблизно 1400 ізоформ), майже 1500 з яких є рекомбінантними алергенами

Підґрунтям молекулярної діагностики були наступні твердження:

1. Кожне джерело алергенів може містити кілька алергенів.
2. Різні алергени, що містяться в одному джерелі, мають різноманітні фізико-хімічні характеристики, які в значній мірі визначають клінічні прояви алергії.
3. Низка алергенів може бути основою для перехресних імунологічних реакцій з гомологічними білками інших рослин. Ідентифікація алергену може допомогти попередити ті чи інші потенційно небезпечні реакції, пов'язані з перехресним реагуванням.
4. Наявність сенсibiliзації, встановленої за допомогою ШПТ і визначення специфічних IgE *in vitro*, не завжди відображає можливість клінічних маніфестацій алергопатології.
5. Ефективність АІТ алергенами пов'язана з наявністю сенсibiliзації до конкретних мажорних або мінорних компонентів.

Для кращого розуміння понять у МО подаємо коротке визначення основних з них:

**Істинний алерген** - викликає специфічну сенсibiliзацію до відповідного джерела алергенів.

**Мажорними (головними)** вважають алергени, які зв'язуються з IgE у 50% і більше пацієнтів з однаковою алергією. Іншими словами, більшість пацієнтів ( $\geq 50\%$ ) з однаковою алергією сенсibiliзовані до одного і того ж алергену.

**Первинний алерген** – це оригінальна сенсibiliзуюча молекула (тобто головний «пусковий механізм» на відміну від вторинної сенсibiliзації із-за перехресної реактивності). Як правило мажорні алергени також є істинними і первинними.

Важливим параметром, який необхідно враховувати є також – кількість молекул у джерелі алергену.

**Перехресна реактивність** – феномен розпізнавання, зв'язування антитіл ізо типу IgE і запуску імунної відповіді до подібних алергенних молекул (гомологів), які можуть бути присутні у різних видів організму. **Паналерген** – перехресно реактивний алерген, який належить до білкового сімейства з високою консервативністю структури між багатьма дальнородними видами, здатний ініціювати зв'язування з антитілами ізо типу IgE (наприклад профіліни або сироваткові альбуміни).

*Сенсибілізація за наявності sIgE:*

**Моносенсибілізація** – сенсибілізація до одного джерела алергену;

**косенсибілізація** – сенсибілізація більше ніж до одного джерела алергену;

**полісенсибілізація** – сенсибілізація до трьох або більше джерел алергенів.

Компоненти алергенів відносяться до різних сімейств. Сімейство білків є групою білків, які мають загальне еволюційне походження, що знайшло відображення в першу чергу, на їх аналогії в структурі. Версія 29.0 бази даних Pfam (Protein family) описує 16,295 сімейств білків. Сімейства згруповані разом в суперсімейства - наприклад, суперсімейство проламінів. Деякі сімейства діляться на підродини (наприклад, PR-10-подібні білки є підродина сімейства Bet v 1, рисунок 4. Члени сімейства білків можуть також мати спільні біологічні функції і імунологічні характеристики, а також аналогічні амінокислотні послідовності. Антитіла класу IgE в межах одного сімейства білків часто виявляють перехресну реактивність.

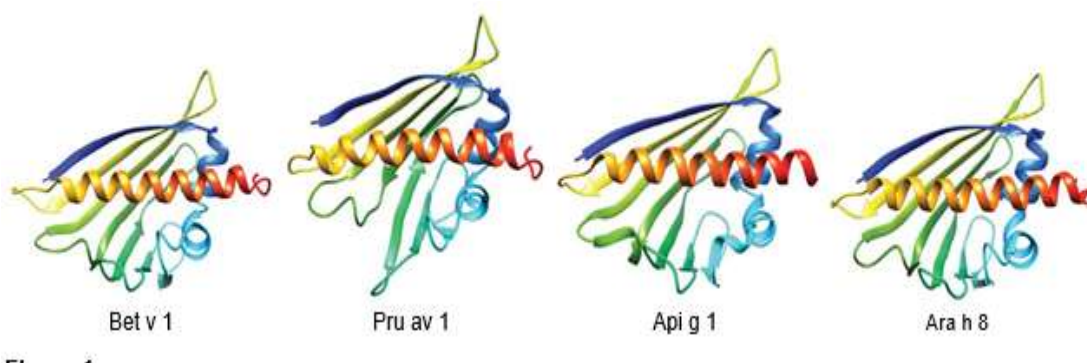


Рисунок 4.

PR-10-подібні білки - підродина сімейства Bet v 1 (P. Matricardi, J. Kleine-Tebbe, H. Hoffmann, R. Valenta, M. Ollert, Ronald van Ree et al. *Molecular Allergology*, EAACI, 2016, p.58)

Ця інформація допомагає виявляти справжню сенсибілізацію до джерела алергенів, особливо для призначення АІТ. По-друге, за допомогою МА можна

виявити сенсibilізацію до певних перехресно реактивних алергенних білків або білковим родин, що вносить вклад у визначення причинного джерела алергенів і більш коректних рекомендацій пацієнтові з урахуванням виключення контакту з алергеном. І по-третє, МА допомагає оцінити ризик розвитку реакцій, пов'язаних з певними алергенами (тобто тип реакції, місцева або системна). Для проведення МА використовується метод дослідження за допомогою сучасних діагностичних тест-систем ALEX, ImmunoCap, ISAC. Дані діагностичні методики дозволяють виконувати визначення рівнів специфічних IgE до рекомбінантних або виокремлених із натуральних джерел окремих алергенних молекул і дають уявлення про сенсibilізуючий профіль пацієнтів.

В Україні найчастіше проводять компонентну діагностику у випадку алергії до респіраторних пилоквих алергенів, наприклад, до пилку дерев родини Букоцвітних, а саме берези, вільхи, ліщини, дуба. Оскільки схожість молекул пилку цих дерев між собою є дуже високою, визначення специфічних IgE проводять лише до молекул пилку берези (rBet v1, rBet v2, rBet v4). Підвищення sIgE до мажорного алергену rBet v1 визначає первинну чутливість до пилку дерев родини Букоцвітних. При виявленні підвищення sIgE лише до мінорних алергенів (rBet v2, rBet v4) - можна діагностувати перехресну реактивність. Виявлення сенсibilізації до мінорного алергену rBet v2, який належить до групи профілінів, дає можливість визначити перехресні реакції з пилом інших рослин та з гомологічними молекулами різних овочів та фруктів. Підвищення рівня sIgE до rBet v4, який належить до групи полкальцинів - характеризує перехресну реактивність пилку берези з іншими видами пилку. І в такому випадку потрібно проводити подальшу діагностику для пошуку істинної сенсibilізації до інших видів алергенів.

Наступним кроком після отримання повної інформації про індивідуальний профіль сенсibilізації конкретного пацієнта є прогностична оцінка різних форм алерген-специфічної імунотерапії. Ефективність АСІТ залежить власне від молекулярного профілю сенсibilізації.

#### **Алгоритм прогнозу ефективності АСІТ екстрактом пилку різних дерев роду Букоцвітні (лат. Fagales)**

<b>Прогноз ефективності АСІТ</b>	<b>rBet v 1 «+»</b>	<b>rBet v 1 «+»</b>	<b>rBet v 1 «-»</b>
	<b>rBet v 2, rBet v 4 «-»</b>	<b>rBet v 2, rBet v 4 «+»</b>	<b>rBet v 2, rBet v 4 «+/-»</b>
	<b>Висока</b>	<b>Середня</b>	<b>Низька</b>

Основні підходи і практичні рекомендації з молекулярної алергології зібрані в погоджувальному документі WAO-ARIA-GALEN (2013). У позиційному документі наведені основні покази до застосування МО.

### Покази до застосування компонентної діагностики

<b>Передумови (умови, клінічні випадки) для потенційного підвищення точності алергодіагностики за допомогою компонентів алергенів</b>	
Призначення АІТ	Оліго/моносенсибілізація респіраторними алергенами
	Полісенсибілізація пилковими алергенами
	Алергія на отруту перетинчатокрилих комах
Анафілаксія	Харчова анафілаксія, підсилена кофактором
	Сповільнена анафілаксія до червоного м'яса
	Ідіопатична анафілаксія
Полісенсибілізація	Пилки і рослинна їжа
Харчова алергія	Оцінка ризику
	Визначення непередбачених ініціаторів (таргетних чинників) алергену

Таким чином, впровадження в практику компонентної діагностики дозволить спрогнозувати вірогідність виникнення симптомів алергії, можливість перехресної алергії, визначити ситуації їх ризику, обрати оптимальні елімінаційні заходи, зокрема дієту при проявах ХА, а також підвищити ефективність АСІТ.

#### ***Напрямки дискусії:***

1. Переваги методу молекулярної діагностики на тестами *in vivo*.
2. Використання молекулярної діагностики у пацієнтів з полісенсибілізацією.
3. Основні білкові родини і їх значення в інтерпритації результатів молекулярних досліджень.
4. Прогнозування ефективності АСІТ на підставі молекулярних досліджень.
5. Можливості молекулярної діагностики в Україні.

#### **Використана література**

1. Hamilton RG. Clinical laboratories worldwide need to report IgE antibody results on clinical specimens as analytical results and not use differential positive thresholds. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:811-2.

2. Lockey RF. The importance of knowing how allergen extracts are manufactured. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;118:2-3.
3. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy* 2015;70:1079-1090.
4. Curin M, Garib V, Valenta R. Single recombinant and purified major allergens and peptides: how they are made and how they change allergy diagnosis and treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;119:201-9.
5. Mari A, Scala E, Alessandri C. The IgE-microarray testing in atopic dermatitis: a suitable modern tool for the immunological and clinical phenotyping of the disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:438-44.
6. Sastre J, Landivar ME, Ruiz-Garcia M, Andregnette-Rosigno MV, Mahillo I. How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy* 2012;67:709-11.
7. Asero R, Villalta D. Profilin may be a primary airborne sensitizer: a case report. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):134-5.
8. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage, Baena, Cagnani CE et al. A WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* 2013;6:17.

**Тема семінарського заняття №5. Апоптоз та автоімунні хвороби.  
Автоантитіла в діагностиці автоімунних хвороб – 2 год. (Х.О.Ліщук-  
Якимович)**

**Навчальна мета заняття:** сформувати у лікарів-слухачів знання про апоптоз та автоімунні хвороби, а також про аутоантитіл в діагностиці автоімунних хвороб

**Професійно орієнтована мета заняття:** навчити лікарів-слухачів інтерпретувати значення виявлених аутоантитіл в діагностиці автоімунних хвороб

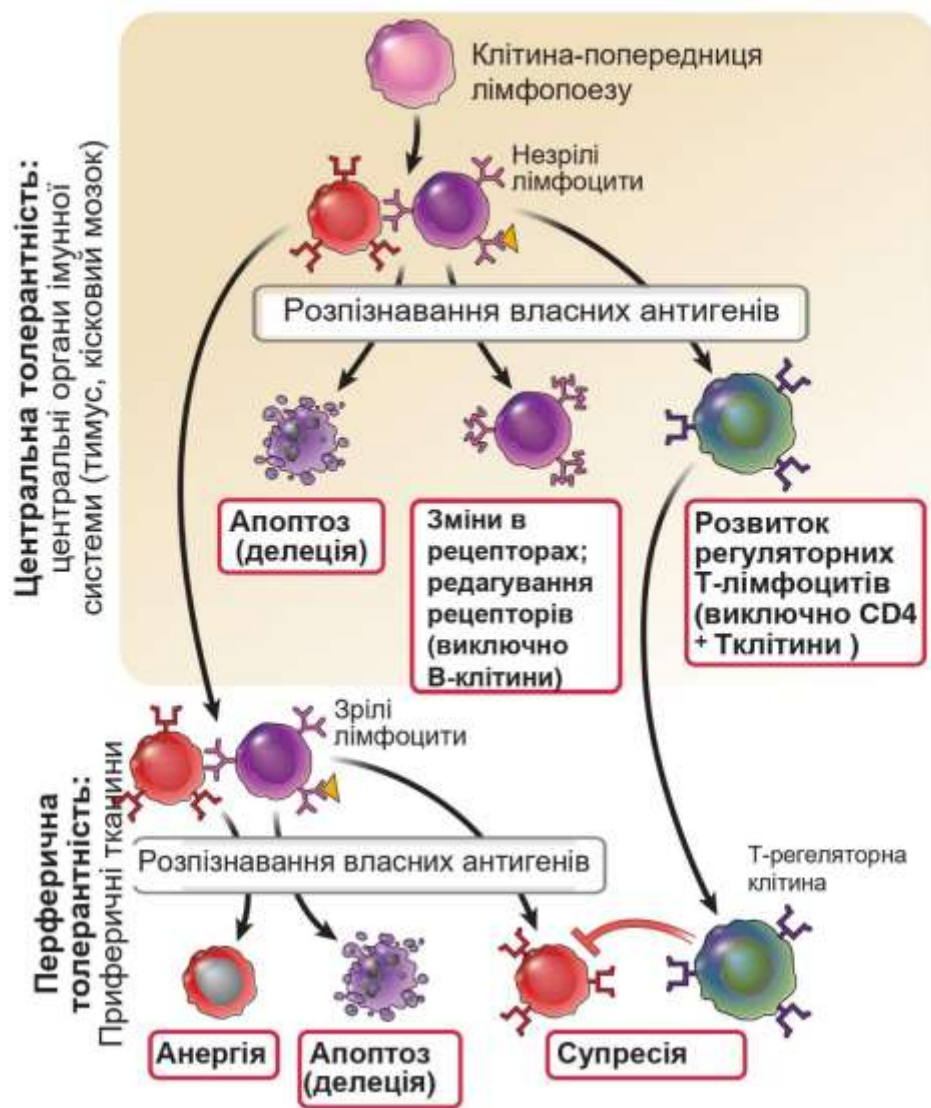
**Теми реферативних повідомлень:**

1. Що таке апоптоз? Стадії апоптозу.
2. Механізми індукції апоптозу
3. Роль спадкових факторів у регуляції апоптозу
4. Значення апоптозу в формуванні аутоімунної патології
5. Модуляція процесів програмованої клітинної смерті

## Короткий зміст теми заняття:

Апоптоз, який представляє собою процес програмованої клітинної смерті, дуже важливий для імунної системи: він відповідає за підтримання імунологічної толерантності і контроль над кількістю лімфоцитів. Посилення апоптозу може спричинити розвиток імунодефіцитного стану, а ослаблення - стати причиною виникнення аутоімунних станів або лімфом. Клітини, що піддаються апоптозу, мають класичні морфологічні та біохімічні ознаки: в них фіксується зменшення ядра і цитоплазми, утворення на мембрані випинань, ущільнення (конденсація) хроматину, фрагментація ДНК, зміна кальцієвих потоків і втрата асиметрії мембрани. Класично апоптотичні зміни клітини порівнюються з некротичними. Однією з відмінностей є збереження мембранної цілісності апоптотичної клітини, що запобігає вивільненню внутрішньоклітинного вмісту в зовнішнє середовище. Такий контрольований процес призводить до того, що вираженого запального процесу у відповідь на розвиток апоптозу не спостерігається, на відміну від вираженого запалення, що викликається некрозом.

Процес апоптозу може бути поділений на три послідовних стадії: • початкова стадія - фаза ініціації - викликається зовнішніми або внутрішніми стимулами; • після того як процес ініціювався, в нього включається механізм, пов'язаний з рецепторами клітинної смерті, що призводить до активації позитивних і негативних регуляторних білків; • термінальна фаза проявляється деградацією клітини з розщепленням структурних білків, конденсацією хроматину і фрагментацією ДНК і є незворотною. У людському організмі апоптоз опосередкований двома різними, але перехресними сигнальними шляхами - зовнішнім і внутрішнім. Зовнішній шлях активується рецепторами клітинної смерті, які є членами сімейства фактора некрозу пухлини- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ), включаючи Fas (CD95), його ліганд FasL (CD178) і споріднений ФНП- $\alpha$  апоптоз-індукуючий ліганд TRAIL і його рецептори TRAIL-R1 і R2. Включення рецепторів клітинної смерті призводить до активації каспази-8 (протеази, яка бере участь у формуванні апоптозу) за допомогою додаткового білка FADD (білок, пов'язаний з доменом загибелі Fas). Каспаза-8 після активації може прямо активувати ефекторні каспази, такі як каспаза-3, які ініціюють руйнування клітинних компонентів. Внутрішній сигнальний шлях апоптозу запускається через відсутність факторів росту, клітинним стресом або цитотоксичними факторами (медикаменти, ксенобіотики, глюкокортикоїди і т. інше), які діють в концентраціях, що не викликають цитолізу (рисунок 5). В середині цих сигнальних шляхів функціонує кілька важливих регуляторних ланок, що підсилюють відповідь. Наприклад, каспаза-8 також активує Bcl-2.



**Рисунок 5.**

Механізми забезпечення центральної та периферичної толерантності до аутоантигенів ((Аббас А.К., Ліхтман Е.Г., Піллай Ш., 2020)

### Апоптоз і розвиток аутоімунних процесів

Сьогодні остаточно сформувалося уявлення про те, що нездатність до розвитку програмованої клітинної смерті і недостатня елімінація апоптичних клітин можуть призводити до розвитку аутоімунних процесів. Таке уявлення базується на двох основних положеннях: по-перше, відсутня здатність до припинення імунної відповіді і контролю над автореактивними лімфоцитами, по-друге, вплив аутоантигенів на тлі запалення може ініціювати імунну відповідь проти них. Безсумнівно, що дефект апоптозу обґрунтовує розвиток аутоімунного процесу і



забезпечує сприйнятливість до розвитку таких захворювань, але для виникнення повної клінічної картини необхідні поломки в багатьох імунорегуляторних механізмах. Одного тільки порушення в окремій ланці фагоцитозу апоптичних клітин може бути не достатньо для розвитку аутоімунного захворювання. Сучасні дослідження підтверджують, що в основі більшості аутоімунних захворювань лежать генетичні механізми, зокрема полігенні мутації.

### **Системний червоний вовчак (СЧВ) та апоптоз**

Апоптотичні клітини є при СЧВ можливим джерелом аутоантигенів. Макрофаги пацієнтів, які страждають на СЧВ, мають порушену здатність фагоцитувати апоптотичні клітини. Таким чином, можливим механізмом порушення толерантності при СЧВ може бути дефект як апоптозу, так і фагоцитозу. Вважається, що механізм розвитку аутоімунної відповіді полягає в тому, що нефагоцитовані апоптотичні клітини піддаються вторинному некрозу, що ініціює відповідь проти власних антигенів. Підтвердження цього феномену отримані в моделях на тваринах. У хворих на СЧВ виявлені сильні зв'язки між дефіцитом С1q і СЧВ, у пацієнтів з вродженим дефіцитом С4 відзначають меншу частоту важкого СЧВ, а особи з С3-дефіцитом взагалі не мають клінічних ознак цього захворювання. Наведені дані свідчать про ієрархію білків в середині класичного шляху активації системи комплементу. Описано моделі, в яких розвивалися СЧВ-подібні захворювання внаслідок недостатнього апоптозу лімфоцитів через підвищену експресію Bcl-2, порушення експресії Fas / FasL.

### **Розсіяний склероз та апоптоз**

Розсіяний склероз - це демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи, яке належить до органоспецифічних аутоімунних процесів. Основним імунологічним феноменом при цьому захворюванні є Т-клітинна імунна відповідь на основний білок мієліну. Активовані Т-клітини, сенсibiliзовані антигенами мієліну, проникають в мозок та ініціюють місцевий запальний процес: залучаються макрофаги, посилюється продукція прозапальних цитокінів, активується система комплементу. Наслідком цього є апоптоз клітин центральної нервової системи, демієлінізація та руйнування аксонів. Одним з імунологічних механізмів розвитку розсіяного склерозу може бути порушення регуляції активізаційно-індукованої клітинної загибелі, що приводить до ослаблення апоптозу активованих автореактивних клонів Т-клітин. Такі порушення можуть з'являтися внаслідок підвищення експресії Bcl-2 у пацієнтів з розсіяним склерозом. Широко впроваджується сьогодні застосування інтерферону- $\beta$  в лікуванні розсіяного склерозу, що призводить до індукції апоптозу в імунних клітинах на периферії, зниження експресії ядерних факторів, що беруть участь в синтезі прозапальних цитокінів, і, відповідно, до ремісії захворювання.

### **Ревматоїдний артрит та апоптоз**

В патогенезі цього захворювання важливе значення має дефект апоптозу. В основі розвитку ревматоїдного артриту лежить інфільтрація запальними клітинами, що призводить до руйнування синовіальної мембрани, вираженої гіперплазії синовіоцитів і секреції таких прозапальних цитокінів, як інтерлейкін-6 та ФНП- $\alpha$ . В модельних дослідах на тваринах було показано, що при ревматоїдному артриті спостерігається гіперпроліферація і порушення активізаційно-індукованої клітинної загибелі CD4 T-клітин, що призводить до накопичення автореактивних T-клітин на периферії.

Великі перспективи відкриваються перед модуляцією процесів програмованої клітинної смерті і посиленням видалення апоптотичних клітин в якості терапевтичної стратегії при автоімунних захворюваннях. Одним з напрямків є блокування або активація молекул, що беруть участь в розвитку апоптозу. Блокування окремих генів за допомогою РНК-технологій або зміна білків сигнальних шляхів стає доступним методом для модуляції апоптозу в окремих тканинах. Інгібітори каспаз, а також інгібітори вивільнення цитохрому сьогодні проходять клінічні дослідження при ревматоїдному артриті та розсіяному склерозі. Наступним напрямком є посилення елімінації апоптотичних клітин фагоцитами. Сьогодні доведена можливість фармакологічного впливу на макрофаги для посилення очищення тканин від апоптотичних клітин. Глюкокортикостероїди через глюкокортикостероїдні рецептори активують цю функцію макрофагів внаслідок перепрограмування диференціювання макрофагів в клітини з фагоцитарним фенотипом. Важливим є те, що посилення фагоцитарних функцій макрофагів під впливом глюкокортикостероїдів відбувається без збільшення секреції прозапальних цитокінів.

Другим важливим моментом є специфічна діагностика автоімунних захворювань. Автоімунні захворювання - це група різноманітних за клінічним проявом захворювань, що розвиваються внаслідок вироблення антитіл проти власних тканинних антигенів, які при тривалій дії спричиняють руйнування та запалення тканин. Клінічні прояви автоімунних захворювань є різноманітними залежно від того, які і скільки тканин та органів макроорганізму втягуються в патологічний процес. Результати лабораторних тестів допомагають при виборі методів лікування та оцінки ефективності проведення терапії.

Ключовим пунктом лабораторної діагностики автоімунних хвороб є визначення специфічних автоантигенів та антитіл до них.

Основними діагностичними маркерами ревматичних захворювань в якості первинних (скринінгових) серологічних тестів, рекомендованих міжнародним комітетом із стандартизації методів, є антиядерні антитіла (ANA), антитіла до нейтрофільних цитоплазматичних антигенів (ANCA), антифосфоліпідні антитіла, ревматоїдний фактор (РФ), антитіла до циклічного цитрулінового пептиду. В якості вторинних (підтверджуючих) пропонуються тести для

визначення антитіл до ДНК, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1,  $\beta$ 2-глікопротеїну I ( $\beta$ 2-ГП I). При призначенні лабораторних тестів, пов'язаних з аналізом ауто антитіл, слід враховувати, що скринінгові тести повинні мати високу діагностичну чутливість, а підтверджуючі тести - високу діагностичну специфічність. Більшість ауто антитіл не є специфічними для якого-небудь захворювання, вони продукуються в різних комбінаціях. Закономірність тієї чи іншої комбінації наявних антитіл і їх концентрація з урахуванням клінічної картини є корисним діагностичним критерієм у лікуванні ревматичних АІХ. Визначення аутоантитіл особливо важливо для ранньої діагностики ревматичних АІХ та клініко-лабораторної характеристики варіантів їх перебігу. Позитивні результати визначення аутоантитіл входять у число діагностичних критеріїв низки системних ревматичних захворювань і можуть мати прогностичне значення в рамках окремих субтипів цих захворювань. Однак, виявлення ауто антитіл при відсутності клінічних ознак не є достатнім для постановки діагнозу АІХ. Відзначено наростання частоти виявлення ауто антитіл у осіб похилого віку, на тлі приймання медикаментозних препаратів, при вірусних та бактеріальних інфекціях, злоякісних новоутвореннях. При оцінці клінічного значення аутоантитіл необхідно враховувати стійкість і вираженість їх гіперпродукції.

Виявлення певних типів аутоантитіл при ревматичних захворюваннях вказує на характерні особливості клінічного перебігу. Так, у пацієнтів, які мають в сироватці специфічний набір антитіл, спостерігається особливий перебіг захворювання, що відрізняється від симптоматики хворих, які не мають цих антитіл. При системному червоному вовчаку, що супроводжується появою антитіл до Ro/SS-A, гломерулонефрит формується рідше, ніж у хворих, які мають високий титр антитіл до dsDNA, але спостерігається певний ризик розвитку уражень шкіри з підвищеною фоточутливістю. Поряд із дослідженням ауто антитіл найбільш корисними лабораторними тестами в ревматології є методи визначення маркерів запалення (ШОЕ, С-реактивний білок). Ці тести дозволяють оцінити активність захворювання, характер прогресування і його прогноз, а також ефективність проведеної терапії.

Виявлення LE-клітин служить морфологічним проявом імунологічного феномену, характерного для системному червоному вовчаку. Специфічність дослідження становить 30-40%; при оцінці результатів характерний суб'єктивізм; цей метод трудомісткий і застарілий у наш час. Дослідження необхідно проводити до початку кортикостероїдної терапії. Негативний результат дослідження не виключає можливості даного захворювання. LE-клітини виявляються в ранній період захворювання, а також при вираженому нефротичному синдромі.

Антинуклеарні антитіла (ANA) - гетерогенна група аутоантитіл, що реагують з різними компонентами ядра. Основна мета дослідження ANA - виключити системний червоний вовчак, оскільки при цьому захворюванні ANA з'являються в сироватці 95% хворих протягом 3 місяців після початку захворювання. Крім того, наявність ANA може бути пов'язано з такими захворюваннями, як ревматоїдний артрит, склеродермія, синдром Шегрена, дерматоміозит, поліміозит, дискоїдний червоний вовчак та з іншими погано вивченими синдромами (наприклад, з CREST-синдромом - різновид склеродермії у вигляді кальцинозу, синдрому Рейно, дискінезії стравоходу, склеродактилії і телеангіоектазії, прогресуючим системним склерозом). Частота позитивної реакції на ANA серед нормальної популяції становить приблизно 2-4%. ANA виявляють в 93% випадків при системному червоному вовчаку, у 60% - при синдромі Шегрена, в 40% - при ревматоїдному артриті і 15% випадків при підлітковому ревматоїдному артриті. До теперішнього часу описано більше 100 різновидів ANA, спрямованих проти цитоплазматичних і ядерних структур (проти нуклеїнових кислот, гістонів, білків ядерної мембрани, компонентів сплайсосоми, рибонуклеопротейну, білків ядерець і центромер). ANA можуть бути розділені на три групи: 1) справжні ANA - до dsDNA, ssDNA, гістонів, ядерної РНК; 2) Антитіла до екстрагованих ядерних антигенів - до Sm, n-RNP, Scl 70; 3) цитоплазматичні антитіла - до SS-A (Ro), SS-B (La) і Jo-1. SS-A (Ro) і SS-B (La) можуть локалізуватися як в цитоплазмі, так і в ядрах. Позитивний результат скринінгових тестів указує наявність у хворого одного або поєднання декількох різновидів ANA. Негативний результат такого тесту більше, ніж у 95% випадків дозволяє виключити системному червоному вовчаку, медикаментозний вовчак, синдром Шегрена, системний склероз, дерматоміозит і поліміозит. Необхідно пам'ятати, що вчасна і коректна діагностика є першим кроком до постановки діагнозу та призначення адекватної.

### ***Напрямки дискусії:***

1. Апоптоз: визначення поняття та основні характеристики
2. Апоптоз і розвиток аутоімунних процесів
3. Оцінка ефективності алергенімунотерапії з використанням різних алерговакцин. Особливості апоптозу у пацієнтів на органоспецифічні та системні аутоімунні захворювання
4. Діагностичні маркери ревматичних захворювань.

### **Використана література.**

1. Wang L, Wang F.S, Gershwin M.E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. J Intern Med. 2015;278:369-95. doi: [10.1111/joim.12395](https://doi.org/10.1111/joim.12395)

2. Theofilopoulos A.N, Kono D.H, Baccala R. The Multiple Pathways to Autoimmunity. Nat Immunol. 2017;18:716-24. doi: [10.1038/ni.3731](https://doi.org/10.1038/ni.3731)
3. Suurmond J, Diamond B. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. J Clin Invest. 2015;125(6):2194-202. doi: [10.1172/JCI78084](https://doi.org/10.1172/JCI78084)
4. Leclair V, Lundberg IE. New Myositis Classification Criteria-What We Have Learned Since Bohan and Peter. Curr Rheumatol Rep. 2018 Mar 17;20(4):18. doi: [10.1007/s11926-018-0726-4](https://doi.org/10.1007/s11926-018-0726-4). PMID: 29550929; PMCID: PMC5857275.
5. Monti S, Águeda AF, Luqmani RA, Buttgereit F, Cid M, Dejaco C, Mahr A, Ponte C, Salvarani C, Schmidt W, Hellmich B. Systematic literature review informing the 2018 update of the EULAR recommendation for the management of large vessel vasculitis: focus on giant cell arteritis. RMD Open. 2019 Sep 16;5(2):e001003. doi: [10.1136/rmdopen-2019-001003](https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-001003). PMID: 31673411; PMCID: PMC6803016.

**Тема семінарського заняття №6. Імунодіагностика в онкології.  
Фенотипування в онкогематології. Онкомаркери в онкологічній практиці  
– 2 год. (Г.О.Потьомкіна)**

**Навчальна мета заняття:** подати слухачам сучасні знання про принципи імунодіагностики, фенотипи злоякісних клітин та онкомаркери в онкологічній практиці.

**Професійно-орієнтована мета заняття:** навчити слухачів призначати імунологічні дослідження онкохворим та правильно визначати перелік онкомаркерів та фенотипової панелі антитіл для діагностики онкопатології.

**Теми реферативних повідомлень:**

1. Основні принципи імунодіагностика хворого з онкопатологією.
2. Переваги та недоліки цитоморфологічного та гістохімічного дослідження в онкогематології.
3. Класифікація онкомаркерів за походженням.
4. Біохімічні та імунологічні методи дослідження.

**Короткий зміст теми заняття.**

Пухлини кровотворної та лімфоїдної тканини серед усіх форм злоякісних пухлин займають п'яте місце серед чоловіків і восьме місце серед жінок. За даними Національного Реєстру онкологічних захворювань України в статеві-віковій структурі захворювання і смертності особливо висока частка гострого лейкозу в дітей (до 17 років) і молодих осіб (19-28 років).

Незадовільною є діагностика, заснована на застарілих класифікаціях гемобластозу та використанні рутинних методів лабораторних досліджень. Значною мірою це пояснюється відсутністю ефективності терапії, спрямованої на знищення клону лейкозних клітин, адже їх лінійне походження та ступінь диференціації не враховані. Використання сучасних методів діагностики (панель антитіл до лінійних специфічних, диференційних та активізаційних антигенів кровеносних клітин) у поєднанні з сучасними молекулярними й

імунологічними методами дає можливість ідентифікувати основні форми онкогематологічних процесів (в першу чергу, гострого мієлоїдного та гострого лімфоїдного лейкозів з визначенням транслокації), що важливо для призначення відповідної схеми лікування.

При проведенні досліджень, пов'язаних із вивченням механізмів канцерогенезу та лейкогенезу, у якості маркерів для уточнення гістогенезу окремих форм і цитологічних варіантів пухлин різного походження в останній час поряд з традиційними морфологічними методами все ширше застосовують методи імуноцитохімії з використанням широкого спектру тканино-, лінійноспецифічних та пухлинноасоційованих моноклональних антитіл (МкАТ).

***Імунодіагностика хворого з онкопатологією включає:***

- ✓ цитоморфологічні методи;
- ✓ імунофенотипування кісткового мозку, периферійної крові, асцитичної рідини, плевральної рідини та інших рідин організму (сучасне комплексне дослідження, в якому за рахунок одночасної реєстрації декількох параметрів, забезпечується більша точність визначення природи злоякісно трансформованих кровотворних і лімфоїдних клітин, що є основою для проведення ефективного лікування);
- ✓ цитохімічні методи, в т.ч. визначення активності: мієлопероксидази, кислої фосфатази, кислої неспецифічної естерази, нафтол-AS-D-хлорацетатестерази, лужної фосфатази. Здійснюється PAS-реакція для визначення вмісту в клітинах глікогенімуногістохімічне дослідження;
- ✓ молекулярний скринінг;
- ✓ цитогенетичне дослідження – визначення генетичних аномалій, що виявляють в ядрах клітин.

***Мікроскопія*** не завжди дозволяє виявити морфологічні зміни, специфічні для різних онкологічних процесів, хоча електронний мікроскоп допоміг вивчити ультраструктурну будову пухлинної клітини (збільшений розмір і неправильна форма ядра, збільшення кількості функціонально активного еухроматину, наявність в ядрі включень тощо), порушення міжклітинної взаємодії, наявність інфільтруючого росту. Електронна мікроскопія не здатна встановити хімічний склад включень та вакуолей, антигенний склад клітини. Тому електронна мікроскопія не набула розповсюдження в онкологічній практиці.

***Гістохімічне дослідження*** дає можливість вивчити локалізацію хімічних речовин в клітинних структурах, тканинах, а також проаналізувати їх функціонально-метаболічний стан. В арсеналі цього методу є багато реакцій, які дозволяють виявити білки (реакція з динітрофторбензолом), вуглеводи (ШИК-реакція/ПАС-реакція, реакція Шифф-йодная кислота), нуклеїнові кислоти (фарбування метиловим зеленим-піроніном), ліпіди (фарбування Суданом чорним В). Гістохімічний метод допомагає в багатьох випадках вирішити проблему диференційної діагностики. Наприклад, позитивна ШИК-реакція підтверджує епітеліальну природу пухлини. Широко застосовуються ці методи в діагностиці лейкозів.

Але з моменту розробки ***імуногістохімічного методу*** почалася нова ера в практиці гістологічних досліджень. Цей метод дуже чутливий і специфічний,

дозволяє виявляти маленькі фрагменти структури клітин. Імуногістохімічний метод — застосування моноклональних і поліклональних антитіл на гістологічних зрізах для визначення локалізації різних білків в тканинах та окремих клітинах. Цей метод продемонстрував найбільшу ефективність в практичній онкології

До нових гістохімічних маркерів подібного моноклональних антитіл (МКАТ) відносяться пектини, які більш доступні та менш коштовні за ціною ніж МКАТ. Лектини - група білків неімунного походження, що не відносяться до імуноглобулінів, і мають спільну властивість високоспецифічно та зворотно реагувати з вуглеводами, не викликаючи зміни їх хімічної структури. Інтерес до вивчення пектинів пов'язаний з їх унікальною властивістю специфічно реагувати з окремими вуглеводами. Висока афінність зв'язку з лігандами,, простота та доступність отримання та очистки робить пектини незамінним реагентом для вивчення структури і функції глікокон'югатів.

Реакція між антигеном і антитілом є найбільш специфічною в біології, тому імуногістохімічні методи більш чутливі, ніж традиційні цитохімічні. Продуктом реакції в цьому випадку є комплекс антиген-антитіло, який утворює преципітати за наявності розчиненого антигену або аглютинат при взаємодії з корпускулярним антигеном. Необхідною умовою успішного визначення різних внутрішньоклітинних компонентів за допомогою мічених антитіл є збереження антигенів в досліджуваних об'єктах. У практичній онкології імуногістохімічні методи застосовуються для верифікації пухлин людини, визначення первинної пухлини при дослідженні анонічного метастазу, вивчення провісних і прогностичних факторів пухлини, виявлення вірусів і мікроорганізмів.

За сучасними вимогами, при багатьох пухлинах патологоанатомічний діагноз повинен містити також прогностичні й провісні імуногістохімічні показники. *Прогностичні фактори* — клінічні, патологоанатомічні та біологічні особливості хворих і їх пухлин, які вказують на клінічний перебіг захворювання без лікування. *Провісні фактори* — клінічні, патологоанатомічні, біологічні особливості, які використовують для визначення ймовірної відповіді на специфічне лікування.

Для верифікації пухлини дослідник спочатку підбирає панель антитіл з урахуванням тих гістологічних діагнозів, між якими проводиться диференційна діагностика. Для цього потрібно знати імуногістохімічну характеристику кожної пухлини і різні варіанти визначення тих чи інших антитіл. Для спрощення цього процесу складені таблиці імунофенотипу пухлин. Для діагностики лімфом, низькодиференційованих карцином і сарком, безпігментної меланоми, нейроендокринних пухлин обов'язково потрібно імуногістохімічне дослідження. При дослідженні сарком і недиференційованого раку тільки на зрізах, фарбованих гематоксилін-еозином (без імуногістохімічного дослідження), помилки становлять 20–46%. Використовувати класифікацію ВООЗ для діагностики лімфом без імуногістохімічних досліджень неможливо — в основу класифікації покладено імунофенотип пухлинних клітин. Навіть експерти в галузі лімфопроліферативних захворювань припускаються помилок у половині

випадків лімфом, якщо з діагностичного алгоритму виключено імуногістохімічне типування.

У щоденній патологоанатомічній практиці 10–15% випадків пухлин обов'язково потребують імуногістохімічних досліджень для верифікації.

Наприклад, морфологічний діагноз раку молочної залози буде неповним без інформації щодо наявності рецепторів естрогену і прогестерону у клітинах пухлини. Визначення онкобілків EGFR, апоптозу дозволяє отримати інформацію про майбутній перебіг захворювання та відповідь на лікування. За наявності високої експресії білка HER-2/неу показники 5-річної виживаності в хворих на рак шлунку, легені в 2 рази нижчі. У хворих на рак язика 10-річна виживаність у разі експресії білка Vcl-2 становить 40%, а при Vcl-2-негативній пухлині — 72%. Мутація гена p53 і визначення експресії білка p53 також є важливим прогностичним фактором. Так, у випадках p53-позитивного раку стравоходу 5-річна виживаність становить 7%, а при p53-негативних пухлинах — 63%.

Такі дослідження є невід'ємною частиною практичної онкології. Гормональна терапія багатьох пухлин (передміхурової залози, матки, молочної залози, менінгіоми) проводиться тільки за наявності рецепторів гормонів в ядрах пухлинних клітин. У минулі роки, до впровадження імуногістохімічного дослідження, вибір адекватної терапії таким пацієнтам був значно довшим і менш ефективним, що погіршувало прогноз. У сучасних умовах інформація щодо провісних і прогностичних факторів, а також щодо фенотипу пухлини дозволяє скоригувати лікування та подальше ведення пацієнта.

Урахування провісних факторів пухлини дозволяє покращити результати лікування на 15%, уникнути приймання непотрібних ліків при гормональній та хіміотерапії. Завдяки успіху біохімії та молекулярної біології на сьогодні існує багато імуногістохімічних показників, які допомагають онкологам у прогнозі клінічного перебігу пухлини, підборі терапії і обсягу хірургічного втручання. Вони допомагають вивчити механізми регулювання проліферації та диференціювання пухлинних клітин, тому що в основі злякисної трансформації є активація одного чи кількох клітинних онкогенів або генів-супресорів. Багато з них діагностуються імуногістохімічно.

Слід враховувати, що жоден із факторів не має повної специфічності, тому що концентрація кожного із них може змінюватись не тільки при розвитку злякисних новоутворів, але й при інших хворобах. Кожен онкомаркер характеризується дискримінаційним рівнем (максимально припустима верхня межа концентрації даного білка у здорових осіб). Певний маркер відповідає критеріям онкологічного в тому випадку, коли при заданому дискримінаційному рівні його специфічність становить 90–95%, а чутливість перевищує 50%.

**Класифікація онкомаркерів за походженням:** 1) *онкофетальні*: раково-ембріональний антиген (PEA); альфа-фетопротейн (АФП); хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ); специфічний бета-протейн вагітності; СА-125; СА-15–3; СА-19–9; СА-50; СА-72–4; 2) *ферменти*: флукозилтрансфераза; кисла фосфатаза проста; лактатдегідрогеназа



нейронспецифічна енолаза; тимідинкіназа; тиміделатсинтетаза; специфічний антиген передміхурової залози (простатичний специфічний антиген — ПСА); 3) *рецептори*: прогестеронові; естрогенові; 4) *гормони*: АКТГ; АДГ; плацентарний лактоген; кальцитонін; ПТГ; пролактин; 5) *інші сполуки*: феритин; бета-2-мікроглобулін; імуноглобуліни; тканинний поліпептидний специфічний антиген; С-21-1; тканинний поліпептидний антиген; муциноподібний раковоасоційований антиген (МСА).

Найбільш відомі онкогени: *ras*, *p21*, *p53*, *bcl-2*, *c-erbB-2* (HER2/neu). Так, за наявності ампліфікації *c-erbB-2* в пухлинах при раку молочної залози (навіть без наявності метастазів) 10-річна виживаність хворих становить 40%, а в разі відсутності ампліфікації цього онкогену — 85%. Експресія *c-erbB-2* пов'язана з резистентністю пухлини до хіміотерапії і тамоксифену. У цьому відношенні є демонстративні дані: при лікуванні тамоксифеном загальна виживаність хворих на рак молочної залози становить 75%, у випадках *c-erbB-2*-позитивного раку молочної залози — 13% за наявності експресії цього гена.

Створені й активно впроваджуються препарати для лікування хворих з пухлинами деяких фенотипів (таргетна терапія). Наприклад, у випадках гіперекспресії білка HER2 при раку молочної залози використовують препарат трастузумаб.

**Біохімічні та імунологічні методи дослідження.** Ці методи дослідження широко використовують у клінічній онкології, проте вони не є високоспецифічним. Біохімічні методи дослідження часто є рутинними в плановому обстеженні онкологічних хворих, однак деякі види онкологічної патології можна діагностувати, використовуючи розширені можливості даної галузі. Відомо, що у 75% хворих на термінальну стадію раку передміхурової залози виявляють високий рівень кислій фосфатази в крові, а при раку підшлункової залози — збільшення рівня амілази в крові (25%), при раку печінки — збільшення печінкової фракції лужної фосфатази. Біохімічні тести можуть виявити ендокринну секрецію пухлини і пояснити багато клінічних синдромів, зумовлених тканинноспецифічною чи паранеопластичною ендокринною активністю. Наприклад, у діагностиці гормонопродукуючих новоутворень та пухлин APUD-системи часто відмічають високий рівень АКТГ, АДГ, ПТГ, тиреостимулюючого, фолікулостимулюючого, лютеотропного, меланостимулюючого гормону, еритропоетину, кортизолу, адреналіну, норадреналіну, інсуліну, гастрину, серотоніну та інших гормонів.

Місцеві та системні зміни імунітету можна виявити при імунологічному дослідженні крові із використанням основних традиційних та сучасних методик. Імунологічні методи необхідні для створення нових діагностичних та лікувальних технологій, включаючи імунотерапію із врахуванням особливостей імунної системи конкретного пацієнта. Сучасна діагностика імунологічних порушень дозволяє провести їх корекцію в онкологічних хворих.

Сьогодні імунофенотипування онкогематологічних захворювань є одним з найбільш затребуваних клінічних застосувань проточної цитометрії. Слово "фенотип" в медичній мові означає "зовнішній вигляд". Наприклад, гострий

лейкоз змішаного фенотипу – це пухлинне захворювання крові, при якому швидко утворюються пухлинні клітини різних клітинних ліній, які мають вибіркочувливість до різних схем лікування. Зовні ці клітини одночасно схожі на лімфоїди і на мієлоїдні. Цей вид лейкозу включає біфенотиповий лейкоз, змішаний лейкоз, що зустрічається дуже рідко (не більше 4% всіх випадків гострого лейкозу).

### **Напрямки дискусії:**

1. Етапність проведення досліджень у хворих на онкопатологію.
2. Місце біохімічних та загальних імунологічних досліджень у діагностиці онкопатології.
3. Значення провідних і прогностичних факторів у хворих на онкопатологію.
4. Використання онкомаркерів для оцінки перебігу та прогнозу розвитку онкопатології.
5. Основні принципи діагностики онкопатології з використанням моноклональних антитіл.

### **Використана література:**

1. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АН, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева Ж.И. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 13-26.
2. Базові методи лабораторних імунологічних досліджень / В.В. Чоп'як, О.С. Прилуцький, Г.О. Потьомкіна [та інші]. // Методичні рекомендації – Львів -Донецьк. – 2008. – С. 66.
3. Біосиміляри: особливості будови// Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя» № 4 (449), лютий 2019 р.
4. Доказова імунопрофілактика та імунотропна терапія: монографія /В.В.Чоп'як.-Львів: Априорі, 2013.-336 с.
5. Ли́ла А.М., Насо́нов Е.Л., Олю́нин Ю.А. и др. Актуальные аспекты современной ревматологии // Терапия. — 2018. — Т.22. — №4. — С.13-19. [Lila AM, Nasonov EL, Olyunin YA, et al. Actual aspects of contemporary rheumatology. Therapy. 2018;22(4):13-19. (In Russ).] URL: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_35358410\\_12615792.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_35358410_12615792.pdf).
6. Настанова з оцінки імуногенності терапевтичних білків (Rev 1) (18 May 2017 EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

### **Тема семінарського заняття №7. Система НЛА в репродуктології та трансплантології. Функціональні методи оцінки імунної системи в репродуктології та імунології – 2 год. (А.М.Гаврилюк)**

**Навчальна мета заняття:** подати аспірантам сучасні знання про систему НЛА та значення у реалізації репродуктивної функції жінки та підборі пари «донор-реципієнт»

**Професійно-орієнтована мета заняття:** навчити аспірантів принципів імунодіагностики, зокрема методів визначення фенотипів різних цитотоксичних клітин, небезпечних для виношування і трансплантації чужорідних тканин та органів

### **Теми реферативних повідомлень:**

- 1.Будова HLA – системи. Головні класи HLA – системи. Класичні та некласичні локуси та сублокуси.
- 2.Методи типування HLA – антигенів, їх переваги та недоліки.
- 3.Асоціації між HLA – антигенами та репродуктивними втратами у жінок.
4. Діагностична цінність визначення функціональної активності НК-клітин

### **Короткий зміст теми заняття.**

**HLA-система** – це частина головного комплексу гістосумісності (MHC), що об'єднує його 1-й та 2-й класи. Людські лейкоцитарні антигени (HLA) є високополіморфними, тобто у кожному локусі є значне число алелей. На підставі вже вивчених генів кількість можливих комбінацій є астрономічно великою, у зв'язку з чим у світі практично не існує двох людей, однакових за особистими наборами HLA-антигенів. Таке генетичне розмаїття повністю унеможливорює підбір пари «донор-реципієнт» з ідентичними антигенами. Лейкоцитарні антигени містяться на всіх соматичних та імунокомпетентних клітинах людини. На гаметах розміщуються особливі лейкоцитарні антигени «некласичних» локусів 1-го класу (E, F, H, G). Класичні та некласичні HLA антигени класу I. Молекули MHC класу I людини беруть участь у презентації антигенів Т-лімфоцитам. Їх можна поділити на класичні, які належать до класу Ia (**HLA-A, -B, -C**) та некласичні, які належать до класу Ib (**HLA-E, -F, -H, -G** та MICA і MICB).

Визначення комплекту лейкоцитарних антигенів людини необхідно для створення її генетичного імунологічного «паспорту», визначення активності кілерних клітин та активації цитотоксичного захисту; визначення схильності до того чи іншого імунопатологічного синдрому. Наявність певних антигенів HLA може бути пов'язано з більшим або меншим ризиком розвитку певних хвороб (близько 500). У більшості випадків цей зв'язок нез'ясований. Надаємо приклади статистично достовірних кореляцій між системою HLA та хворобами: анкілозуючий спондилоартрит асоціює з антигеном B27; целиакія – з DR3; вроджена гіперплазія наднирників - з B47; хронічний активний гепатит – з B8; хвороба Аддісона – з DR3; псоріаз – з B13; міастенія – з B8 і т.д. У складних випадках, коли відсутні клінічні прояви хвороби, типування HLA-антигенів може допомогти в диференційній діагностиці.

Молекули I-го та II-го класів МНС мають незаперечне значення у фізіологічному виношуванні вагітності, розвитку ендометріозу, схильності до хронічних урогенітальних інфекцій у жінок. HLA-асоційована аутоімунна патологія у жінок також призводить до розвитку непліддя. *Експресія класичних HLA-C антигенів I-го класу на трофобласті.* На клітинах трофобласту відсутні інші класичні молекули МНС класів I та II, крім HLA-C. Крім вище вказаних молекул, на клітинах трофобласту присутні некласичні молекули МНС класу Ib - HLA-G та HLA-E. Антигени HLA-C належать до найменш імуногенних молекул МНС і навіть не приймаються до уваги при підборі пари донор-реципієнт при трансплантації. Експресія *некласичних HLA-E та HLA-G* присутня на позазародкових тканинах і може бути вирішальною у визначенні імунологічних стосунків між матір'ю та плодом. Молекули (антигени) HLA-G можуть оберігати тканини плода від NK-клітин і Т-цитотоксичних лімфоцитів, гальмуючи активність цих клітин. *Асоціація між HLA-антигенами II-го класу та спонтанними викиднями.* Результати проведених досліджень показали, що гени, розміщені в різних частинах II-го класу МНС (HLA B – HLA DR –HLADQ), пов'язані з різними аспектами репродукції. Однак, набір HLA-антигенів не є єдиним механізмом, що задіяний у дефектах репродукції. Сегмент МНС, який впливає на репродукцію - це набір генів, асоційованих з аутоімунними хворобами, а їх співставлення наводить на думку про асоціацію аутоімунних хвороб та дефектів репродукції. У жінок із спонтанними викиднями найчастіше виявляють антигени B44, DR5 та DQ в регіоні HLA-DR.

*Генетична схильність до хламідійної та інших інфекцій у жінок.* Імунна система більшості жінок здатна пригнічувати інфекцію, проте у деякого відсутня адекватна протиінфекційна відповідь. Саме в них часто розвиваються хронічні інфекції. Встановлено, що у жінок з наявними антитілами до білків теплового шоку cHSP60, був у 2-3 рази підвищений ризик інфікування *Chlamydia trachomatis*. Підтверджена сильна асоціація між алеллю HLA-A\*6802 (МНС клас I) та схильністю до інфікування *Chlamydia trachomatis*. Жінки із клінічними симптомами запальних захворювань органів малого тазу інфекційного генезу (хламідіоз, гонококовий цервіцит, ендометрит) мали підвищену експресію таких HLA-антигенів, як DQA \*0301, DQA\*0501, DQB\*0402.

Генетична різниця між донором та реципієнтом призводить до *розпізнавання антигенів донора імунною системою реципієнта як чужих* та включення імунних реакцій відторгнення, які знищують трансплантат. Визначення HLA-фенотипу донора і реципієнта (*трансплантаційна селекція*) проводиться за антигенами локусів HLA I-го класу – A, B, C (класичні або трансплантаційні антигени) та HLA II-го класу – D (DR, DP, DQ). Кожна людина володіє індивідуальним набором HLA-антигенів, які відносяться до I-го класу (локуси A,B,C) та II-го класу - локусD: DR (>400 алельних варіантів), DP(>25 алельних варіантів), DQ(>57 алельних варіантів). Набір HLA-антигенів людини визначають шляхом фенотипування. Вірогідність знайти донора, повністю сумісного за системою HLA-антигенів, складає: 1:1 000 - 1:1 000 000.

Практика показала, що найбільше значення для пересаженого органу має сумісність за антигенами трьох локусів - DR, B і A. Антигени інших локусів HLA

системи набагато менше впливають та ефективність приживлення органу. Для успішної трансплантації необхідно підібрати максимально гістосумісно-тотожний фенотип клітин донора і реципієнта. Для оцінки ступеня гістосумісності запропонований *індекс гістосумісності*. При наявності одного ідентичного антигену в донора і реципієнта – індекс гістосумісності буде складати – 25%; при наявності двох ідентичних антигенів у донора і реципієнта – індекс гістосумісності буде складати – 50% і так далі. Потрібно врахувати, що люди відрізняються між собою не тільки самими HLA-антигенами, але і їх кількістю в комплекті. Тому, якщо реципієнт і донор мають комплекти по 8 HLA-антигенів, то при наявності двох ідентичних антигенів індекс гістосумісності буде складати – 25% і т.п. Деякі антигени системи HLA відповідно до своєї будови є певною мірою гомологічними, виявляючи сильні і слабкі перехресні реакції. Ці антигени склали кілька груп. Сильними за локусом A є: A1, 3, 11; A2, 28; A23, 24; A25, 26; A 30,31; за локусом B є: B5,35; B7, 22, 27; B8, 14; B12, 21; B13, 40; B15; 17; B38, 39. Встановлено, що наявність у донора антигенів HLA з сильними перехресними реакціями підвищує індекс гістосумісності на 20%, з слабкими перехресними реакціями – на 10%. Наприклад, фенотип донора наступний: **A15, A23, B2, B13, B15, DR 10**; фенотип реципієнта: **A15, A24, B 27, B13, B17, DR 12**. У цьому випадку індекс гістосумісності = 90%.

У клінічній практиці за результатами підбору пари донор-реципієнт за HLA-антигенами прогнозують ефективність пересадки та тривалість функціонування трансплантату. Найкращий результат для приживлення трансплантату дає сумісність в локусах HLA-B (I-й клас MHC) та HLA-DR (II-й клас MHC), меншою мірою HLA-A (I-й клас MHC). Навіть при ідеальній сумісності за HLA-антигенами може відбутися відторгнення, бо можлива несумісність за антигенами локусів HLA-DQ та –DP, які не визначаються за стандартними протоколами, а також так званими мінорними, або «слабкими» HLA-антигенами тканинної сумісності.

Функціональні методи оцінки імунної системи в репродуктології та імунології.

Натуральні кілерні клітини (НК) (natural killer - NK) є популяцією лімфоїдних клітин вродженого імунітету і становить 5–15% від усіх мононуклеарних клітин периферичної крові. НК клітини є ключовими ефекторами проти пухлинних, інфікованих вірусами та різними внутрішньоклітинними патогенами автологічних клітин через гранзим/перфорин-опосередкований лізис клітин та/або продукцію прозапальних цитокінів. Поділяються на дві субпопуляції: 1) клітини з потужною експресією CD56, які не мають на своїй поверхні молекул CD16 або їх експресія дуже незначна - CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+/-</sup>, знаходяться в основному в лімфатичних вузлах, продукують прозапальні цитокіни IFN- $\gamma$ , GM-CSF та TNF- $\alpha$ , але проявляють слабку цитотоксичність; 2) клітини з низькою експресією CD56 та сильною експресією CD16 - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, їх кількість у крові становить біля 90%, характеризуються швидким синтезом IFN $\gamma$  і сильними цитотоксичними властивостями.

НК клітини вперше були ідентифіковані Kiessling et al. у 1975 році, котрі виявили, що дефекти функцій НК клітин призводять до аутоімунних, інфекційних та онкологічних хвороб. Також пригнічення функцій НК клітин може відбуватися після хірургічного лікування, прийому імуносупресивної терапії і т.д., що проявляється у першу чергу зниженням продукції цитокіну IFN $\gamma$ . Також знижується експресія їх рецепторів – активуючих NKG2D та DNAM-1 та інгібуючих NKG2A, PD-1, TIGIT та TIM-3. Крім них, НК клітини також експресують достатньо рецепторів до цитокінів, в тому числі до (IL)-2R та IL-12R. За умов норми активація НК клітин відбувається у такій послідовності: 1) інтеграція активуючих та інгібуючих лігандів через відповідні їм рецептори; 2) фосфорилування та сигнальна трансдукція через сигнальні протеїни STAT4, STAT5, p38 MAPK та S6; 3) включення діяльності транскрипційного фактора, контролюючого транскрипцію цитокіну IFN $\gamma$  та протеїнів з цитотоксичною активністю – гранзимів та перфорину.

Завдяки великій кількості активаторних та інгібіторних рецепторів, НК клітини розпізнають, швидко реагують на потенційні клітини-мішені і можуть виконувати свої ефекторні функції без попередньої стимуляції, тобто проявляють спонтанну цитотоксичність. Репрезентативним прикладом синергічної співпраці різних активаторних рецепторів на НК клітинах є пара NKG2D (CD314) та 2B4 (CD244). Родинними лігандами для NKG2D є нетипові, але до молекул I-го класу системи МНС: 1) UL16-зв'язуючий протеїн (UL16-binding protein – ULBP-16); 2) неklasична молекула МНС I-го класу MICA/B, яка належить до класу Ib (HLA-E, -F, -G та MICA і MICB), які проявляють свої властивості під дією стресованих, вірусінфікованих та пухлинних клітин. Рецептор 2B4 насамперед розпізнає молекулу CD48 на гематопоетичних клітинах-мішенях, знищує їх, що попереджує гематологічну малігнізацію.

Отже, встановлення функціонального стану НК клітин має надважливе значення для лабораторної діагностики пацієнтів з вищепереліченими імунопатологічними синдромами та імунозалежними хворобами. Крім цього, встановлення здатності до своєчасної активації та виконання своїх цитотоксичних функцій важлива для жінок з невиношуванням вагітності та пацієнтів після трансплантації органів, котрим загрожує відторгнення.

Вироблено сучасну стратегію фенотипового та функціонального дослідження НК клітин, яку потрібно реалізовувати, досліджуючи не тільки матеріал від хворих, але і контрольної групи. Протоколи дослідження функцій НК клітин складаються з таких аналізів: 1) встановлення відмінностей у експресії різних рецепторів, необхідних для активності НК клітин; 2) особливостей фосфорилування; 3) кількісного визначення внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних рецепторів до IFN $\gamma$ . В основному для цього застосовують метод проточної цитометрії після стимуляції іономіцином РМА чи IL-2/IL-12 та імуноферментного методу (ELISA). Відомі три протоколи досліджень.

Протокол 1. Зовнішньоклітинне забарвлення рецептора. Використовуючи панель з 10-ти кольорів для проточної цитометрії, досліджують експресію 6-ти рецепторів на NK клітинах, а саме здатних активувати (NKG2D and DNAM-1) чи інгібувати (NKG2A, PD-1, TIGIT, and TIM-3) ефекторні функції NK клітин. Для дослідження експресії субодиниць [CD25 ( $\alpha$ ), CD122 ( $\beta$ ), CD132( $\gamma$ ), and CD212 ( $\beta$ 1)] рецептора IL-2/12 використовуючи панель з 9-ти кольорів. Визначають відсоток позитивних клітин, у яких встановлюють відносний рівень експресії (relative expression level) та серединну інтенсивність флуоресценції (median fluorescence intensity - MFI) активаторних та інгібіторних рецепторів до цитокінів на NK клітинах фенотипів CD56bright та CD56dim.

Протокол 2. Забарвлення внутрішньоклітинних фосфорильованих сигнальних білків, яке регулюється рецепторами до IL-2/12, що можна визначити за допомогою 7-ми кольорів на панелі проточного цитометра. Використовують фосфо-специфічні антитіла до STAT5, STAT4, p38 MAPK, та S6, за допомогою яких на відносному рівні визначають процеси у NK клітинах фенотипів CD56bright та CD56dim.

Протокол 3. Внутрішньоклітинне забарвлення IFN $\gamma$  для кількісного визначення внутрішньоклітинної продукції IFN $\gamma$ , що відображає активність NK клітин. Визначають продукцію цього цитокіна у відповідь на стимуляцію іономіцином РМА (незалежна від рецепторів стимуляція) або IL-2/12. На проточному цитометрі використовують 6-ти кольорову панель і встановлюють відсоток клітин CD56bright та CD56dim NK клітин, які продукують IFN $\gamma$ , порівнюючи результати з нестимульованим контролем. Важливо знати, чи підвищена продукція IFN $\gamma$  корелює з посиленням фосфорилуванням сигнальних протеїнів. Так як STAT4 фосфорилується у відповідь на зв'язування з рецептором до IL-12, це веде до продукції IFN $\gamma$ . Досліджуючи кореляцію між серединною інтенсивністю флуоресценції (MFI) pSTAT4 та IFN $\gamma$  у NK клітинах CD56bright та CD56dim, підтвердили, що фосфорилування є процесом протилежним до продукції цитокінів. Яким чином це взаємодоповнюється, потрібно вивчити в майбутньому на зразках великої популяції обстежених. Кількісна оцінка позаклітинної продукції IFN $\gamma$  відбувається імуноферментним методом (ELISA) у плазмі крові або у супернатанті культури клітин пацієнтів.

Визначення активності NK клітин (NK cell activity - NKA) може бути використана як прогностичний біомаркер, зокрема, для моніторингу прогресування хвороби та ефекту терапевтичного лікування. Стандартним методом дослідження функціональної NKA є вивчення цитотоксичності NK клітин проти пухлинних клітин, мічених радіоактивним ізотопом  $^{51}\text{Cr}$  або флуоресцентною фарбою (Europium або Calcein). Ці методи ґрунтуються на вимірюванні вільної радіоактивності чи флуоресценції у супернатанті після лізису клітин-мішеней ефекторними NK клітинами. Однак, вони є громіздкими та мають технічні недоліки - недосконале мічення, високий рівень спонтанного

вивільнення речовини-мітки з клітин-мішеней, потреба у ручному приготуванні радіоактивного матеріалу.

З огляду на це, для визначення НКА почали застосовувати проточну цитометрію (flow cytometry -FC). Цитотоксичність визначається за: 1) експресією молекули на поверхні клітини CD107a; 2) рівнем внутрішньоклітинної продукції цитокінів, яка визначається за допомогою певного флуоресціюючого забарвлення. За допомогою FC визначається кількість та фенотип НК клітин (за експресією маркерів CD16 та CD56 на поверхні), проте визначення НКА краще характеризує їх «фізіологічний» стан. За іншим варіантом методу, функції НК визначають після їх стимуляції клітинами мієлогенолейкемії K562 або В-лімфобластоїдними, котрі позбавлені HLA-антигенів та стимулюють взаємодію ліганд-рецептор. Ці клітини експресують багато лігандів, активуючих НК клітини - NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44, 2B4 та LFA-1. Використовують також гібридомні клітини-мішені: мишачі, які мають на собі подібні до людських ліганди до NKG2D та 2B4 (P815-ULBP1+CD48) для виявлення їх експресії; та кошачі для визначення коекспресії ULBP1 та CD48 та цитотоксичної дегрануляції НК клітин у стані спокою. У порівнянні з клітинами-мішенями людського походження K562, визначення НКА за допомогою тваринних гібридом краще виявляє відмінності у функції НК між контрольною групою здорових людей та, наприклад, онкохворих. Цей метод дозволяє провести дослідження у цільній крові без виділення суспензії білих кров'яних тілець, окрім цього, паралельно визначити НКА та продукцію IFN- $\gamma$ .

### **Напрямки дискусії:**

1. Значення некласичних HLA-антигенів у репродукції людини
2. Три кроки на шляху до підбору пари «донор-реципієнт», важливість визначення індексу гістосумісності.
3. Лабораторне тестування функцій НК-клітин: сучасні методи
4. Методи визначення функцій Т-регуляторних лімфоцитів

### **Використана література:**

1. Sipak-Szmiegiel O., Ronin-Walknowska E., Cybulski C. et al. Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. *Folia histochemia et cytobiologica*. 2007; 45: 137-141.
2. Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: P.388-400.



3. Liu Y., Luo L., Zhao H. Immunochemical study of HLA- DR antigen in endometrial tissue of patients with endometriosis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2002; 22:60-61.
4. Debattista J., Timms P., Allan John, Allan Janet Immunopathogenesis of Chlamydia trachomatis infections in women/ Fertility and sterility 2003; 79:1273-1287.
5. Ness R.B., Brunham R.C., Shen C., Bass D.C. Association among human leukocyte antigen HLA class II DQ variants, bacterial sexually transmitted diseases, endometritis, and fertility among women with clinical pelvic inflammatory disease. Sex Transm Dis 2004; 31:301-304.
6. Sierra S., Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006; 24:17-24.
7. Fuzzi B., Rizzo R., Criscuolli L., Melchiorri L. et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. 2002;32:311-315.
8. Market M., Tennakoon G., Ng J., Scaffidi M., Tanese de Souza Ch., Kennedy M.A., Auer R.C. A Method of Assessment of Human Natural Killer Cell Phenotype and Function in Whole Blood. Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol.11. – P.1-11. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00963
9. Assessment of NK Cell Activity Based on NK Cell-Specific Receptor Synergy in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Whole Blood Jung Min Kim<sup>1,†</sup>, Eunbi Yi<sup>1,†</sup>, Hyungwoo Cho<sup>2,†</sup>, Woo Seon Choi<sup>1</sup>, Dae-Hyun Ko<sup>3</sup>, Dok Hyun Yoon<sup>2</sup>, Sang-Hyun Hwang<sup>3,\*</sup> and Hun Sik Kim<sup>1,4</sup>, International Journal of Molecular Sciences. 2020, 21, 8112; doi:10.3390/ijms21218112

### **Тема семінарського заняття №8. Біотехнології в діагностиці та лікуванні – 2 год. (Г.О.Потьомкіна)**

**Навчальна мета заняття:** подати слухачам сучасні знання щодо ролі біотехнології в медицині, діагностиці та лікуванні різних хвороб.

**Професійно-орієнтована мета заняття:** навчити слухачів правильно оцінювати покази для застосування біотехнологічних методів з метою діагностики та лікування.

**Теми навчальних питань:**

1. Визначення поняття біотехнології, історія її розвитку.
2. Сучасні конвергентні біотехнології, що застосовуються у медицині.
3. Головні напрямки використання нанобіоматеріалів у медицині.
4. Рекombінантні ДНК (рДНК), біочіпи, застосування стовбурових клітин.
5. Найбільш значущі досягнення нано- і біотехнологій в діагностиці та терапії хвороб в Україні.
6. Генна та клітинна терапія.

### **Короткий зміст заняття**

**Біотехнологія** (*Βιοτεχνολογία*, від грецьких слів *bios* — життя, *techne* — мистецтво, майстерність і *logos* — слово, навчання) — використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві. Біотехнологія — міждисциплінарна галузь, що виникла на стику біологічних, хімічних і технічних наук. З розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства — ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості довкілля.

Завдяки роботам Луї Пастера у середині XIX століття традиційна біотехнологія одержала наукову основу. У 40-50-ті роки XX століття, коли був здійснений біосинтез пеніцилінів методами ферментації, почалась ера антибіотиків, що дала поштовх розвитку мікробіологічного синтезу і створенню мікробіологічної промисловості. У 60-70-ті роки XX століття почала бурхливо розвиватись клітинна інженерія. Зі створенням 1972 групою П. Берга у США першої гібридної молекули ДНК *in vitro* формально пов'язано народження генетичної інженерії, що відкрила шлях до свідомої зміни генетичної структури організмів таким чином, щоб ці організми могли продукувати необхідні людині продукти і здійснювати необхідні процеси. Ці два напрямки визначили образ нової біотехнології, що немає багато спільного з тією примітивною біотехнологією, яку людина використовувала протягом тисячоріч. Показово, що в 1970-ті роки біотехнологія нерозривно пов'язана з молекулярною і клітинною біологією, молекулярною генетикою, біохімією і біоорганічною хімією. За стислий період свого розвитку (25-30 років) сучасна біотехнологія не тільки досягла істотних успіхів, але і показала необмежені можливості використання організмів і біологічних процесів у різноманітних галузях виробництва і народного господарства.

**Біотехнологія** — це сукупність фундаментальних і прикладних наук, технічних засобів, спрямованих на одержання і використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їхньої життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків та інше. Біотехнологія, яка охоплює промислову мікробіологію, ґрунтується на використанні знань і методів біохімії, мікробіології, генетики і хімічної технології, що дає змогу отримувати користь у технологічних процесах із властивостей мікроорганізмів та клітинних культур.

Експертами організації з економічного співробітництва і розвитку (ОЕСР) запропоновали список сучасних конвергентних біотехнологій, що застосовуються у медицині, фармацевтичній і біотехнологічній промисловості, біоенергетиці і сільському господарстві та ін.:

- ✓ ДНК/РНК: геноміка; фармакогеноміка; генні датчики або генні детектори; DNA/RNA-секвенування/синтез і ампліфікація (визначення первинної структури макромолекул; посилення процесу копіювання ДНК/РНК, генетично виражене профілювання та ін.);
- ✓ протеїни та інші молекули: секвенування/синтез і конструювання протеїнів і пептидів, включаючи великі гормональні молекули; покращена система доставки лікарських препаратів у конкретні точки організму на основі

- великих молекул; протеоміка; ізолювання і очищення протеїнів, сигналізація та ідентифікація клітинних рецепторів;
- ✓ клітинні і тканинні культури та їх конструювання: ферментація, що використовує біореактори; біопроекти; біовилучення; пом'якшення деревини за допомогою дереворуйнуючих грибків; біодесульфатизація; біологічне очищення заражених органічними відходами ґрунтів за допомогою грибків; біофільтрація та ін.);
  - ✓ гени і РНК-вектори: генна терапія, вірусні вектори;
  - ✓ біоінформатика: конструювання баз даних геномів; протеїнового секвенування; моделювання складних біологічних процесів, включаючи системну біологію;
  - ✓ нанобіотехнології: інструменти і процеси, що використовують нано- і мікротехнології з метою створення обладнання для вивчення біосистем і використання в системах доставки лікарських препаратів в організм, діагностиці тощо.

Сьогодні відбувається революція в медицині з точки зору уявлень про етіологію, патогенез і лікування хвороб людини, що пов'язано з досягненнями в галузі молекулярної біології і генетики, молекулярної медицини і фармакології. До основних *тенденцій практичної реалізації фундаментальних розробок* у цих галузях належать:

- ✓ розвиток персоналізованої медицини, пов'язаної з розвитком унікальних високотехнологічних видів діагностики і лікування. Саме вона стає основою профілактики і лікування найбільш поширених інфекційних і хронічних неінфекційних захворювань людини, в тому числі серцево-судинних, онкологічних, нейродегенеративних захворювань, захворювань обміну речовин. Перевага генної діагностики полягає в тому, що вона дає змогу виявити схильність до розвитку того чи іншого захворювання задовго до його клінічних проявів, а також сформулювати план профілактичних заходів, що запобігають його розвитку і полегшують його перебіг, з урахуванням індивідуальних властивостей організму пацієнта;
- ✓ віддзеркаленням функціонування геному кожного конкретного пацієнта є постгеномні події, пов'язані з синтезом численних білків, дослідженню якого сьогодні приділяється особлива увага в рамках протеоміки;
- ✓ створення оригінальних фармакологічних засобів на основі новітніх наукових досліджень в галузі молекулярної біології і медицини, дія яких враховує індивідуальну чутливість до ліків і яку вивчає фармакогеноміка. Багато фармакогенетичних феноменів, які спостерігаються під час застосування лікарських препаратів, відбиваються в фармакокінетичних процесах;
- ✓ розробка і створення інноваційних лікарських препаратів передбачає розвиток фармацевтичних досліджень на основі нових біоаналітичних технологій, які дозволяють суттєво підвищити ефективність доставки лікарської речовини до місця її дії, збільшити безпечність застосування ліків пацієнтами;
- ✓ створення нових лікарських форм із застосуванням нанотехнологій;

- ✓ побудова алгоритмів і методів аналізу, створення баз даних, що дозволяють з'ясувати механізм функціонування біологічних текстів, розробляти цілеспрямовані фармакологічні впливи, чим і займається біоінформатика.

*Біотехнологія допомагає боротись з хворобами.* Розвиваючи та покращуючи медицину, вона дає нові інструменти у боротьбі з ними. Біотехнологія дала медичні методи лікування кардіологічних хвороб, склерозу, гемофілії, гепатиту, та СНІДу. Нині створюються біотехнологічні продукти харчування, які зроблять дешевшими та доступнішими для найбільшої частини населення планети, життєво-необхідні вітаміни та вакцини. Біотехнологія може принести значні переваги у сферу охорони здоров'я. Генетична інженерія також пропонує інші переваги для здоров'я, адже сьогодні створено методи, які дозволяють видаляти певні алергенні протеїни з продуктів харчування або уникати їхнього передчасного псування. У медицині біотехнологічні способи і методи відіграють головну роль для створення нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, призначених для ранньої діагностики і лікування різноманітних захворювань. Антибіотики — найбільший клас фармацевтичних сполук, які одержуються мікробіологічним синтезом. Створено генно-інженерні штами кишкової палички, дріжджів, що культивуються клітин ссавців та комах, використовувани для одержання гормону росту, інсуліну й інтерферону людини, різноманітних ферментів і противірусних вакцин. Змінюючи нуклеотидну послідовність у генах, що кодують відповідні білки, оптимізують структуру ферментів, гормонів і антигенів (так звана білкова інженерія). Найважливішим відкриттям стала розроблена 1975 Р. Келером і С. Мільштейном техніка використання гібридом для одержання моноклональних антитіл бажаної специфічності. Моноклональні антитіла використовують як унікальні реагенти, для діагностики і лікування різноманітних захворювань, в першу чергу аутоімунних хвороб та злоякісних пухлин.

До *головних напрямів використання нанобіоматеріалів у медицині* слід зарахувати: медичний інструмент, терапію та діагностику захворювань, імплантацію, тканинну інженерію, мікроелектроніку (нанокомпоненти мікроелектронно-механічних систем, МЕМС); адсорбцію токсинів і виведення їх з організму; біоінструментарій, діагностику (наносенсори, детекція наночастинок у біоб'єктах).

1. **Рекомбінантні ДНК (рДНК).** Найбільших успіхів медична біотехнологія досягла в галузі рекомбінантних ДНК (рДНК), технологія яких дозволяє вбудовувати гени, що кодують людські білки, в геном клітин, дріжджів і ссавців. Як наслідок, з'являється можливість індукувати клітини-реципієнти виробляти необхідний білок.

2. **Біочипи.** Сьогодні в промисловості напівпровідників відбувається поступовий перехід від виробництва чипів на основі кремнію до виробництва біологічних чипів.

3. **Біологічні запчастини, цивільні і військові екзоскелетони, біогеронтологія.** Науково-дослідні роботи в галузі створення «біологічних запчастин» для «ремонту» людського організму мають за мету як заміну різних

органів і частин тіла людини, так і посилення його фізичних можливостей і функцій. Серед підходів, що одержали практичну реалізацію, є наступні.

*а) інжиніринг* тканин людини і регенеративна медицина пов'язані перш за все зі створенням органічних і штучних тканин, органів і матеріалів для заміни втрачених, лікування хворих або покращення існуючих органів людського тіла, а також із розробкою нанопокриттів для імплантатів і хірургічних інструментів. Експерти Rand Corp. вважають, що «тканинний інжиніринг» — це нова галузь медицини. Вже сьогодні такі технології, як вирощування шкіри, використовуються для лікування поранень і опіків; вирощування хрящових тканин — для «ремонтів» і заміни уражених хрящових з'єднань у людини знаходяться в США в стадії клінічних досліджень; стає реальністю вирощування функціональних тканин для серцевих м'язів. Вказані напрямки медицини будуть залежати від створення біосумісних клітинних каркасів, розробки відповідних трансплантатів, багатоклітинних тканин і нових багатофункціональних матеріалів з використанням біотехнологій вирощування штучних тканин і органів для людини. Наприклад, така кераміка, як біоактивне кальцієво-фосфатно-кремнієве скло, гідроксіапатити і кальцієві фосфати можуть слугувати як хімічні матеріали для вирощування кісток та їх регенерації. Біоактивні полімери (наприклад, поліпептиди (штучні білки) можуть застосовуватись як хірургічні сітки і тампони або як гідрогелі, що стимулюють зростання тканин. Штучні замінники крові можуть змінити принципи і умови її зберігання, збільшити ступінь безпеки від випадкового попадання інфекції через кров тощо. Наприклад, стане поширеною практикою виробництво для конкретних пацієнтів керамічних штучних кісток з метою заміни зламаних або пошкоджених кісток рук, ніг і черепа, із використанням для цього комп'ютерної томографії і можливість швидкого виготовлення прототипів (на нанопринтерах); нейропротезування і протезування органів почуттів: імплантати для заміни сітківки очей і усунення кохлеарних ушкоджень, байпаси для спинного мозку та інших нервових закінчень, штучні комунікаційні і стимулюючі апарати, що зменшують сліпоту і глухоту людини.

*б) біогеронтологія* — займається вивченням «клітинної і молекулярної основи захворювань і процесу старіння організму» і може бути застосована для ідентифікації і лікування захворювань, компенсації втрати можливостей, пов'язаних зі старінням. Підтримуючі технології включають вдосконалення біосенсорів, що в реальному часі здійснюють моніторинг здоров'я людини, одержання інформації про самопочуття, різні впливи на структуру ДНК, специфічні ДНК-ліки, різні механізми, що забезпечують повністю цільову дію ліків». Всесвітньо відомі дослідження, пов'язані з теломерами (кінцевими ділянками хромосом), які при поділі клітини запобігають пошкодженню геному і впливають на механізм старіння. Американські вчені за визначення структури теломер і виділення цього білка, що відновлює їх структуру (даруючи клітині безсмертя), одержали Нобелівську премію в галузі медицини у 2009 р. Ці відкриття дозволять подовжувати життя людини і скоротити терміни втрати її працездатності. Завдяки відкриттю теломерази з'явилася змога регенерації тканин і доведення їх до більш здорового стану.

**4. Стовбурові клітини та їх використання.** Використання стовбурових клітин для «біоремонту» людини засновано на їх унікальній властивості — можливості необмеженого самооновлення і відродження інших клітин різних типів. Якщо звичайні клітини діляться не більше 50–80 разів, після чого в них запускається процес апоптозу, то стовбурові клітини можуть ділитись 600 і більше разів. Основа «безсмертя» стовбурових клітин — спроможність виробляти білок теломеразу, що відновлює кінці хромосом. Альтернативою використання ембріональних стовбурових клітин стають стовбурові клітини, виділені з тканин дорослої людини, які також можуть застосовуватися для вирощування тканин і навіть органів. Крім того, активно розвивається ксенотрансплантологія — пересадка організму чужорідної тканини, що може певною мірою зняти морально-етичні проблеми використання стовбурових клітин. Наприклад, бабуїни або свині могли б генетично модифікуватися або клонуватися, щоб виробляти відповідні трансплантати для людини. Повинні бути врегульовані морально-етичне питання і проблема патентування подібних трансплантацій.

**5. Самозбирання і виробництво на основі ДНК, конвергентні «розумні» матеріали.** Самозбирання з використанням молекул ДНК може реалізовуватися на основі біометричних виробничих систем, що значною мірою копіюють природні схеми і застосовуються на основі «функціоналізації невеликих неорганічних блоків з молекулами ДНК, застосуванням процесів молекулярного розпізнавання ДНК з подальшою зборкою цих блоків у більш подовжені структури». Самозбирання з використанням ДНК у перспективі призведе до створення біосенсорів або нанолітографічної техніки для формування відповідних біомолекул. Крім того, відбудеться революція в галузі створення «розумних» матеріалів, обладнання і промислового виробництва. Нові матеріали, створені на основі конвергенції NBIC-технологій, будуть використовуватись для виробництва кінцевої продукції, компонентів і систем, які значно менші, «розумніші», більш функціональні та екологічно чисті, ніж усі існуючі природні і штучні матеріали. Наприклад, «розумні» наноматеріали будуть матеріали, що поєднують сенсори з привідними пристроями і комп'ютерами; або це можуть бути також мікро- або нанороботи, створені на основі біоміметики комах або птахів, які будуть використовуватись для визначення шкідливих матеріалів у навколишньому середовищі, аерокосмічних дослідженнях, у безпілотних літальних апаратах тощо.

Отже, в медицині і охороні здоров'я біотехнології застосовуються в терапії, діагностиці, фармакогенетиці (розділ генетики, предметом якого є генетично детерміновані реакції організму на лікарські засоби), функціональних продуктах харчування і нутрицевтиках (продуктах харчування з фармакологічними властивостями), а також медичному обладнанні. Деякі біотехнології, наприклад, такі, як біофармацевтика та *in vitro*-діагностика, вже комерціалізовані і мають вихід на світовий ринок. Так, у США на сьогодні було здійснено в середньому 56 % тестувань, розроблених в світі біо-NME. У той же час Данія має найвищий рівень біотерапії на душу населення, друге місце посідає Швейцарія, а США за цим показником займає третє місце. Основне використання

нанотехнологій в охороні здоров'я буде пов'язано з виробництвом нанорозмірного обладнання і приладів, які зможуть взаємодіяти з біомолекулами як на поверхні клітин, так і в середині них.

**Науковці України** також вносять свій вклад в розвиток біотехнології в медицині. Відомо, що основою для створення сучасних протипухлинних вакцин та специфічних протипухлинних антитіл є пухлино-асоційовані антигени (ПАА). Застосування технології SEREX (серологічної ідентифікації пухлино-асоційованих антигенів) дозволило ідентифікувати понад 60 пухлино-асоційованих антигенів меланоми, раку кишечника, щитоподібної та молочної залози. Зазначені антигени в майбутньому можуть бути використаними для створення протипухлинних антитіл людини з наступним застосуванням у клінічній практиці для лікування онкологічних захворювань. Наразі вже отримано цілу низку моноклональних антитіл проти ПАА та сигнальних молекул, що зазнають суттєвих змін у процесі злоякісної трансформації клітини. Зміни рівня позаклітинних ДНК, що циркулюють у крові, пов'язують із наявністю та розвитком пухлин. Крім того, позаклітинні ДНК містять генетичні та епігенетичні зміни, властиві пухлинним ДНК, тому їх вивчення дозволяє встановити пухлино-специфічні сигнатури, включаючи метилювання генів. Проводяться дослідження експресії та функції можливого прогностичного маркера раку молочної залози – інтерсектину 2 (ITSN2). Створений набір онкомаркерів для діагностики різних епітеліальних пухлин. У відділі молекулярної онкогенетики створено мікроматричний модуль для розробки та застосування ДНК-мікрочипів. Основними перевагами технології є одночасне виявлення генетичних (делеції чи ампліфікації) та епігенетичних (метилювання чи деметилювання) змін. Досліджується можливість використання позаклітинних ДНК плазми крові в якості важливого джерела інформації для виявлення статусу метилювання наборів генів-онкосупресорів, пухлино-специфічних мутацій та рівнів концентрації позаклітинних ДНК з метою ранньої діагностики онкологічних захворювань. Результати генетичного тестування є необхідною передумовою профілактики та чітко визначеного лікування з метою поліпшення демографічної ситуації в Україні.

Розроблені методи ДНК-аналізу для клінічної діагностики пацієнтів з муковісцидозом, фенілкетонурією синдромом Мартіна-Белла, спадковим гемохроматозом та пов'язаними з ним вторинними патологіями.

Створено та протестовано *in vitro* новий біотехнологічний продукт – цитокін сендомап, що може бути широко використовуватися як медіатор прокоагулянтної та антиангіогенної дії, індуктор апоптозу та, у перспективі, як можливий протипухлинний препарат у клінічній онкології. Серед усіх родин білків людини протеїнкінази мають чи не найбільше значення для медико-біологічних досліджень. Протеїнкінази складають щонайменше 2% людського геному і забезпечують реалізацію одного з найбільш фундаментальних механізмів внутрішньоклітинного сигналізу – фосфорилування. Порушення активності кіназ є значним фактором у розвитку багатьох захворювань, особливо при запальному процесі та змінах проліферації. Таким чином, протеїнкінази є привабливими об'єктами для розробки лікарських препаратів. Проводиться

розробка інгібіторів протеїнкіназ на основі поєднання технологій комп'ютерного моделювання, цільового органічного синтезу та біохімічного скринінгу *in vitro*.

Створено препарати з протівірусною, протипухлинною та імунорегулюючою дією – амітозин та ізатизон. Амітозин має протипухлинну дію та антиметастатичну активність, але, на відміну від існуючих препаратів, не пригнічує процеси кровотворення, не викликає алергічних реакцій, має низьку токсичність.

*Генна та клітинна терапія.* Проводиться вивчення фундаментальних засад оновлення похилого та хворого організму, розробка і використання генних та клітинних технологій, спрямованих на заміщення ушкоджених клітин та матеріалу спадковості, а також біотехнологічне отримання терапевтичних рекомбінантних білків. Розроблені технології отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з пуповини людини для подальшого клінічного використання; проведена морфологічна класифікація МСК за поверхневими та внутрішніми маркерами, а також здатністю до диференціації у перших шести пасажах; показано, що практично всі характеристики змінюються після третього пасажу клітинної культури, що підтверджує, що лише 1–2 пасажі відповідають вимогам клінічного використання. Розроблено наукові підходи до технології генної терапії багатофакторних захворювань, заснованої на введенні в організм рекомбінантного генетичного матеріалу з метою корекції патології. Створено ефективні безвірусні системи доставки цільових генів з терапевтичною метою в клітини та органи. Наразі найперспективнішим способом доставки різних клітин в організмі, що слугують джерелом терапевтичних агентів (гормонів, факторів росту, цитокінів), є інкапсуляція таких клітин напівпроникними мікрокапсулами або іншими засобами. У рамках дослідницької роботи відділу було розроблено технології доставки генетично створених клітин, що виробляють певні цитокіни (LIF, FGF-2, IL-10).

Значних успіхів досягнуто у напрямку генно-інженерної біотехнології. Науковцями відділу було розроблено унікальний спосіб отримання рекомбінантних білків у клітинах *E. coli*, який не має аналогів у світі, з використанням фагу лямбда, що забезпечує накопичення цільового продукту у високій концентрації в активній розчинній формі безпосередньо у поживному середовищі. Показана його ефективність для отримання білків як про-, так і еукаріотичного походження. На основі даного способу розроблено промислові технології отримання таких продуктів як бета-галактозидаза, інтерферон людини альфа-2а, інтерферон людини альфа-2b, гормон росту людини та ін. Препарат рекомбінантного інтерферону людини альфа-2а під торговою маркою "Лаферон" вже більше 10 років виробляється на Україні та успішно використовується у медичній практиці.

### **Контрольні питання:**

1. Тенденції практичної реалізації фундаментальних біотехнологічних розробок.
2. Сфери застосування рекомбінантних ДНК, біочіпів, стовбурових клітин,
3. Генна та клітинна терапія.



4. Біогеронтологія.
5. Самозбирання і виробництво на основі ДНК, конвергентні «розумні» матеріали.
6. Нові методи діагностики окопатології, вроджених імунодефіцитів, орфанних хвороб тощо в Україні.

#### **Використана література:**

1. Сучасні напрямки в хімії, біології, фармації та біотехнології = Modern directions in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology: [монографія] / ред.: В. Новіков; Нац. ун-т «Львів. політехніка». — Львів: Вид-во Львів. політехніки, 2015. — 255 с.
2. Кутько І.І., Матюшенко І.Ю. Перспективи розвитку біомедицини на основі NBIC-технологій в країнах світу і Україні// газета "Новини медицини та фармації" 2016, 3 (566), С.16-19
3. O. V. Pereginya, T. M. Lutsenko Translation medicine, biomedicine and medical biotechnology: the transition to personalized medicine //Biotechnologia ACTA, 2020,V. 13, No 2:5-11.

#### **Тема семінарського заняття №9. Безпека введення імунобіологічних препаратів – 2 год. (Г.О.Потьомкіна)**

**Навчальна мета заняття:** подати аспірантам сучасні знання про імунобіологічні препарати, їх класифікацію, покази до застосування, побічні дії.

**Професійно-орієнтована мета заняття:** навчити аспірантів правильно оцінювати клініко-анамнестичні дані пацієнта при застосуванні імунобіологічних препаратів для попередження формування побічних ефектів.

#### **Теми реферативних повідомлень:**

1. Імунопрофілактика та імунотерапія.
2. Розподіл терапевтичних моноклональних антитіл за будовою та механізмом дії.
3. Біосиміляри: визначення поняття, переваги та недоліки.
4. Гіпергострі/гострі реакції та реакції сповільненого типу при застосуванні імунобіологічних препаратів.
5. Причини та імунопатогенетичні механізми формування імуногенності.
6. Вплив імуногенності на фармакокінетичні властивості терапевтичних моноклональних антитіл та безпеку пацієнта.

#### **Короткий зміст теми заняття.**

**Імунобіологічні препарати** (медичні імунобіологічні препарати, МІБП, англ. biological drugs) — це лікарські препарати, діючі речовини яких мають

біологічне походження (або є штучно синтезованими аналогами природних речовин) і призначені для проведення специфічної профілактики (імунопрофілактики), діагностики та лікування (імунотерапії) інфекційних або алергічних захворювань. До МІБП належать: вакцини, анатоксини, імуноглобуліни, сироватки, інтерферони, бактерійні препарати, алергени, бактеріофаги та інші. Препарати можуть отримувати шляхом: культивування штамів мікроорганізмів і клітин еукаріотів, екстракції речовин з біологічних тканин і крові, включаючи тканини та кров людини, тварин і рослин, застосування технології рекомбінантної ДНК, гібридної технології, репродукції живих агентів в ембріонах чи організмі тварин. До цієї категорії не відносять біогенні лікарські препарати, діючі речовини яких не несуть у собі генетично чужорідної інформації, тобто мають молекулярну масу менше 5000 дальтон (наприклад, Актовегін). Обіг, контроль за якістю і безпекою медичних імунобіологічних препаратів практично в усіх країнах знаходиться під особливим контролем держави та здійснюється окремо від інших фармацевтичних препаратів. Це пов'язано з особливостями їх виробництва, проведенням доклінічних і клінічних випробувань, оскільки процес дослідження МІБП відбувається за участі не лише хворих, а і здорових людей, у тому числі дітей (наприклад, випробування вакцини). В Україні функцію державного органу контролю несе ДП «Центр Імунобіологічних препаратів».

Використання МІБП у специфічній профілактиці захворювань називається *імунопрофілактикою*, у лікуванні хвороб — *імунотерапією*. У діагностиці інфекційних захворювань та алергій безпосередньо на пацієнтах використовують препарати з мікроорганізмів (наприклад, туберкулін), алергенів. Для специфічного (етіотропного) лікування інфекцій використовують широкий спектр МІБП — сироватки, імуноглобуліни, бактеріофаги. Інтерферони підвищують загальну опірність до вірусних захворювань. У лікуванні алергій як патогенетичну терапію застосовують препарати алергенів, які вводять за спеціальною схемою (так звана алергенспецифічна імунотерапія).

Лікарські препарати – *моноклональні антитіла* (МкАТ) на сьогоднішній день за об'ємом виробництва займають на світовому фармацевтичному ринку друге місце після вакцин. Моноклональні антитіла отримують за допомогою гібридомних біотехнологій. Клінічна ефективність препаратів МкАТ зумовлена високою вибірковістю і специфічністю дії. Вони мінімальним чином зачіпають процеси нормального функціонування імунної системи, мають здатність пригнічувати системні реакції запалення і здатні активізувати імунну систему на боротьбу з пухлинними клітинами. Велика частина препаратів МкАТ використовується в онкології, інші - для лікування аутоімунних, інфекційних, алергічних захворювань, а також в трансплантології для профілактики і лікування реакції відторгнення після трансплантації. Від загального об'єму ринку всіх препаратів МкАТ, що продаються, 50% складають протипухлинні препарати МкАТ, 37% - препарати, що використовуються для лікування аутоімунних захворювань, 11% - для лікування хронічних захворювань органів дихання; 2% - для лікування хронічних серцево-судинних захворювань. За походженням розрізняють мишачі моноклональні антитіла, химерні,

гуманізовані і повністю гуманізовані. За будовою МкАТ поділяються: 1) прості (некон'юговані), які безпосередньо беруть участь в реалізації терапевтичної дії препарату; 2) кон'юговані МкАТ, лікувальний ефект яких зумовлений приєднаними до антитіла речовинами (радіоактивні частки, цитостатики або токсини).

**Біосиміляри** – подібний біотерапевтичний препарат, який подібний за якістю, безпечністю і ефективністю вже ліцензованому рефертному біотерапевтичному препарату. Іншими словами біосиміляри (біотехнологічні лікарські засоби, генно-інженерні біологічні препарати) – це аналоги зареєстрованих оригінальних біопрепаратів з фізико-хімічною подібністю молекули діючої речовини, яка, однак, не ідентична за розміром, за структурою, має інший характер виробничого процесу, що не дає можливості відтворити точну копію оригінального біопрепарату. Біосиміляри характеризуються великими розмірами і більш складною структурою. Невід'ємною перевагою біосимілярів можна вважати ціну. Біосиміляри дешевші та оригінальні біологічні препарати на 15-20%. Найбільшим недоліком біоаналогів є розвиток небажаних явищ з боку імунної системи. Ця проблема не є специфічною виключно для біосимілярів і стосується всіх біологічних препаратів. Частково її можна вирішити правильним веденням пацієнтів, які отримують терапію біосимілярами. Рекомендується уникати необґрунтованого призначення МІБП, не переривати курс лікування, вводити препарат з премедикацією, при необхідності додавати метотрексат в якості терапії супроводу; в деяких випадках можна підвищувати дозу (для зниження вироблення антитіл). Необхідно пам'ятати, що для реєстрації біосиміляру необхідно визначення імуногенності.

Як і оригінальні біологічні препарати, біосиміляри мають однакову нуклеотидну послідовність і виробляються в результаті одного й того ж біотехнологічного процесу. А от штами продукуючих клітин, поживні середовища, технологічні цикли виробництва і способи очищення кінцевих продуктів можуть бути відмінними (але не обов'язково повинні відрізнятися). Як правило, більшість небажаних реакцій (побічних ефектів), що розвиваються при застосуванні МкАТ, зумовлена їх фармакологічними ефектами. Проте, в зв'язку з тим, що вказані препарати мають білкову природу, вони також характеризуються здатністю індукувати небажану імунну відповідь, що часто супроводжується клінічними наслідками: розвитком побічних реакцій, зниженням або втратою ефективності терапевтичної дії лікарського препарату.

Частота і ступінь ризику проявів небажаної імуногенності варіюють залежно від окремих препаратів або їх групи, з одного боку, а також залежно від патології, окремих груп пацієнтів або їх індивідуальних особливостей. Результатом прояву імуногенності є розвиток таких побічних ефектів, як інфузійні реакції, анафілаксія, зниження клінічної ефективності лікарського препарату та інші. Побічні ефекти при застосуванні лікарських препаратів МкАТ, що проявляються у вигляді інфузійних реакцій, найчастіше спостерігаються при застосуванні химерних МкАТ, рідше - гуманізованих і з найменшою частотою спостерігаються при застосуванні МкАТ на основі тільки імуноглобуліну людини. Це обумовлено тим, що причиною розвитку інфузійних

реакцій є розвиток імунної відповіді на чужорідні амінокислотні послідовності в структурі білкової молекули лікарських препаратів МкАТ.

До основних імунопатогентичних механізмів формування імуногенності належать наступні: 1) генералізована імунна реакція — у вигляді реакцій гіперчутливості будь-якого ступеня тяжкості та локалізації (місцеві чи генералізовані висипання, кропив'янка, ангіоневротичний набряк, анафілактичний шок); 2) нейтралізація екзогенного протеїну — у вигляді відсутності або зниження терапевтичної ефективності препарату; 3) нейтралізація ендогенного (власного) протеїну — у вигляді пригнічення чи припинення функції певних органів або систем.

При розпізнаванні імунною системою антигенних детермінант терапевтичних МкАТ як чужорідного антигену формується імунна відповідь на лікарський препарат при його клінічному застосуванні. Як правило, імунна відповідь комплексна, включає формування антимедикаментозних антитіл (АДА), які є специфічними до АГ компонентів біотехнологічного препарату, Т-клітин-ефекторів, а також сприяють активації системи природженого імунітету. Наслідком розвитку імунної відповіді на терапевтичні МкАТ може бути або короткочасне формування транзиторних АТ, які не проявляються клінічно значимими симптомами, або розвиток комплексної стійкої імунної відповіді, яка стає причиною прояву тяжких, загрозливих для життя станів. Клінічно значущі наслідки розвитку такої небажаної імунної відповіді можуть проявлятися в зниженні ефективності терапевтичного білка, розвитку тяжких гострих імунних реакцій (алергічних IgE- або IgG-опосередкованих), а також перехресної реактивності з ендогенними білками. На прояв імуногенності терапевтичних МкАТ, тобто на частоту формування і ступінь вираженості імунної відповіді впливає велика кількість чинників, включаючи ті, які залежать від стану і особливостей пацієнта, опосередковані основним захворюванням або визначаються характеристиками біотехнологічного препарату.

Імунні несприятливі наслідки можуть бути як гострими, так і сповільненими. Менш виражені імунні несприятливі ефекти включають реакції на місці ін'єкції та реакції на інфузію. Неалергічні (не пов'язані з продукцією IgE) реакції на інфузію зазвичай спостерігаються під час перших інфузій. Зменшити їх вираженість можна шляхом застосування премедикації.

*Гіпергострі/гострі реакції.* Гострі реакції, пов'язані з інфузією МкАТ та білків злиття, включаючи анафілактичні (тип I) та анафілактоїдні реакції, що можуть розвиватися протягом кількох секунд або протягом декількох годин після інфузії. Усі гострі реакції на інфузію потенційно пов'язані з імунною відповіддю. Деякі з цих реакцій відносяться до алергічних і опосередковані імуноглобуліном E (IgE); інші (анафілактоїдні) відносяться до неалергічних (гістамінозалежних, комплементзалежних чи через порушення метаболізму арахідонової кислоти) з аналогічними клінічними проявами. Гострі реакції можуть викликати сильну гіпотонію, бронхоспазм, набряк гортані або глотки, хрипи та/або кропив'янку. Обтяжений імуно- чи алергоанамнез можуть збільшувати безпеку терапевтичного білка з високим ризиком формування гострих реакцій гіперчутливості.

*Реакції сповільненого типу.* Крім гострих реакцій слід враховувати гіперчутливість сповільненого типу (опосередковані Т-клітинами) та реакції, опосередковані імунним комплексом. Сповільнені імунологічні реакції можуть розвиватися і проявлятися через місяць, а імунокомплексні реакції – в кінці першого-друго тижня після введення МкАТ пацієнту. Клінічні ознаки можуть включати міалгію, артралгію з лихоманкою, шкірні висипання та свербіж. Можливе формування гострих артритів, гострих гломерулонефритів, системних васкулітів. Ризик таких реакцій може посилюватися через збільшення інтервалу між введенням МІБП, у результаті застосування різних біологічних препаратів одного класу тощо. Сповільнені реакції гіперчутливості необхідно чітко відрізняти від реакцій, пов'язаних з інфузією. Заявники повинні забезпечити систематичний збір даних про негострі клінічні наслідки після застосування МІБП.

*Автоімунітет:* перехресна реактивність на ендogenousний аналог. Ймовірним небезпечним для життя пацієнтів клінічним наслідком утворення антимедикаментозних антитіл є перехресна реактивність з ендogenousним білком, що відіграє важливу роль у ключових фізіологічних функціях організму. Наприклад, перехресні реакції ADA проти нових конструкцій (наприклад, злиті білки, що містять фізіологічні функціональні молекули), слід досліджувати на предмет перехресної реакції з відповідними ендogenousними білками.

### ***Напрямки дискусії:***

1. Імунобіологічні препарати: визначення поняття, класифікація.
2. Класифікація моноклональних антитіл
3. Переваги та недоліки біосимілярів.
4. Класифікація побічних ефектів при застосуванні імунобіологічних препаратів.
5. Шляхи подолання імуногенності.

### **Використана література:**

1. Матвеева О.В., Бліхар В.Є., Яйченя В.П. Біосиміляри. Питання безпеки їх застосування. УКР. МЕД. ЧАСОПИС – 2012. – Т.87. №1/2. - С. 26 – 30.
2. Талаєва Т.В., Дорошук Л.В., Кудрявцева І.Г. Біотехнологічні лікарські препарати та біосиміляри: що необхідно знати клініцистам при призначенні біосимілярів УКРАЇНСЬКИЙ РЕВМАТОЛОГІЧНИЙ ЖУРНАЛ. – 2015. – Том 59, №1. - С. 3-7.
3. Wadhwa M., Knezevic I., Kang H.-N., Thorp R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. Biologicals. – 2015. – Vol. 43. – P. 298-306.
4. Al-Hulu S.M. Immunogenicity of biosimilars. J Bioanal Biomed. – 2016. – Vol.8, №3(Suppl). - p. 66.

## Тема семінарського заняття №10. Перспективи вакцин в лікуванні онкологічних та аутоімунних хвороб – 2 год. (А.М.Гаврилюк)

**Навчальна мета заняття:** подати аспірантам сучасні знання про види вакцин для лікування онкологічних та аутоімунних хвороб

**Професійно-орієнтована мета заняття:** навчити аспірантів правильно оцінювати клініко-анамнестичні дані пацієнта щодо встановлення показів до лікування активною імунотерапією (вакцинацією) та попередження формування побічних ефектів.

### **Теми реферативних повідомлень:**

1. Види імунотерапії в онкології. Активна та пасивна імунотерапія.
2. Механізм дії терапевтичних вакцин в онкології
3. Дендритноклітинна вакцина, її переваги та недоліки.
4. Вакцини в клініці аутоімунних хвороб – механізм лікувальної дії

### **Короткий зміст теми заняття**

Першим кроком в утворенні пухлини є експресія пухлинних антигенів на клітині, яка ще вчора була нормальною. Перетворення звичайних поверхневих антигенів у пухлинні відбувається під впливом канцерогенних факторів, а також онкогенних вірусів (папіломавірусів, вірусу Епштейн-Барр вірусів гепатитів тощо). У імунологічно здоровому організмі працює ряд імунних факторів, які розпізнають і знищують одиничні пухлинні клітини (рисунок 6).

Терапія протипухлинними вакцинами відноситься до активної імунотерапії пухлин. Протипухлинні вакцини: 1) посилюють презентацію пухлинних антигенів антигенпрезентуючими імунними клітинами; 2) активують ефекторні клітинні механізми природженого і набутого імунітету проти пухлинних антигенів; 3) стимулюють продукцію антитіл проти пухлинних антигенів, які, в свою чергу, запускають антитілозалежні механізми для знищення пухлинних клітин – цитолітичну дію системи комплементу та антитілоопосередковану клітинну цитотоксичність. Також антитіла проти пухлинних антигенів виконують роль опсонінів, полегшуючи процес фагоцитозу пухлинних клітин фагоцитами господаря. Внаслідок їх використання спостерігається зростання концентрації лейкоцитарного та імунного інтерферонів, інтерлейкінів -1, -2, ФНП- $\alpha$ .

Основним принципом імунотерапії пухлин є модифікація імунного статусу. Імунотерапія зазвичай застосовується як доповнення базових методів лікування пухлин (хірургічного, хіміотерапії та радіотерапії), хоча у випадку лікування деяких типів пухлин вона становить терапію першого ряду. Класично імунотерапія пухлин має три форми: активна імунотерапія (лікувальний ефект

досягається, посилюючи імунологічну реактивність пацієнта); пасивна імунотерапія (подача пацієнту препаратів неспецифічно діючих цитокінів (напр., ФНП- $\alpha$ ), або специфічних протипухлинних моноклональних антитіл; та адаптивна, коли протипухлинну дію здійснюють подані внутрівнено або місцево імунокомпетентні клітини, попередньо активовані *in vitro*).

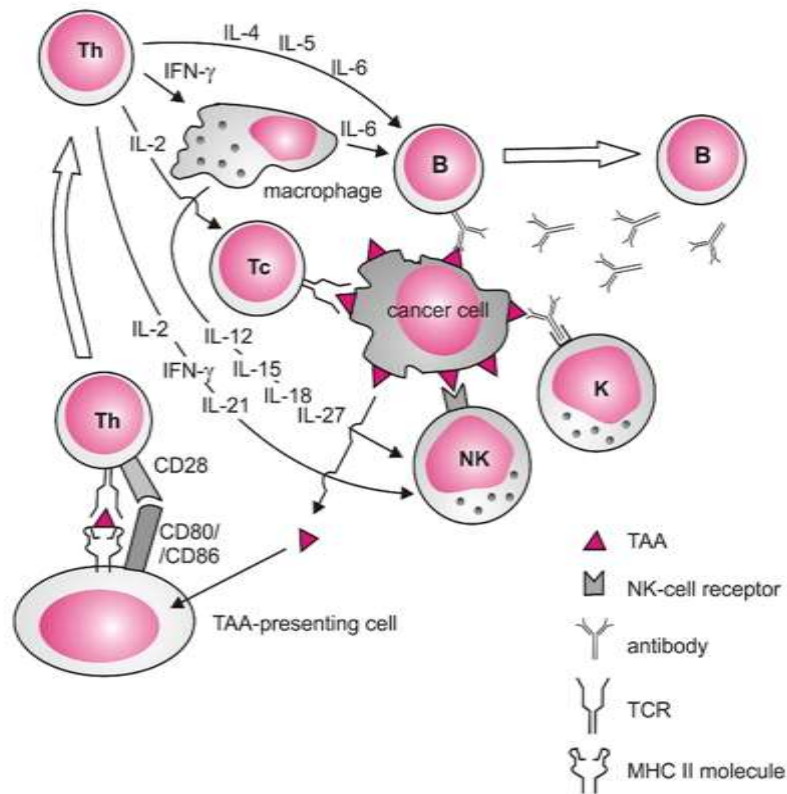


Рисунок 6.

Імунна відповідь на пухлинні антигени за умов норми (Golab J. et al., 2017).

Потрібно підкреслити, що, якщо у випадку інфекційних хвороб застосування вакцин є профілактичною процедурою, та введення протипухлинних вакцин виконується для вилікування вже існуючої хвороби. Але мета вакцинації є подібною – індукція специфічних механізмів імунного захисту. В класичній формі вакцинальної протипухлинної терапії пацієнтам вводять відповідно підготовлені (опромінені або вбиті) аутологічні або алогенні пухлинні клітини або їх екстракти. У змодифікованій активній формі цієї терапії пухлинні клітини або їх антигени подають в поєднанні з ад'ювантами або цитокінами (ІЛ-2, ІД-12, ГМ-КСФ) Найбільш корисним вживання протипухлинних вакцин є у лікуванні імуногенних пухлин, які мають чітко визначені антигени. Таким вимогам відповідає меланома, стосовно якої досить точно визначені антигени, які можуть бути потенційно чіткою мішенню моноклональних антитіл, і у такій же мірі їх

фрагменти (епітопи), які стимулюють імунну відповідь за клітинним типом і індукують формування цитотоксичних Т-лімфоцитів CD8<sup>+</sup>. Робота над вакцинами, в основі яких лежать пухлинні антигени або клітини, тривають багато років. але результати є контраверсійними. Найважливішими причинами неуспіху цього виду імунотерапії є:

1. Пацієнти, яких лікували протипухлинними вакцинами – це дуже часто особи, у яких інші форми терапії не дали результату і пухлинний процес прогресує;
2. Виникаючі у людини пухлини – це найчастіше вузли з низькою імуногенністю;
3. У протилежність до тваринних моделей пухлин, пухлини людини характеризуються часто значною гетерогенністю – навіть в межах однієї пухлини можна знайти клітини з різним фенотипом, різною динамікою росту, та відмінні з точки зору пухлинних антигенів.

Актуально протипухлинні вакцини використовуються обмежено. Це пояснюється довгою тривалістю і вкладенням праці для їх приготування. Зазвичай вони готуються індивідуально, для кожного пацієнта окремо в вибраних клініках світового рівня. Це стосується препаратів:

- Вітеспен (Oncophage) – вакцина, яка містить білки теплового шоку HSP (gp96) з пептидами, ізольовані з пухлинних клітин пацієнтів з раком нирки
- M-Vax – вакцина, яка містить аутологічні клітини меланоми. Які були оброблені динітрофенолом (DNP) для посилення імуногенності препарату
- OncoVax – вакцина, яка застосовується у лікуванні раку обводової кишки, приготована з власних пухлинних клітин пацієнтів, яка вводиться з БЦЖ.

Одним із варіантів протипухлинної вакцинації є введення хворому відповідно підготовлених його дендритних клітин (ДК). Маніпуляції з ДК можуть бути наступними: 1) «злиття» дендритних клітин з пухлинними (утворення гібридом); 2) вводити у дендритні клітини методом генної інженерії гени пухлинних антигенів (наприклад, ген антигену меланоми MART-1) або «годувати» дендритні клітини пухлинними антигенами або лізатами пухлинних клітин.

Дендритна клітина є «професійною» антигенпрезентуючою клітиною, в тому числі і для презентації пухлинних антигенів. До інших функцій дендритних клітин належать: 1) активація НК-клітин, Тх1-, Тх2-клітин, Т-лімфоцитів цитотоксичних; 2) продукція цитокінів ІЛ-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -6, -7, -12, -15, -18, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\alpha/\beta$ , ТРФ- $\beta$ ; 3) експресія костимулюючих молекул: CD40, B7, ICAM, LFA3 та ін.; 4) міграція в лімфоїдну тканину (лімфатичні вузли, селезінка); 5) здатність



захоплювати антигени (клітини, лізати клітин, структурні компоненти клітин - білки, пептиди, РНК, ДНК) та фагоцитувати їх; 6) здатність процесінгувати і представляти (експресувати на своїй поверхні) антигени.

Однією з можливих причин недосконалості імунної відповіді пацієнта на пухлинні антигени є аномальне диференціювання, яке проявляється у морфологічній та функціональній незрілості ДК у таких хворих.

Схема генерації дендритноклітинної вакцини: 1) забір периферичної крові (50-100 мл) або лейкоферезного матеріалу; 2) сепаративне розділення клітин; 3) культивування CD45+14+ - клітин протягом 8 діб в присутності ГМ-КСФ, ІЛ-4, ІФН- $\alpha$  та ФНП- $\alpha$  (ЛПС); 4) на 6-ту добу після початку культивування внесення лізату пухлинних клітин; 5) на 7-му добу культивування внесення ФНП- $\alpha$  (ЛПС). Отримання зрілих ДКCD86+HLA-DR++. Основні характеристики ДК-аутовакцини: життєздатність дендритних клітин складає не менше 95%; домішок лімфоцитів – не більше 20%; рівень одночасної експресії експресии CD86 и HLA-DR-антигенів складає не менше 70%;

Протокол застосування дендритноклітинної аутовакцини у хворого раком легень: 1) неад'ювантна поліхіміотерапія; 2) хірургічне видалення пухлини; 3) ДК-вакциноterapia на 14-ту добу після операції у 50 мл р-ну Рінгера внутрішньовенно, крапельно (кількість ДК на одне введення – 3-20  $\times 10^6$ ); 4) ревакцинація – чотири і більше введень з інтервалом 1 місяць.

Метод лікування терапевтичної вакциною на основі дендритних клітин (ДК) - це метод, який використовує здатність дендритних клітин репрезентувати ракові клітини «наступальному заgonу лімфоцитів». Він дозволяє направлено уражати тільки ракові клітини, практично не завдаючи шкоди здоровим тканинам. Оскільки використовуються імунні клітини самого пацієнта, побічні явища невеликі, потреби в госпіталізації не виникає, і лікування можна проводити амбулаторно.

Типи протипухлинних вакцин: цільноклітинні (автологічні - з клітин пухлин хворого або галогенні – з клітинних ліній набору пухлинних антигенів); - антиген-ад'ювантні – в основі мають фрагменти специфічного білка або пептидів; - дендритно-клітинні –спеціалізовані клітини білої крові,отримують з крові хворого, потім вони навантажуються пухлинними антигени і вводяться повторно; -ДНК-вакцини – є генетичною послідовністю, що кодує пухлинний антиген, вони вбудовані в систему доставки (плазмід); - нуклеотид. Принцип дії протипухлинних вакцин полягає в посиленні протипухлинного захисту, закладеного у природі імунітету здорової людини. Протипухлинні вакцини містять ПАА (пухлиноасоційовані антигени), що стимулюють вироблення цитотоксичних антитіл і активацію цитотоксичних

лімфоцитів (ЦТЛ), спрямованих проти пухлини. Імуногенні ПАА можуть бути асоційовані з цілими чи лізованими пухлинними клітинами, і навіть отримані у частково чи повністю очищеному вигляді.

Найпростіший спосіб виготовлення вакцин — використання інтактних інактивованих пухлинних клітин (ПК), або аутологічних, або алогенних (від різних пацієнтів). Клітини інактивують іонізуючим випромінюванням. Інший спосіб виготовлення вакцин методично складніший і полягає в отриманні екстрактів з ПК. Перевагою цих вакцин є те, що вони вимагають інактивації опроміненням, а окремі компоненти клітин, зокрема білки, більш адекватні, ніж інтактні ПК, для фагоцитування і процесінгу макрофагами. ідіотопічні – є антитілами проти антитіл до пухлинних агентів.

Частота позитивних результатів після застосування різних видів вакцин (опромінених пухлинних клітин, лізатів пухлинних клітин тощо) становить 1,5 – 2,0%, а дендритноклітинної вакцини – 9,5%. Застосування протипухлинних вакцин у комбінованому лікуванні хворих на рак шлунка та легенів підвищує показники довготривалості життя на 5 років та покращує якість життя хворих.

Дендритні клітини - це імунні клітини, що виконують функцію антигенпрезентувальних щодо процесінгу (роздроблення пухлинної клітини на окремі антигени) та презентації цих пухлинних антигенів до імунної відповіді. Але цю функцію здатні виконати тільки зрілі ДК. Показано, що у онкохворих дендритні клітини є незрілими. Для виготовлення вакцини на основі ДК, перш за все, з крові отримують клітини - прототипи дендритних клітин (моноцити), з яких потім *in vitro* вирощують дендритні клітини, доводячи їх до зрілого стану стимулюючи антигенами та цитокінами. Одночасно відбувається навантаження пухлинними тканинами, які є мішенню, а також штучним антигеном, що дозволяє презентувати лімфоцитам ракові мішені. Крім того, дендритні клітини керують іншими імунними клітинами, і вся імунна система атакує ракові клітини.

Лікування вакциною на основі ДК з використанням «штучного» пухлинного антигену - пептиду WT1, виготовленого на основі тканини іншого пацієнта. WT1 - це вид білка, який присутній практично у всіх ракових пухлинах. Штучний антиген «Пептид WT1» дозволяє проводити лікування вакциною на основі ДК щодо практично будь-яких видів раку. Його використання дозволяє проводити лікування навіть при відсутності тканин самого пацієнта. Однак, умовою застосування цього методу є сумісність обидвох пацієнтів за системою HLA. Лікування вакциною на основі ДК з використанням власних тканин пацієнта.

Метод лікування вакциною на основі ДК з використанням власних пухлинних тканин пацієнта, отриманих в ході операції і т.д. Використання власних тканин дозволяє проводити повністю індивідуалізоване лікування для кожного пацієнта. Для застосування цього методу необхідна пухлинна тканина розміром однієї фаланги мізинця. Місцеве лікування вакциною на основі ДК полягає у введенні

вакцини на основі ДК в ракові вогнища. Такий метод показаний пацієнтам, у яких пухлина знаходиться в доступному для ін'єкції місці.

Дендритні клітини широко застосовують для індукції та отримання великої кількості антигенспецифічних Т-лімфоцитів, при цьому існують дані про значну частоту стабілізації або регресії пухлин, або метастатичних вузлів, підвищення тривалості життя. Перші спроби експериментальної вакцинації ДК тварин з пухлинами були зроблені в кінці 1980 р. Перші результати клінічних спроб по використанню ДК навантажених пухлинними АГ для терапії хворих з новоутвореннями були описані в 1996р. на прикладі хворих з В-клітинною лімфомою. З чотирьох випадків в одного пацієнта визначили повну регресію, в іншого часткову. У 1996р. Вакцинацію ДК отримали хворі на метастатичний рак простати, а у 1998 р. меланоми. Клінічна ефективність ДК доведена при: В-клітинній лімфомі, раку яєчника; мієломній хворобі. Проводилися дослідження по введенні ДК, навантажених пухлинними антигенами (АГ), у метастаці лімфовузла, внутрішньовенно чи підшкірно. Для досягнення максимального ефекту вводилося біля 2 600 000 - 37 600 000 ДК, одноразово, або декілька разів з різними інтервалами.

Від 2010 року у США для лікування хворих з раком простати застосовують дендритноклітинну вакцину, у якій ДК перед подаванням хворому були «годовані» *in vitro* кислою фосфатазою, кон'югованою з ГМ-КСФ ( sipuleucel – T). Вакциною можуть служити фрагменти антитіл, які містять ідіотипи, характерні для клітин лімфоми, які походять з В-лімфоцитів.

Відносно новим напрямком у активній специфічній імунотерапії пухлин є лікування вакцинами, модифікованими генетично. Найперспективнішими напрямками є: 1) введення у пухлинні клітини генів для цитокінів ІЛ-2, -4, -7, ГМ-КСФ, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ ; 2) введення у пухлинні клітини генів для коstimуляційних молекул (CD80). Введення генів пухлинних антигенів у віруси або бактерії – наприклад, гену для канцеро-ембріонального антигену (CEA), антигену раку простати – PSA, генів до антигенів меланоми MART-1, gp100 – здійснює цікаву імунологічну стратегію знищення пухлинної клітини: змодифікований генетично вірус (наприклад, Herpes simplex типу 1, розмножується у пухлинній клітині, вбиваючи її. Одночасно цей вірус містить ген для ГМ-КСФ і забезпечує місцевий синтез цього цитокіну, чим підтримує розвиток дендритних клітин, презентацію ними пухлинних антигенів і т. д. Подача такої вакцини безпосередньо у вузол локально знищує пухлинні клітини, а внаслідок індукції специфічної протипухлинної імунної відповіді підлягають регресії інші пухлинні зміни.

Кільканадцять відсотків всіх злоякісних пухлин людини – це пухлини з вірусною етіологією. Використовуючи профілактичні щеплення проти відповідних онкогенних вірусів, можна реально добитися зниження частоти вірусосоційованих пухлин. Це в першу чергу стосуються щеплень проти таких вірусів, як вірус папіломи людини (HPV), який часто є причиною раку шийки матки, та вірусу інфекційного гепатиту типу В (HBV), який є причиною первинного раку печінки.

Найбільш вивченими є аутологічні вакцини, імуногенність яких посилена за допомогою хімічної модифікації гаптенами, непатогенними вірусами, мікробними антигенами та інші. За даними літератури, позитивні результати використання аутовакцин зареєстровані при лікуванні хворих на колоректальний рак, меланому, рак нирок та інш. Вакцини. ПАВ готують з аутологічних пухлинних клітин, отриманих з резектованої пухлини. Після хірургічного втручання в стерильних умовах з пухлинного осередка видаляють шматок пухлинної тканини масою до 5 г. Тканину беруть в найбільш активній периферичній ділянці пухлини і зберігають при температурі 18 °С. При виготовленні вакцини в день операції матеріал зберігають в холодильнику при температурі 4 °С. Аутовакцину вводять підшкірно в декілька місць підлопаткової ділянки, починаючи з 7–10 і доби після операції Курс вакцинотерапії складається з 3-ох ін'єкцій по 3 мл з тижневим інтервалом. Ревакцинацію проводять двічі шляхом одноразового введення 3 мл аутовакцини через 1 та 4 міс після останньої вакцинації. Сумарна доза ПАВ по білку повинна складати 180–210 мг.

Зараз з'явилися нові типи протипухлинних вакцин: 1) *вакцина, яка містить протипухлинний білок SAGP* - це глікопротеїн, який був виділений з екстракту *Streptococcus pyogenes*. Секвестрований ген, що кодує білок SAGP, і визначена його молекулярна маса - 140-150 кДа. Було встановлено, що даний білок, діючи на пухлину безпосередньо, пригнічує мітотичну активність пухлинних клітин і викликає їх апоптоз. Ці ефекти опосередковуються імуномодуючими властивостями білка SAGP; 2) *вакцина, яка містить стрептокіназу і протеолітичні ферменти*. Один з механізмів, що пояснюють протираковий ефект вакцини Колі, може бути пов'язаний зі стрептокіназою. Даний фермент, що виробляється *S.pyogenes*, при взаємодії в крові людини з проактиватором плазміногеном, утворює плазмін, який активує систему швидкого фібринолізу і розчиняє волокна фібрину в кров'яних згустках і тромбах. Встановлено, що плазмін також пригнічує ріст деяких типів злоякісних пухлин. Відзначено підвищення ефективності хіміотерапії в поєднанні зі стрептокіназою, яка збільшує чутливість пухлини до препаратів.

Перспективним напрямком в біотерапії злоякісних пухлин є поєднання методів активації специфічної і неспецифічної протипухлинної резистентності. Звичайно, найефективнішим є застосування імунотерапії в ад'ювантному режимі, тобто після радикальних операцій, хіміо- і/або променевого лікування, коли вдається максимально зменшити пухлинну масу. Це дозволяє продовжити

тривалість безрецидивного періоду і поліпшити тим самим якість життя пацієнтів.

Універсальна вакцина від раку, яку розробили німецькі вчені, зупинила ріст пухлин у трьох пацієнтів з раком шкіри (меланомою). Основним компонентом вакцини є наночастинки, що містять РНК. Вони проникають до імунних клітин та запускають захисні системи організму, що перешкоджають росту пухлин.

**ДНК-вакцини у боротьбі з раком.** У лабораторіях Immunomic Therapeutics була розроблена технологія асоційованих з лізосомами мембранних білків (LAMP-Vax™). Вона має величезний потенціал для підвищення ефективності вакцин з нуклеїнових кислот. Протягом найближчих років на ринок має вийти новий імунологічний продукт. Дослідницька технологія LAMP-Vax, що була розроблена Томом Августом у Медичній школі Університету Джона Гопкінса, може поліпшити імунну відповідь організму на вакцини нуклеїнових кислот. LAMP-Vax перенаправляє антигени прямо до дендритних клітин, що допомагає імунній системі розпізнавати чужорідні молекули. Технологія LAMP-Vax дозволяє доставляти ДНК прямо до дендритних клітин.

Серед численних підходів, які досліджують вчені, вакцини на основі ДНК та РНК демонструють неабиякий оптимізм. Коли чужорідна нуклеїнова кислота поглинається клітиною і перетворюється на білок антигену, вона викликає імунну відповідь. Якщо цей антиген пов'язаний з раком чи ВІЛ або якимсь іншим хронічним станом, то такі маніпуляції “навчать” імунну систему боротися із хворобою самотужки.

Безперечно ефективним є застосування профілактичних протипухлинних вакцин проти вірусів – тригерів онкогенезу в людини. Це стосується в першу чергу вакцинації проти НВВ- інфекції, яка знижує частоту виникнення раку печінки в 4 рази, та профілактичної вакцинації проти НРV-інфекції (Gardasil (Merck Sharp & Dohme), Cervarix (GlaxoSmithKline)), яка може захистити від раку шийки матки.

Широкого поширення у світі набула **профілактична вакцинація проти вірусу папіломи людини** – основного етіологічного чинника раку шийки матки.

**Вакцина проти вірусу папіломи людини** — це комбінована вакцина, яка захищає від деяких видів папіломавірусів людини, що передаються статевим шляхом і використовується для профілактики раку. Віруси папіломи людини (ВПЛ) типів 16 і 18 відповідають за приблизно 70% випадків раку шийки матки в світі. Папіломавірус типу 6 і 11 несуть основну відповідальність за розвиток гострих кондилом (генітальних бородавок).

**На сьогоднішній день існують два типи вакцин: Гардасил** – чотирьохвалентна вакцина, що захищає від папіломавірусу 6, 11, 16, 18 типу. Вакцина випускається голландською фармацевтичною компанією «MSD», та **Церварікс** - двовалентна вакцина, що захищає від ВПЛ 16 і 18 типу. Випускається бельгійською компанією «GlaxoSmithKline Biologicals».

**Автоімунна патологія.** Вакцинація також використовується у лікуванні автоімунних хвороб, але механізм її лікувальної дії є іншим. Першим кроком у діагностиці хворих аутоімунними хворобами є ідентифікація автоантигенів.

Спосіб лікування цих хвороб вакцинацією ґрунтується на поверненні толерантності імунної системи до автоантигенів. Лікування автоантигенами полягає в тому, що різними способами (довенно, підшкірно чи внутрішньочеревно) пацієнтові подають пептиди, які отримані з автоантигену (навіть у формі фрагментів ДНК, їх кодуєчих), що викликає клональну делецію автореактивних лімфоцитів. Цей ефект є особливо помітним при застосуванні великих доз автоантигену. Така терапія веде до індукції природних механізмів автотолерантності. В якості вакцини вводять: 1) комплекси пептид-МНС, або так звані рекомбіновані ліганди для Т-клітинного рецептора (TCR) (recombinant TCR ligands – RTL); 2) змінені (модифіковані) пептидні ліганди (altered peptide ligands – APL) – це пептиди, які у природній спосіб розпізнаються аутореактивними Т-лімфоцитами; 3) пептиди, які мають антагоністичні властивості і вводять аутореактивні лімфоцити у стан анергії. Модифікація пептидів або їх лігандів полягає у заміні однієї чи двох амінокислот, але цього вистарчає для зміни сигналу, активуючого лімфоцит, і, відповідно, характеру диференціювання наївного Т-хелпера у Т-хелпер 1-го або 2-го порядку. Індукція толерантності до автоантигену можлива завдяки введенню автоантигену малими дозами per os, у зів та інтраназально, внаслідок чого активуються інтраепітеліальні лімфоцити слизових, які синтезують протизапальні цитокіни (ІЛ-10, ТФР-β). Ці лімфоцити мігрують до регіональних лімфовузлів, пригнічують імунну відповідь на інші автоантигени, які презентуються тими ж самими антигенпрезентуючими клітинами. У такий спосіб вводять колаген II-го типу хворим на РА, інсулін - хворим на цукровий діабет 1-го типу, тиреоглобулін пацієнтам з хворобою Хашімото, антиген сітківки хворим на запалення судинної стінки та сітківки ока, а колаген I-го типу – хворим із системною склеродермією. Недавно розпочалися дослідження щодо лікування автоімунних хвороб введенням суспензії толерогенних дендритних клітин, презентуючих автоантигени, які впливають на розмноження Т- регуляторних лімфоцитів.

### **Напрямки дискусії:**

1. Переваги та недоліки застосування пухлинних вакцин в онкології
2. Протокол створення дендритноклітинної вакцини
3. ДНК вакцини в онкології, їх переваги
4. Профілактичні вакцини в онкології
5. Сучасні досягнення у лікуванні автоімунних хвороб вакцинами.

### **Використана література:**

1. Fridman W.H., Mlecnik B., Bindea G., Galon G. Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Current Opinion Immunol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 272 – 278.
2. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. *Immunologia nowotworow.* In: *Immunologia, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 2015, 498 p.*

3. Quezada S.A., Peggs K.S., Simpson T.R., Allison J.P. Shifting of the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 241. – P. 233 – 240.
4. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gaborilovich D.I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment. *Trends. Immunol.* – 2016. – Vol. 37. – P. 208 – 220.
5. Palucka A.K., Coussens L.M. The basis of oncoimmunology. *Cell.* – 2016. – Vol. 164. – P. 1233 – 1247.
6. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stokłosa T. *Immunologia* (nowe wydanie). Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 2017, 497 p.