

## Тематичний план самостійної роботи з дисципліни «Клітинна та молекулярна імунологія» підготовки аспірантів очної (денної, вечірньої) форми навчання за спеціальністю 222 Медицина.

1. Структура та функції місцевого імунітету та методи його оцінки (Г.О.Потьомкіна)
2. Імуногістохімічні методи в онкології. Імунодіагностика в онкології (А.М.Гаврилюк/Г.О.Потьомкіна)
3. KIR в репродуктології. Імунодіагностика в репродуктології (А.М.Гаврилюк)
4. Гібридомна технологія в медицині. Перспективи генної та клітинної терапії (А.М.Гаврилюк)
5. Алергічні хвороби: сучасні методи імунодіагностики (С.О.Зубченко)
6. Автоімунні хвороби: сучасні методи імунодіагностики та імунотерапії (Х.О.Ліщук-Якимович)
7. Імунопроліферативні хвороби: сучасні методи імунодіагностики (...)
8. Імунодіагностика в трансплантології (А.М.Гаврилюк)
9. Сучасні біотехнології. Таргетна терапія з використанням сигнальних та ядерних клітинних систем (Г.О.Потьомкіна/А.М.Гаврилюк)
10. Сучасні підходи до підбору вакцин для імунопрофілактики імунокомпроментованих пацієнтів (А.М.Гаврилюк)
11. Первинні та вторинні імунодефіцити: сучасні методи імунологічної діагностики (Л.В.Костюченко/Г.О.Потьомкіна)

### Самостійна робота №1. Структура та функції місцевого імунітету. Методи оцінки місцевого імунітету – 2 год (Г.О.Потьомкіна)

#### Короткий зміст теми заняття

Імунна система - це набір органів, тканин, клітин і білків, які захищають господаря від патогенів в будь-який момент їх проникнення і обмежують їх поширення по всьому організму.

В організмі людини можна ідентифікувати 4 умовні структурні одиниці імунної системи:

- 1) системний імунітет - імунна відповідь на антигени, які проникли в тканини або потрапили в кровоплин;
- 2) місцевий імунітет слизових оболонок - область формування імунної відповіді в ділянці, куди проникають більшість патогенів;
- 3) імунітет порожнин організму (живота і плеври);
- 4) імунітет шкіри.

Під час еволюції в слизових оболонках організувалася специфічна лімфоїдна тканина – слизова, асоційована з лімфоїдною тканиною (**mucosa-associated lymphoid tissue — MALT**)), де утворюються захисні реакції на патогени вродженої і адаптивної відповіді. Лімфоїдні тканини слизових оболонок різних відділів мають свої особливості, які задовольняють потреби їх анатомічного розташування. Залежно від анатомічного розташування лімфоїдної тканини слизові поділяються на NALT (лімфоїдна тканина, пов'язана з носоротоглоткою), BALT (тканина, пов'язана з бронхами), GALT (лімфоїдна тканина, пов'язана з кишкою) і SALT (лімфоїдна тканина, пов'язана зі шкірою). Лімфоїдні тканини слизових оболонок різних відділів взаємопов'язані між собою завдяки

рециркуляції між ними лімфоцитів. При цьому слизова лімфоїдна тканина певною мірою ізольована від інших (периферійних) вторинних лімфоїдних органів через автономність шляхів рециркуляції лімфоцитів.

Гуморальна ланка місцевого імунітету включає: бар'єрні білки-муцини, дефензини, кателицидини, лектини, лізоцим, лактоферин, інгібітори протеаз, цитокіни, імуноглобуліни; клітинна ланка — дендритні клітини, моноцити, макрофаги, інтраепітеліальні Т-лімфоцити, нейтрофільні гранулоцити, тучні клітини (мастцити, лаброцити), еозинофільні гранулоцити, натуральні кілери). Крім того, слизова оболонка дихальних шляхів вкрита секретом, що містить речовини, які виявляють антибактерійну активність. Завдяки моториці війкового епітелію цей секрет постійно транспортується назовні. У межах цього процесу елімінуються прониклі у дихальні шляхи збудники, що запобігає їх фіксації. Мукоциліарний кліренс — важливий компонент неспецифічної резистентності слизової оболонки.

Функціонально розрізняють аферентні (індуктивні) та еферентні (ефективні) зони лімфоїдних тканин слизових оболонок. В індуктивній зоні відбувається розпізнавання і презентація антигену дендритними клітинами, формування антигенспецифічних лімфоїдних клітин. В ефекторній зоні продукується секреторний IgA та накопичуються ефекторні Т-клітини.

**Лімфоїдна тканина, асоційована з кишечником (GALT).** Загальна всмоктувальна поверхня кишки становить біля 100 м<sup>2</sup>. Першим ефективним, захисним бар'єром є травні соки — кисле рН шлункового соку, протеолітичні ферменти, слиз, лізоцим, лактоферин, секреторний IgA. Наступний бар'єр — циліндричний епітелій, який містить ентероцити, келихоподібні клітини, ентероендокринні клітини, клітини Панета, міжепітеліальні лейкоцити. Власний шар (lamina propria) слизової оболонки має як неспецифічні, так і специфічні механізми захисту. Частка В-лімфоцитів у власному шарі становить 20-40%, Т-лімфоцитів — 40-60%, макрофагів - 10%, еозинофілів - 5%, мастоцитів – 1-3%. Лімфоцити слизової оболонки кишки реалізують дві основні функції: синтез секреторного IgA та регуляція імунної відповіді на антигени, що потрапляють до шлунково-кишкового каналу (ШКК). Місцем індукції імунної відповіді в кишечнику є пейєрові пляшки, більшість яких сконцентрована в термінальних відділах тонкої кишки. У структурі пейєрових пляшок виділяють три зони: 1) лімфатичні фолікули (скупчення В-лімфоцитів); 2) міжфолікулярні простори (скупчення Т-лімфоцитів); 3) куполи, утворені епітелієм, де знаходяться М-клітини, основна функція яких — захоплення антигенів із просвіту кишки та переміщення їх у підепітеліальну ділянку для контакту з антигенпрезентуючими клітинами з подальшою індукцією імунної відповіді. Кооперативна взаємодія дендритних клітин, Т- і В-лімфоцитів приводить до перетворення В-лімфоцитів на плазмоцити, які продукують секреторний IgA. Комітовані до продукції SIgA В-лімфоцити мігрують з пейєрової пляшки в мезентеріальний лімфатичний вузол, далі — у власну пластину кишечника (так звану ефекторну зону). Міграція у власну пластинку кишечника та інших органів (бронхів, сечостатевого органу тощо) відбувається через грудну протоку і циркуляцію в периферичній крові. Цей процес переміщення В-клітин отримав назву «хомінг-ефекту».

Загальна чисельність мікроорганізмів, що знаходяться в різних біоптатах організму людини на два порядки перевищує кількість власних клітин організму. Найбільша питома вага мікрофлори людини (60%) знаходиться в кишечнику із загальною кількістю видів >500. Також активно заселена слизова оболонка дихальних шляхів, шкіра.

**Слизовий імунітет носоротоглотки – NALT.** Важливу роль у фізико-хімічному гомеостазі носоротоглотки відіграє слина, захисні білки і пептиди якої можуть зв'язувати

антигени, забезпечуючи їх аглютинацію й ізоляцію на поверхні слизової оболонки. Вони володіють антибактерійними, протигрибковими і противірусними властивостями. Імунологічний апарат слизової оболонки носоротоглотки представлений організованими тканинними структурами - некапсульованими скупченнями фолікулів, оточених лімфоїдною тканиною (кільце Пірогова-Вальдейєра: горловий, язиковий, піднебінні та трубні мигдалики), дифузна лімфоїдна тканина.

Аферентна зона слизової оболонки анатомічно представлена мигдаликами, слинними залозами, лімфоїдними фолікулами та регіональними лімфатичними вузлами. Ефекторний (виконавчий) відділ імунної системи слизових оболонок анатомічно знаходиться в епітелії, lamina propria і підслизовому шарі, куди мігрують активовані лімфоцити.

**Лімфоїдна тканина, асоційована з бронхами (BALT).** Бронхоасоційована лімфоїдна тканина — це скупчення лімфоїдних вузликів у різних відділах системи органів дихання. Особливим механізмом захисту легень є система сурфактанта. Фосфоліпіди сурфактанту здатні активувати бактерицидність альвеолярних макрофагів, чинити хемотаксичну дію. Антиоксидантна активність сурфактанту перешкоджає шкідливому впливу окисників. Серед гуморальних факторів захисту дихальних шляхів також відзначимо секреторний IgA, лізоцим, лактоферин, систему комплементу та інтерферонів. Клітинна ланка представлена переважно альвеолярними макрофагами (фагоцитуючі мононуклеари), нейтрофільними та еозинофільними гранулоцитами.

**Toll-like-рецептори (TLR)** - еволюційно давня система, що включає в людини 10 типів рецепторів, розміщених на клітинах вродженого імунітету та клітинах негемпоетичного походження (наприклад, на епітеліальних клітинах) позаклітинно (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10) та внутрішньоклітинно (TLR3, TLR7, TLR8 і TLR9). Вказані рецептори розпізнають патоген-асоційовані молекулярні паттерни мікроорганізмів (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Експресія білків TLR сильно варіює і залежить від площі слизової оболонки і її стану (нормального або ушкодженого). Крім контакту з патогенами (PAMP), імунна система слизової активно взаємодіє з комменсальною мікробіотою (мікроорганізмами, які населяють людину, але не викликають захворювання), тому введено термін CAMPs для комменсально-асоційованих молекулярних паттернів (або більш загального терміну MAMPs), який також розпізнається системою TLR. Дослідженнями було доведено, що вирішальним фактором щодо долі патогенів, які потрапили в організм, є наявність чи відсутність PAMP в їхньому складі. Якщо на поверхні патогену відсутні PAMP, сигнал про проникнення патогену не індукується. Дендритні клітини при цьому захоплюють такий патоген, але не активуються. Вони набувають індеферентний/ толерантний фенотип, завдяки такі патогени взагалі не розпізнаються. Коли ж патогени, що містять PAMP, потрапляють через слизові оболонки, вони розпізнаються клітинами вродженого імунітету, що служить сигналом для розвитку запалення. На цьому тлі активуються дендритичні клітини, що переносяться з бар'єрних тканин в регіональні лімфатичні вузли. При розвитку імунної відповіді слизових утворюються клітини пам'яті, що вибірково мігрують у бар'єрні тканини (особливо ті, в яких вони утворилися). Клітини пам'яті локалізуються в епітеліальному шарі, а CD4-T- і B-лімфоцити пам'яті знаходяться в lamina propria і підслизовому шарі, а також в структурованих лімфоїдних утвореннях. У більшості лімфоїдної тканини слизових оболонок переважають B-клітини пам'яті, що експресують мембранний рецептор IgA-ізотипа, а в бронхолегеновому відділі - IgG-ізотипу.

**Дифузна лімфоїдна тканина** є частиною еферентної зони, представленої різними імунокомпетентними клітинами: Т- і В-лімфоцитами, дендритними клітинами, макрофагами, клітинами NK- і NKT, епітеліальними і щоглоподібними клітинами. Склад дифузної лімфоїдної тканини значно варіює в епітелії (lamina propria) і підслизовому шарі. Регуляторні клітини (Treg) також відіграють велику роль у формуванні імунної відповіді в слизових оболонках, які пригнічують імунні процеси, запобігаючи їх деструкції і розвитку аутоагресії. Пул цих клітин поповнюється індуктивними (адаптивними) регулюючими Т-клітинами, до яких відносяться Treg, що продукують IL-10 і TGF- $\beta$ .

У слизових оболонках В-лімфоцити секретують антитіла класу IgA. Пік IgA-відповіді припадає на 7-10-й день імунної відповіді. Вибіркове перемикання ізотипу антитіл на синтез IgA характерно для тих ділянок слизових оболонок, що заселені мікроорганізмами (так в мигдаликах і в кишці людини частка IgA-продукуючих клітин становить до 90% всіх продуцентів антитіл). У слизовій оболонці, на якій відсутня мікрофлора (наприклад, нижні дихальні шляхи) переважає IgG-продукція антитіл. Найбільш важливим фактором ефекту лімфатичної тканини слизових є секреторні димерні молекули IgA (sIgA), які утворюються зі звичайних мономерних молекул сироваткових IgA при їх транспорті через епітеліальний шар слизових оболонок.

**Значення окремих гуморальних факторів неспецифічного захисту слизової оболонки.** Секреторний IgA синтезується локально клітинами слизових оболонок організму і становить 2/3 загальної маси антитіл цього класу. 1/3 — це мономерні форми IgA плазми крові, які продукуються в кістковому мозку. Секреторний IgA представлений двома підкласами: SIgA1 та SIgA2. Основна відмінність підкласів полягає у відсутності у складі SIgA2 13 амінокислот. Відсутність останніх у такому стратегічному місці антитіла, як замкове, запобігає інактивації SIgA2 різного роду бактеріями (*Streptococcus (Str.) pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*), які в ході еволюції набули здатності розщеплювати пролінтреонінові та пролінсерінові зв'язки в цій ділянці. Димерна секреторна форма здатна ефективніше нейтралізувати віруси та бактерійні токсини, ніж мономерна сироваткова форма. Противірусна дія SIgA полягає у блокуванні адгезії вірусів до епітеліальних клітин, пригніченні внутрішньоклітинної реплікації вірусу, антибактерійній дії через активацію фагоцитів. *Лізоцим (мурамідаза)* — фермент, який розщеплює муреїн клітинної стінки бактерій, що приводить до їхнього лізису, активний більшою мірою щодо грампозитивних бактерій. Він продукується нейтрофілами, моноцитами та макрофагами і міститься у всіх секретах організму (слині, сльозах тощо). *Лактоферин* — залізовв'язувальний глікопротеїн, який має потужну бактерицидну та бактериостатичну активність щодо низки мікроорганізмів за рахунок зв'язування заліза, необхідного для розмноження бактерій. У недавніх дослідженнях доведена його противірусна активність щодо вірусу простого герпесу, цитомегаловірусу, ротавірусів та аденовірусів. Антимікробні пептиди, зокрема  $\alpha$ -,  $\beta$ - *дефензини* (лізосомальні катіонні протеїни) — родина амфіфільних, катіонних, багатих на цистеїнові залишки пептидів. Основними продуцентами  $\alpha$ -дефензинів є нейтрофіли, незрілі дендритні клітини, моноцити, макрофаги, натуральні кілери, епітеліоцити;  $\beta$ - дефензинів — епітеліоцити, кератиноцити, моноцити, макрофаги, дендритні клітини. Широко представлений  $\beta$ -клас дефензинів у слизовій оболонці ШКК, підшлункової залози, слинних залоз. Не виключено, що певні  $\beta$ -дефензини продукуються пробіотичними бактеріями. Доведено, що дефензини чинять бактерицидну, фунгіцидну та віроцидну дію.

Серед цитокінів високу противірусну активність виявляють інтерферони. Велике значення в підтримці місцевого імунітету належить фагоцитам, до основних функцій яких

слід віднести: 1) захист від патогенних мікроорганізмів (бактерій, грибків, вірусів, найпростіших, паразитів і ін.); 2) елімінація мертвих або ушкоджених клітин; 3) секреція біологічно активних речовин.

До *неімунних неспецифічних факторів захисту належать*: 1) лізоцим порожнини рота; 2) соляна кислота шлункового соку; 3) травні ферменти (протеази); 4) жовч; 5) антагонізм нормальної мікрофлори кишки; 6) слиз і глікокалікс; 7) нормальна перистальтика кишки; 8) секреторна активність тонкої кишки (у криптах кишкових ворсин секретується рідина, що змиває патогенні агенти у просвіт кишки). Особлива роль належить грудному молоку, що обумовлено присутністю в грудному молоці макрофагів, клітин Т-кілерів, материнських антитіл тощо.

Основні методи діагностики місцевого імунітету: загальні клінічні лабораторні дослідження (загальний аналіз крові, сечі, біохімічний аналіз крові тощо), рівень загальних імуноглобулінів сироватки крові (IgM, IgA, IgG, IgE), секреторного IgA, IgM, IgG секретів, в т.ч. слини, мікробіоти кишки, слизової порожнини рота, піхви тощо, концентрації цитокінів, в т.ч. інтерфернів; активності фагоцитів, популяцій та субпопуляцій лімфоцитів, компонентів комплементу.

### **Використана література:**

1. Азнабаева Л.Ф., Арефьева Н.А., Даянов А.Н. Особенности местного иммунитета слизистой оболочки гортани в норме и при хронической воспалительной патологии// *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 9-3. – С. 373-376
2. Щубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей // *Иммунология*. 2018; 39(1): 81-88. DOI: [http:// dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88](http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88).
3. Wu Rui-Qing, Zhang Dun-Fang, Tu Eric, Chen Qian-Ming, Chen WanJun. The mucosal immune system in the oral cavity—an orchestra of T cell diversity. *Intern. J. Oral Science*. 2014; 6: 125-32
4. Марушко Ю.В. 1, Мовчан О.С.1, Марушко Т.В. Функціонування системи місцевого імунітету та її особливості в дітей, які часто хворіють на респіраторні інфекції//*Український медичний часопис*.- № 1 (99) – I/II 2014 г.:Академія — дистанційна освіта on-line
5. Аль Харірі Махмуд Жумаа, Семененко С. І., Зайков С. В., Яковлева О. О.. Динаміка параметрів місцевого імунітету при застосуванні імуномодулятора і бактеріофага в комплексному лікуванні пацієнтів з риносинуситом// *Український пульмонологічний журнал*.- 2018, № 3, С. 34–37.

## **Тема самостійної роботи №2. Гібридомна технологія в медицині. Перспективи генної терапії – 2 год. (А.М.Гаврилюк)**

### **Короткий зміст теми заняття**

**Гібридомна технологія в медицині.** Гібридома (лат. Hybridoma, грец. Hybridas, суміш + -ома — пухлина) — клітинний гібрид, що отримують шляхом злиттям нормальної клітини (напр. лімфоцита) з пухлинною. Має здатність до синтезу специфічного білка, напр. антитіл (властивість нормальної клітини), і до безмежного росту (властивість

пухлинної клітини). Синтезовані гібридомами моноклональні антитіла, використовують у багатьох галузях біології й медицини. Ведуться пошукові роботи з отримання гібридом, які продукують інші білки — фактори згортання крові, гормони тощо.

Спосіб одержання гібридом розроблено вченими Г. Келером і Ц. Мільстейном у Великій Британії в 1975 р. Вченим удалося одержати *in vitro* гібридому шляхом злиття клітин мієломи і антитілоутворюючих клітин (АУК) (похідних від В-лімфоцитів) селезінки миші, імунізованої еритроцитами барана. Клітини мієломи постачають гібридомі багато рибосом та розвинутий апарат Гольджі, необхідних для синтезу великої кількості білка. Заслугою вчених стало те, що вони «примусили» гібридомі синтезувати антитіла поза організмом. Такі антитіла одержали назву моноклональних, бо вони синтезуються нащадками АУК тварини, імунізованої одним антигеном епітопом та стала «безсмертною» завдяки гібридизації з пухлинною мієломною клітиною.

Клітини мієломної лінії є адаптованими до росту в культурі і не можуть засвоювати гіпоксантин із поживного середовища через відсутність ферменту пуринового обміну гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (ГГФРТ). Це було використано як селективний фактор при відокремленні пухлинних клітин, які не злилися з лімфоцитами-АУК, від утворених гібридом. Самі мієломні клітини гинуть, а гібридомі, які одержали здатність засвоювати гіпоксантин від лімфоцитів-АУК, виживають. Гібридизація (злиття) клітин здійснюється за допомогою поліетиленгліколю, який розчиняє мембрани клітин. Утворена гібридна клітина має два ядра та успадковує від обидвох «батьківських» клітин їх функції, але є недовговічною. Антитілоутворюючі клітини селезінки, що не брали участі в утворенні гібридом, живуть в культурі всього декілька днів і теж гинуть. В культурі залишаються гібридомі, і ті, які вижили, перевіряються на здатність синтезувати антитіла певної специфічності, а потім настає найбільш відповідальний етап роботи — клонування. Необхідно виростити з однієї клітини життєздатну популяцію гібридом (клон), які синтезують антитіла заданої специфічності.

Для гібридизації використовуються в основному мієломні клітини миші і щура, а останнім часом - мієломні клітини людини. Вчені звернули увагу на те, що клітини злоякісної пухлини кісткового мозку (мієломи) продукують величезну кількість аномальних імуноглобулінів (антитіл). Продуковані ними імуноглобуліни ідентичні за структурою, по суті це моноклональні антитіла. Загалом термін «моноклональні антитіла» (МА) означає, що антитіла, які виробляються ідентичними імуноними клітинами, які клоновані з однієї клітини-попередника (АУК), є специфічними до одного антигену (епітопу або антигенної детермінанти). Найчастіше тими антигенами є білки, полісахариди, білкова оболонка вірусу, пухлинні або пошкоджені клітини, токсини. МА - це антитіла, високоспецифічні до однієї антигенної детермінанти та одержані з одного клону клітин-продуцентів *in vitro*. Культивування виділеного клону проводиться наступними методами: 1) у культурі клітин - найкращий спосіб, тому що виділені імуноглобуліни є дуже чистими; 2) в організмі сингенних тварин (мишей, щурів) - у вигляді асцитної пухлини після введення гібридомної клітинної зависі в черевну порожнину; 3) у ферментерах (суспензійна культура). Технологія одержання моноклональних антитіл включає такі етапи: I - імунізація тварин (мишей, щурів, кроликів, хом'яків) певним епітопом антигену; видалення селезінки тварини; виділення із суспензії клітин селезінки антитілоутворюючих клітин (АУК); окремо проводиться підготовка мієломних клітин; II - гібридизація, підготовка клітин до злиття (фузії) та злиття; III - селекція - відбір гібридом, які синтезують антитіла потрібної специфічності; IV - клонування гібридомних клітин; V

- культивування гібридомних клітин, одержання культуральної рідини або асцити, які містять антитіла, ліофільна сушка та виділення антитіл. Вся процедура від початку імунізації тварин до виділення антитіл триває в середньому 3-4 місяці. Біотехнологія виробництва моноклональних антитіл гарантує елімінацію мієломних клітин, які не злилися, а також гібридів, утворених злиттям мієломних клітин і АУК.

Використання тваринних МА в медицині з терапевтичною метою пов'язане з певними обмеженнями. Найсуттєвішим ускладненням стала здатність імунної системи хворого індукувати проти них імунну відповідь, що викликало утворення у пацієнта циркулюючих антитіл (наприклад, анти-мишачих) і навіть гостру алергічну реакцію – анафілаксію. Тому за допомогою генної інженерії було сконструйовано такі імуноглобулінові гени, у яких фрагмент V залишався мишачого походження, а фрагмент С – людського, чи такі, у яких послідовності нуклеотидів, кодуєчі гіперзмінні регіони, були мишачого походження, а решту залишали людською. МА, у яких варіабельні фрагменти важких та легких ланцюгів мають тваринне походження, а стабільні фрагменти – людське, називають химерними, і на 75% складаються з людських послідовностей нуклеотидів. МА, у яких тільки гіперзмінні регіони мають тваринне походження, а решта послідовностей нуклеотидів мають людське походження, називають гуманізованими, на 95% складаються з людських послідовностей нуклеотидів.

На сьогоднішній день існують новіші технології – метод фагового дисплею або “phage display” та використання трансгенних тварин, які дозволяють синтезувати «цілком» людські МА. Метод фагового дисплею полягає у вбудовуванні гену, який кодує необхідний білок (у тому числі необхідні антитіла), у генотип бактеріофага, внаслідок чого він починає відтворювати цей білок на своїй оболонці, що дає можливість пізніше методом так званої білкової інженерії отримувати цей білок у необхідних кількостях. Більшість впроваджених у клінічну практику за останні роки МА – це гуманізовані форми чи «цілком» людські, котрі виконують свої функції власне так, як антитіла природнього походження.

Найбільш широко моноклональні антитіла застосовуються в медицині у лабораторній діагностиці для виявлення специфічного антигену (епітопу) (мають величезні переваги, оскільки забезпечують унікальну специфічність, стандартність і високу точність досліджень, підвищують їх дозвільну спроможність та інформативність), та для лікування різноманітних онкологічних, ревматологічних, неврологічних та пульмонологічних захворювань шляхом зв'язування та знешкодження пухлинних клітин та патогенетичних чинників, а також у трансплантології для профілактики реакції відторгнення трансплантату, є клінічних досвід застосування моноклональних антитіл у кардіології та при інфекційних захворюваннях.

Моноклональні антитіла використовують у таких терапевтичних цілях: 1) радіоімунотерапія - використання радіоактивно-кон'югованих мишачих антитіл проти антигенів на клітинах, найчастіше В-клітинних лімфом, оскільки це високочутливі злоякісні утворення; 2) антитіло-спрямована (таргетна) ферментна лікувальна терапія, тобто застосування асоційованих з пухлиною моноклональних антитіл, кон'югованих з ферментом, активованим лікарським препаратом. Системне введення нетоксичного агента призводить до перетворення антитіл в токсичні ліки, що призводить до цитотоксичного ефекту, який може бути згубним для злоякісних клітин; 3) кон'югати антитіло-лікарський препарат - це антитіла, пов'язані з однією або декількома молекулами препарату. Коли кон'югати антитіло-лікарський препарат зустрічається з клітинами-мішенями (наприклад,

раковими клітинами), лікарський засіб звільняється антитілом та знищує їх; 4) імуноліпосомна терапія – це терапія кон'югованими з ліпосомами антитілами. Ліпосоми можуть переносити лікарські препарати або нуклеотиди з терапевтичною дією, коли вони кон'югуються з моноклональними антитілами. Можуть використовуватися у лікуванні злоякісних пухлин; 5) чек-поінт терапія, яка використовує моноклональні антитіла для обходу захисних механізмів, якими пухлини пригнічують протипухлинний імунний захист.



Рисунок 1.

Схема створення гібридомних клітинних ліній. ГАТ-середовище – містить гіпоксантин, аміноптерин, тимидин. Клітини цієї лінії, на відміну від нормальних лімфоцитів, не могли засвоювати гіпоксантин із поживного середовища через відсутність ферменту пуринового обміну гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (ГГФРТ) (Golab J. et al., 2017).

Розширити репертуар антигенів, які можна визначати за допомогою МА у лабораторних методах, а також створити нові моноклональні антитіла для лікування – ось першочергові завдання для лікарів-лаборантів-імунологів та лікарів-клінічних імунологів майбутнього.



**Перспективи генної терапії. Генотерапія** — це сукупність генноінженерних (біотехнологічних) методів, спрямованих на внесення змін в генетичний апарат соматичних клітин людини з метою лікування захворювань, викликаних тими чи іншими мутаціями генів. Генотерапія може застосовуватися і для того, щоби додати клітинам нових функцій. В наш час генну терапію розглядають як потенційно універсальний підхід до лікування широкого спектру не тільки генетично детермінованих захворювань, але і інфекційних, зокрема ВІЛ-інфекції/ СНІДу. Так як генотерапія пов'язана зі зміною спадкового апарату людини, потрібно дотримуватися таких правил: 1) чітке знання місця розміщення мутації (дефекту) і якого саме гену; 2) симптоми хвороби; 2) відтворення генетичної моделі у експерименті на тваринах; 3) відсутність альтернативної терапії або існуюча терапія неможлива чи неефективна; 4) безпека для хворого. При розробці Т.г. також вирішуються такі питання: 1) які клітини необхідно використовувати; 2) яку частину клітини необхідно вилікувати, щоб зменшити або зупинити прогресування хвороби; 3) чи буде небезпечною надекспресія введеного гена; 4) чи є безпечним потрапляння реконструйованого гену в інші тканини; 5) як довго буде функціонувати змінена клітина; 5) чи будуть атаковані ці змінені, нові для організму, клітини імунною системою.

Для виконання генотерапії використовуються два підходи. Перший із них передбачає виділення клітин пацієнта для введення в них необхідного гена (генотерапія *ex vivo*), після чого вони повертаються в організм хворого. Як вектор використовують ретровіруси, що містять генетичну інформацію у вигляді РНК. Ретровірус забезпечується рекомбінантною РНК (РНК вірусу + РНК копія гена людини). Після надходження рекомбінантної РНК у клітину людини, напр. у стовбурову клітину кісткового мозку, відбувається зворотня транскрипція, і рекомбінантна ДНК, що несе нормальний ген, потрапляє в хромосому людини. Так було проведено лікування тяжкого імунодефіциту внаслідок відсутності аденозиндезамінази (АДА) у декількох дітей. Паралельно вони отримали фермент АДА, виділений з крові, як лікувальний препарат. Використовуючи як вектор аденовірус (AVV), учені розробили метод генотерапії серпоподібно-клітинної анемії. За природних умов AVV уражає тільки ті клітини червоного кісткового мозку, які є попередниками еритроцитів. Функціональний ген  $\beta$ -глобуліну ввели в AVV, а вірус переніс його в незрілі еритроцити. Останні наповнюються нормальним гемоглобіном і спрямовуються у кров'яне русло.

Другий підхід у генотерапії передбачає використання: а) вірусів; б) клітин, вирощених у лабораторії; в) штучних носіїв для введення генів безпосередньо в організм хворого. Наприклад, позбавлений хвороботворних властивостей аденовірус міститься у флаконі з аерозолем. При вдиханні хворим аерозольної суспензії вірус проникає в клітини легень і переносить до них функціональний ген муковісцидозу.

**Сучасна концепція генотерапії** з'явилася відразу після відкриття явища трансформації у бактерій і вивчення механізмів трансформації клітин тварин онкогенними вірусами. Такі віруси можуть здійснювати стабільне впровадження генетичного матеріалу в геном клітини хазяїна, тому було запропоновано використовувати їх як вектори для доставки бажаної генетичної інформації в геном клітин. Передбачалося, що такі вектори

можуть у разі необхідності виправляти дефекти геному. Реальністю генна корекція соматичних клітин стала після 1980-х років, коли були розроблені методи отримання ізольованих генів, створені еукаріотичні експресуючі вектори, а переноси генів у мишей та інших тварин стали рутинною процедурою. Історично генна терапія націлювалась на лікування спадкових генетичних захворювань, проте поле її застосування, принаймні теоретично, розширилося. У експерименті на мишах, у яких ушкоджена та ж ділянка мозку, що й у пацієнтів із хворобою Альцгеймера, апробується новий метод лікування генною терапією. У їх фібробласти вводять ген фактора росту нервів. Ці клітини імплантуються у розріз мозку, вони починають місцево секретувати фактор росту, необхідний нейронам. Нейрони починають рости і продукувати відповідні нейромедіатори. Схожий тип генної терапії може бути використаний для лікування хвороби Гентінгтона, хвороби Паркінсона, депресії та ін. Певних успіхів досягнуто при використанні генної терапії у лікуванні злоякісних новоутворень. Виділяється пухлинна клітина, в яку вводять гени, що кодують синтез таких протипухлинних імунних факторів, як інтерферони та інтерлейкіни. Змінені клітини, введені заново у пухлину, починають продукувати ці речовини у великих кількостях, чим знищують і себе, і навколишні злоякісні клітини.

**Методи генотерапії** можна поділити на два типи: генна терапія *ex vivo* та *in vivo*. Розробляються специфічні лікарські препарати на основі нуклеїнових кислот: РНК-ферменти, модифіковані методами генної інженерії олігонуклеотиди, що коректують генні мутації *in vivo* і т. д. Існує кілька способів введення нової генетичної інформації в клітини ссавців, які залежать від клітин-мішеней: 1) фетальна генотерапія, при якій чужорідну ДНК вводять у зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку, при цьому очікується, що введений матеріал потрапить в усі клітини реципієнта (і навіть у статеві клітини, забезпечивши тим самим передачу наступному поколінню); 2) соматична генотерапія, при якій генетичний матеріал вводять тільки в соматичні клітини і він не передається статевим клітинам.

Ідентифікація характерних генів та їх мутацій, які спричиняють хвороби, постійно знаходиться в центрі уваги науковців – біологів та медиків. Визначення малих кодуючих послідовностей нуклеотидів у структурі ДНК (smaller coding sequences) стало стимулом для розвитку рекомбінантної ДНК-технології. Паралельно вчені розробляли методи ефективного трансферу модифікованих генів у геном господаря. Першими векторами для трансферу стали ретровіруси – поодинокі чи в комплексі, як наприклад гамма-ретровірус Moloney murine leukemia virus (M-MLV) та лентівірус human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Вони видавалися найпривабливішими для використання у генній терапії, бо стабільно інтегрувалися у хромосоми господаря і забезпечували довготривалу експресію (і терапевтичну ефективність) введених генів. У процесі генерації ретровірусного вектора всі вірусні кодуючі білок послідовності забираються з його геному і заміщуються кодуючими послідовностями цікавого для нас гена – трансгена. Крім трансгена, ретровірусний геном містить вірусні некодуючі послідовності (cis-acting elements), необхідні для його реплікації та інкапсулювання як нового віруса-вектора (Рисунок 2).

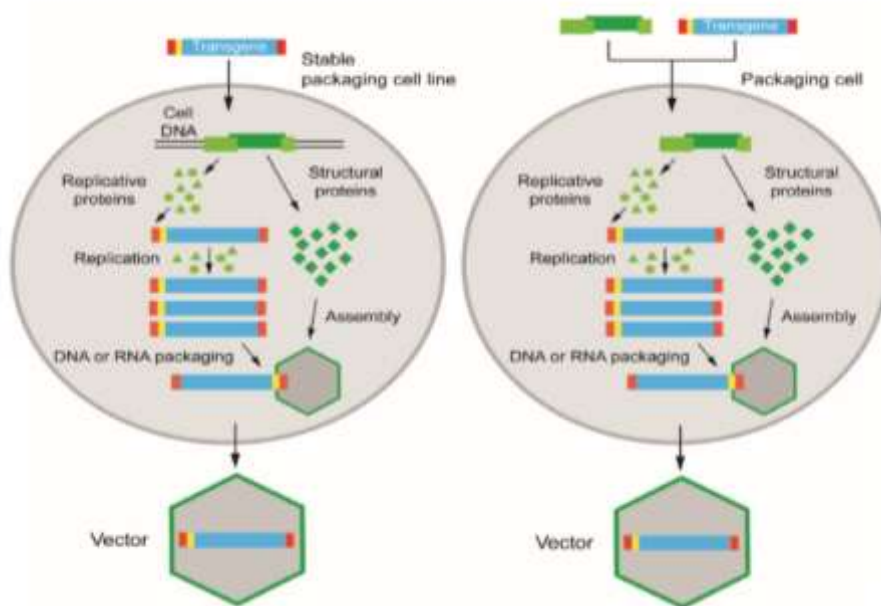


Рисунок 2. Основна стратегія конструювання вектора з дефектом реплікації із здатного до реплікації вірусу. Кодуючі послідовності вірусу (зелене) виділяють з зібраних разом некодуючих елементів, які містяться в оригінальному вірусі і здатні до реплікації (червоне), та сигнали до «упаковування» геному вірусу (жовте). Кодуючі послідовності (гени вірусу), специфічні вірусні структурні та неструктурні протеїни (темний та світлий зелений, відповідно). Вірусний ген видаляють, так як він надає здатності до реплікації після перенесення у клітину-мішень, створюючи таким чином простір для впровадження трансгенної, здатної до експресії частинки (ціан), яка складається з гетерологічних регуляторних послідовностей (тобто елементів промоції/посилення) та сигналу до поліаденілації, який примикає (межує) із новоствореною структурою (на рисунку не показано). Реплікативні неструктурні протеїни (зелені трикутнички та колечка) розпізнають «родинні» вірусні попередники, відбувається реплікація, яка дає результат в ампліфікації векторного геному (РНК або ДНК, залежно від типу вірусу); структурні протеїни (зелені квадратики) вмонтовуються у вірусні частки (Hidde A. et al., 2020)

Такі некодуючі вірусні повторювані послідовності (viral longterminal repeats - LTRs) дають сигнал для створення так званої «запакованої» лінії клітин. Вона є допоміжною, і «не пускає за межі» продукти, кодовані генами, які «стираються» з вірусу-джерела. Монтаж «структурних» ретровірусних протеїнів разом з геномними транскриптами вірусу-вектора (дві геномні копії РНК на кожен частку) формують повні зрілі частки вектора, який переносить трансгенні послідовності та, що важливо, не переносить вірусних генів. Такі частки вірусу-вектора здатні забезпечити інфікування або трансдукцію (горизонтальне перенесення генів для зміни генетичних властивостей) тільки клітин-мішеней. Потрапивши в клітини, геном ретровірусного вектора піддається зворотній транскрипції (перепишуванню генетичної інформації з РНК на ДНК) за допомогою зворотної транскриптази у дволанцюгові комплементарні копії ДНК (complementary DNA – cDNA), котрі інтегруються у хромосоми клітин-мішеней. Описані вище етапи зворотної транскрипції та хромосомної інтеграції призводять до стабілізації генетичних модифікацій клітин, яким були перенесені ген чи гени. Ретровірусні вектори (поодинокі чи в комплексі) є відповідними для використання у модифікації стовбурових клітин, тому

що інтегрований геном віруса-вектора може передаватися далі до всіх таких дочірніх клітин.

Першими клінічними мішенями для гамма-ретровірусних векторів стали первинні імунodefіцити ADA-SCID та SCID-X1, причинами яких є мутації гену аденозиндеамінази (adenosinedeaminase gene (ADA) та спільного гамма-ланцюга гена рецептора IL2RG. При генетичній модифікації Т-клітин *ex vivo* для лікування ADA-SCID відбувається модифікація клітин CD34<sup>+</sup>, які входять у популяцію гемопоетичних стовбурових клітин (hematopoietic stem cells - HSCs). Першим доказом ефективності такого генотерапевтичного протоколу лікування було застосування трансдукції клітин CD34<sup>+</sup>, виділених від пацієнтів з SCID-X1, введенням гамма-ретровірусного вектора. Ці дані були опубліковані ще на початку XXI-го століття. Йшлося про порятунок від цієї хвороби перших трьох пацієнтів з SCID-X1 на період більше як 30 місяців з відновленням роботи їх імунної системи, бо для пацієнтів, зареєстрованих у цьому дослідженні, не було знайдено підходящого за HLA-фенотипом аlogenного донора для трансплантації. У цих початкових дослідженнях терапевтичний ген був введений всередину гамма-ретровірусним вектором за участю LTRs.

У інших клінічних дослідженнях вивчали стан вірусних підсилювачів/промоторів, які могли призвести до серйозних небезпечних для життя ускладнень, (serious adverse events - SAEs) у 5-ти з 19-ти пацієнтів з SCID-X1, які були ліковані генною терапією. У деяких клітинах терапевтичний трансген IL2RG, котрого переносив гамма-ретровірусний вектор, був інтегрований не на своє місце, а у сусідній протоонкоген LMO2. Внаслідок цього відбулася активація транскрипції цього протоонкогену. Ця подія разом з мутаціями, незалежними від генної терапії (зокрема, делецією супресуючого пухлину гена CDKN2A), призвела до експансії клонів Т-клітин та до розвитку Т-клітинної лейкемії. Індукцію лейкемії спостерігали не тільки у 5-ти з 19-ти пацієнтів з SCID-X1, але також у 7-ми з 9-ти пацієнтів з іншим первинним імунodefіцитом – синдромом Віскота-Олдріча (Wiskott-Aldrich syndrome - WAS). У інших клінічних дослідженнях гамма-ретровірусні вектори використовували для лікування ще одного первинного імунodefіциту - X-зчепленої хронічної гранулематозної хвороби (chronic granulomatous disease - X-CGD). У чотирьох таких пацієнтів розвинулися SAEs, у тому числі мієлодиспластичний синдром. Проте у жодного із 42-ох пацієнтів із ADA-SCID, які були ліковані гамма-ретровірусною генною терапією, не стався лейкемогенез. Випадок плазмобластомної лімфоми у пацієнтів з ADA-SCID, які були ліковані гамма-ретровірусним вектором з геном ADA, комбінованим з ензим-замісною терапією, швидше всього був асоційований з Епштейн-Барр вірусною інфекцією, ніж з інфузіями генетично модифікованих Т-клітин. Можна зробити висновок, що при первинних імунodefіцитах SCID-X1, WAS, та X-CGD (але не при ADA-SCID), трансгенні продукти, які походять з гамма-ретровірусних векторів, призводять до трансформації клітин, тобто є небезпечними. Схильність до розвитку SAEs після застосування гамма-ретровірусних векторів можна ослабити, якщо їх інтегрувати у регуляторний регіон активного гену, тобто у місце, де стартує транскрипція.

Як знизити ризик імовірності трансформації клітин-мішеней введеними генами - так звану само-інактивацію ретро-вірусних генів (self-inactivating retroviral vectors - SIN)? При SIN само-усуваються раніше сконструйовані ретровірусні вектори, які суттєво інактивують елементи посилення/промоції трансдукованих клітин, що мінімізує генотоксичність векторів. Більше того, при SIN гетерологічний внутрішній промотор (тобто нормальний набір генів у клітині) посилює експресію трансфектованих генів. Ця генетична реконфігурація ретровірусних векторів суттєво скорочує шанси на транскрипцію протоонкогенів та обмежує ризик розвитку як SAEs, клональної експансії та розвитку лімфопроліферативних синдромів.

Необхідно пам'ятати, що генна терапія, попри всю свою спокусливість – далеко не панацея! Молодим науковцям доведеться прикласти ще немало зусиль, щоби зробити генну терапію безпечною для хворого.

### **Використана література:**

1. Жегунов Г.Ф., Жегунова Г.П. Цитологические основы жизни. — Харків: В-во Харківського державного медичного університету. – 2000. – 167 с.
2. Пішак В.П., Бажора Ю.І., Брагін Ш.Б. та ін. Медична біологія / За ред. В.П. Пішака, Ю.І. Бажори. — Вінниця, 2004
3. Путинцева Г.Й. Медична генетика. К.: Медицина. – 2008. – 391 с.
4. Gene Correction. Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 1114 Storici, Francesca (Ed.), 2014. — ISBN 978-1-62703-760-0
5. Hidde A. Zittersteijn| Manuel A.F.V. Gonçalves| Rob C. Hoeben A primer to gene therapy: progress, prospects, and problems J Inherit Metab Dis. 2020; P. 1–18. <https://doi.org/10.1002/jimd.12270>
6. Gaj T., Gersbach Ch. A., Barbas C.F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, 31(7), 397—405, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
7. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stokłosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa; W-wo naukowe PWN SA, 2015. – 498 s.
8. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stokłosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa; W-wo naukowe PWN SA, 2017. – 497 s.
9. Singleton P. (2012) Dictionary of DNA and Genome Technology, 3rd Edition, ISBN 978-1-118-44757-4

### **Тема самостійної роботи №3 «Імуногістохімічні методи в онкології. KIR в репродуктології» - 2 год. (А.М.Гаврилюк)**

#### **Короткий зміст теми заняття:**

**Імуногістохімічні методи в онкології. Імуногістохімія** або ІГХ – це аналітичний метод визначення наявності та точної локалізації клітинних і тканинних компонентів (антигенів) в гістологічних препаратах з використанням реакції антиген-антитіло. Винахідниками імуногістохімічного методу є група дослідників під керівництвом Альберта Кунса (*Albert Coons*), які в 1941 р. вперше отримали мічені флуоресцеїном антитіла та використали їх на практиці. Розробка Кохлером і Мілстейном (1975) гібридної технології стала

кардинальною подією в імуногістохімії, що дозволила отримувати високоспецифічні моноклональні антитіла у великих обсягах, та дала можливість використовувати імуногістохімію не тільки у науці, але і клінічній практиці. **Імуногістохімічний метод** є доповненням до основного гістологічного дослідження, суть якого полягає у проведенні реакції антиген-антитіло на зрізі, при цьому антитіло мічене флуорохромом або ферментом, який виявляється за допомогою кольорової гістохімічної реакції.

Імуногістохімічне дослідження можна проводити на свіжозаморожених зразках або, найчастіше, на фіксованих в формаліні та залитих у парафінові блоки тканинах. Результат можна отримати навіть з парафінових блоків, зроблених 5-10 і більше років тому. Залиту в парафіні тканину мікротом нарізає у тонкий шар (4-5 мкм), який фіксують на предметному склі для проведення подальших етапів ІГХ (прямим або непрямим методами). При прямому методі використовують лише первинні антитіла, мічені хромогенними або флуоресцентними барвниками для їх візуалізації. В основі імуногістохімічного дослідження лежить реакція між антигенами та специфічними антитілами, які зв'язуються з досліджуваними антигенами (наприклад, рецепторами до естрогену або прогестерону). Антитіла можуть бути моноклональними або поліклональними і мають здатність зв'язуватись виключно з досліджуваним антигеном - якщо він присутній в тканині. Прямий метод використовують рідко, бо отриманий сигнал буває досить слабким. Непрямий метод дозволяє посилити сигнал від комплексів антиген-антитіло за допомогою застосування додаткових реагентів, зокрема вторинних антитіл, які мають у своїй структурі ферменти (пероксидаза хрину, лужна фосфатаза), завдяки яким комплекс антиген-антитіло-вторинне антитіло може бути візуалізований при реакції з хромогенним субстратом (діамінобензидин, ВСІР тощо).

Імуногістохімічне дослідження застосовується як у науково-дослідній, так і в рутинній клінічній практиці. Даний метод широко застосовують у базовій науково-дослідній роботі для визначення антигенів білкової природи або для підтвердження результатів інших, більш точних методів дослідження білків - мас-спектрометрії, ланцюгової полімеразної реакції (ПЛР), у реальному часі. Експрес-тести, які ґрунтуються на методі ІГХ, використовують для діагностики багатьох інфекційних захворювань, зокрема малярії, ВІЛ-інфекції, грипу Н1N1. Антигеном може виступати будь-який клітинний або тканинний компонент: поверхневі рецептори клітин, гормонів, фактори росту та їхні рецептори, антигени збудників інфекційних хвороб та ін. Якщо потрібний антиген міститься в досліджуваній тканині, то сформований комплекс антиген-антитіло вкаже на його локалізацію. В практичному аспекті імуногістохімічний метод допомагає діагностувати автоімунні процеси та встановити збудники інфекційних хвороб.

В основному **імуногістохімічне дослідження (ІГХД)** використовується для діагностики злоякісних новоутворів (верифікації пухлин, виявлення первинної пухлини за анонімним метастазом, диференційної діагностики пухлин, прогнозу чутливості до таргетної терапії, оцінка гормонального статусу пухлини, імунофенотипування пухлин

кровотворної системи, визначення прогностичних факторів). Вкрай важливим цей метод зарекомендував себе щодо таких пухлин: 1) «недиференційованих», у яких під час рутинного забарвлення гематоксиліном та еозином пухлина не виявляється жодних ознак гістогенетичної належності; 2) лімфопроліферативних – на сьогоднішній день жоден діагноз лімфоми не є доведеним та обґрунтованим без цього дослідження. Після проведення імуногістохімічного дослідження первинний гістологічний діагноз може змінюватися у 20 - 40% випадків. У практичному аспекті імуногістохімічний метод дозволяє визначити гістогенез (походження) пухлинних клітин, первинне вогнище метастатичних пухлин, прогноз пухлинного захворювання, виявити резистентність і чутливість пухлинних клітин до терапії. Лише імуногістохімічні методи забезпечують специфічну візуалізацію локалізації певного антигену (в т.ч. пухлинного). Імунофенотипові ознаки малігнізації з'являються значно раніше, ніж загальноприйняті гістологічні, тому дослідження може бути використане для більш достовірного виявлення пухлинного росту та прогнозування рецидиву.

Таким чином, ІГХ активно використовують у клінічній роботі для: 1) встановлення діагнозу; 2) прогнозування ефективності терапії. Щодо діагностичної цінності, то: 1) методика ІГХ дозволяє визначити наявність або відсутність рецепторів стероїдних гормонів, а також відсоток гормонопозитивних пухлинних клітин; 2) ІГХ-дослідження дає можливість диференціювати хвороби крові, годжкінські та негоджкінські лімфоми, а також встановити: а) приналежність лімфом до Т- або В-типу; б) рівень диференціації або стадію зрілості лімфоїдної пухлини; в) стан активації або спокою лімфоїдних клітин; 3) за допомогою імуногістохімії відбувається правильна діагностика форми лімфопроліферативного захворювання, визначається дієвіша схема хіміотерапії, покращується виживання і прогноз захворювання. Прогнозування ефективності терапії за допомогою імуногістохімії відбувається таким чином: 1) дослідивши наявність прогностичних маркерів раку молочної залози, зокрема протоонкогену HER - 2/NEU (c-erbB - 2), приймається рішення щодо вибору терапії новітніми протипухлинними препаратами, що пригнічують проліферацію пухлинних клітин; 2) визначається тривалість безрецидивної ремісії у хворих із вже метастазуючим раком молочної залози; 3) за репертуаром поверхневих рецепторів на мембрані верифікується дрібноклітинна лімфома та підбирається склад препаратів, що входять до схеми лікування.

За допомогою імунохімічного методу проводять діагностику різних типів пухлин, встановлюючи наявність характерних для них маркерів чи рецепторів. Зокрема, в пухлинах молочної залози присутній ряд факторів, пов'язаних з чутливістю пухлинних клітин до того чи іншого виду лікування, з прогнозом захворювання. До таких факторів належать рецептори до прогестерону (PR), рецептори до естрогенів (ER), HER-2/NEU (визначає чутливість пухлини до трастузумабу/герцептину), Ki-67 (маркер швидкості поділу трансформованих клітин). Вказані фактори можуть бути присутні в злоякісній пухлині, однак при звичайному гістологічному вивченні матеріалу їх неможливо визначити.

Рецептори до прогестерону і естрогену - це білкові сполуки, які знаходяться на поверхні пухлинних клітин. При впливі на них жіночих статевих гормонів утворюється комплекс (рецептор - гормон), який стимулює поділ пухлинної клітини. Препарати тамоксифен і фарестон (група селективних модуляторів естрогенових рецепторів) впливають саме на ці рецептори, блокують їх і таким чином перешкоджають поділу трансформованих клітин. Експресія на пухлинних клітинах рецепторів до естрогенів і прогестерону дає кращий прогноз у порівнянні з тими, які позбавлені даних рецепторів. **За молекулярними підтипами пухлини молочної залози** поділяють на: 1) люмінальний А - рецептори до естрогенів і/або прогестерону позитивні, HER2NEU - негативний, Ki-67 менше 20%; 2) люмінальний В (HER2NEU - негативний) - HER2NEU негативний, рецептори до естрогенів або прогестерону позитивні, Ki-67 – високий; 3) люмінальний В (HER2NEU - позитивний) - HER2NEU позитивний, рецептори до естрогенів або прогестерону позитивні, Ki-67 – високий; 4) Erb-B2 гіперекспресивний (HER2NEU позитивний, рецептори до естрогенів і прогестерону негативні); 5) базальноподібний або тричі-негативний (рецептори до естрогенів і прогестерону - негативні, HER2NEU - негативний).

Наведемо приклади певних пухлинних маркерів, які найчастіше виявляються за допомогою імуногістохімічного методу. HER2NEU - це протоонкоген, який кодує рецептор II людського епідермального фактора росту пухлини *erb B-2*. Гіперекспресія HER2NEU відзначається в 25-30% випадків раку грудної залози і асоціюється з гіршим прогнозом при наявності метастазів в регіонарних лімфовузлах та визначає чутливість злоякісного новоутвору до таргетного препарату - трастузумабу (герцептину). Ki-67 - це негістоновий білок, який експресується майже у всіх фазах клітинного циклу, тому відображає розмір проліферативного пулу, його рівень є своєрідним показником швидкості поділу пухлинних клітин (оцінюється у процентах). Якщо Ki-67 становить менше 15%, пухлина вважається менш агресивною, при експресії більше 30% пухлина вважається високоагресивною. Ki-67 є також і прогностичним фактором. При високій експресії Ki-67 пухлина імовірноше буде чутлива до хіміотерапії, а при низькому рівні Ki-67 пухлина швидше відреагує (при наявності експресії рецепторів прогестерону і естрогену) на гормонотерапію.

**Нейроендокринні пухлини (НЕП)** травного тракту на сьогодні є актуальною проблемою, що зумовлено як зростанням захворюваності, так і труднощами діагностики. НЕП — це новоутворення з клітин дифузної нейроендокринної системи (APUD-системи), які у більшості випадків (до 85%) локалізуються в шлунково-кишковому тракті (ШКТ). НЕП — потенційно злоякісні пухлини, які мають здатність до глибокого інфільтративного росту, разом із тим характеризуються повільним прогресуванням. Система визначення ступеня злоякісності (Grade) полягає у встановленні кількості мітозів, відповідно, G1, G2, G3 — кількість мітозів <2, 2–20 та >20, а також ґрунтується на оцінці рівня проліферативної активності пухлинних клітин — індекс Ki-67 — <2, <20 і >20. За результатами ІГХ досліджень отримують забарвлення ядер у коричневий колір, з більш



інтенсивним забарвленням ядерця, а також чітке фарбування мітотичних фігур. У 2010 р. Grade була затверджена Американським об'єднаним комітетом з онкології (American Joint Committee on Cancer — AJCC). Визначення індексу Ki-67 вважають обов'язковим при вивченні біопсій метастазів і маленьких зразків тканин, коли немає можливості точного обчислення кількості мітозів, він є не лише показником злоякісного потенціалу пухлини, але й важливим критерієм у алгоритмі лікування хворих на НЕП ШКТ. ІГХ маркери, які використовують для діагностики НЕП, поділяють переважно на дві групи — маркери для верифікації пухлин і для визначення потенціалу злоякісності. До першої групи належать антитіла до загальних нейроендокринних маркерів, а саме синаптофізин (Syn), хромогранін А (CgA), нейронспецифічна енолаза, бомбезин (NSE) та інші. До другої групи належать: CD56 - молекула нейроадгезії, яка бере участь у міжклітинних взаємодіях; фосфопротейн p53 — продукт гена-супресора *TP53*, який локалізується на короткому плечі 17-ї хромосоми і виконує три основні функції - регуляцію клітинного циклу, індукцію апоптозу, стабілізацію геному; AMACR — цитоплазматичний ензим, який відіграє основну роль у бета-окисненні розгалужених ланцюгів жирних кислот. Встановлено кореляцію між рівнем експресії AMACR, Ki-67 і p53 та потенціалом злоякісності пухлини: НЕП G1, НЕП G2 та нейроендокринною карциномою (НЕК).

Отже, на основі цих даних можемо чітко встановити відмінності між видами НЕП:

- 1) НЕП G1 — високодиференційовані пухлини з низьким ступенем злоякісності, високою експресією хромограніну А, синаптофізину, MI <2 та проліферативною активністю (Ki-67) <20, високою експресією CD56, низькою експресією BCL-2 та p53, AMACR не експресує;
- 2) НЕП G2 — високодиференційовані пухлини із переміжним ступенем злоякісності, високою експресією хромограніну А, синаптофізину, MI 2–20 та проліферативною активністю 2–20, помірною експресією CD56, помірною експресією BCL-2 та p53, експресією AMACR >60%;
- 3) НЕК — низькодиференційовані злоякісні пухлини з високим ступенем злоякісності, слабкою експресією хромограніну А, але з експресією синаптофізину на рівні >70%, MI >20 та проліферативною активністю >20, низькою експресією CD56, високою експресією BCL-2 та p53.

Види НЕП розрізняють за: 1) експресією AMACR - більше 90%; 2) інвазією судин та нервових стовбурів; 3) наявністю некрозів; 4) вираженим ядерним поліморфізмом; 5) розміром; 6) віддаленим метастазуванням.

На сьогоднішній день набір специфічних маркерів для визначення можливих шляхів метастазування від «німих» пухлин за допомогою ІГХ- дослідження значно розширився. Органоспецифічні маркери, які вказують на локалізацію найбільш розповсюджених НЕП:

- 1) CDX2 — маркер, який свідчить про первинне кишкове походження НЕП;
- 2) PDX1 — свідчить про походження з підшлункової залози;
- 3) ISL1 — маркер походження з підшлункової залози, також виявлений при ректальних НЕП;
- 4) TTF1 — маркер легеневої локалізації, негативний при походженні зі ШКТ та підшлункової залози;
- 5) PAX8 — низькоспецифічний маркер походження з підшлункової залози, експресується також

при НЕП шлунка, дванадцятипалої кишки, апендикулярного відростка та прямої кишки; б) CD44 - інтегральний клітинний глікопротеїн, який відіграє важливу роль у міжклітинній взаємодії, клітинній адгезії та міграції, доведено, що втрата експресії CD44 може бути показником метастатичного потенціалу карциноїдних пухлин.

Імуногістохімічні методи широко використовуються для діагностики різних типів **доброякісних судинних пухлин і їх мальформацій**. Дослідження біоптатів виявляє відмінності у клінічному перебігу захворювання залежно від морфологічної картини, для їх диференційної діагностики визначають маркери Ki-67 та GLUT-1. Позитивна мембранна та часткова цитоплазматична реакція білка-транспортера глюкози GLUT-1 служить диференційною ознакою відмінності гемангіом і мальформацій, а в комплексі з Ki-67 допомагає визначити фази розвитку гемангіом.

Вищеперелічена інформація дозволяє тільки базове ознайомлення з можливостями імуногістохімічного методу лабораторного дослідження, насправді його широта його застосування вже на сьогоднішній день є значною, і дедалі зростає. Перед сучасним поколінням молодих вчених відкриваються майже безграничні можливості розвивати цей метод і адекватно застосовувати його у фундаментальній та прикладній науці.

**Рецептори KIR в репродуктології.** У процесах імунорегуляції жіночої та чоловічої фертильності беруть участь не тільки фактори набутого імунітету – найвідомішими з них є Т-лімфоцити регуляторно-супресорні, Т-лімфоцити-цитотоксичні (CD8<sup>+</sup>) та антигаметні ссантитіла, а й природженого, зокрема, клітини НК - натуральні кілери (natural killer - NK). Клітини НК є великими гранулярними лімфоцитами CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, які мають властивість без попередньої імунізації вбивати патологічно змінені аутологічні клітини-мішені, виділяючи великі кількості IFN-γ та експресуючи перфорин і гранзим В у цитолітичних гранулах. НК-клітини можуть здійснювати безпосередній цитотоксичний ефект, тобто доводити клітини-мішені до апоптозу (спонтанна цитотоксичність), та опосередкований – у присутності специфічних антитіл до антигенів на клітинах-мішенях. НК-клітини у імунній відповіді виконують дуалістичну роль. З одного боку, вони сприяють дозріванню та активації дендритних клітин, аутореактивних та цитотоксичних Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, макрофагів, поляризації Т-хелперів 1-го типу, продукції аутоантитіл, а з іншого – захищають від аутоагресії, сприяючи дозріванню Т-лімфоцитів з регуляторними функціями, інгібуючих проліферацію та активацію Т-лімфоцитів, які синтезують протизапальні цитокіни IL-5, -10, -13; TGF-β, та активуючи апоптоз Т-лімфоцитів (рисунок 1а, с. 24).

Функції НК-клітин контролюються інгібіторними та активаторними KIR-рецепторами. Зв'язування з ними може викликати сигнальні події, які призводять до перебудови цитоскелету, проліферації, секреції літичних гранул та цитокінів активованими НК-клітинами та Т-лімфоцитами. Ефект цитотоксичності у спонтанному механізмі регулюється двома протилежними сигналами: активаційним та гальмівним (інгібіторним), які передаються відповідно рецепторами, які знаходяться на поверхні цих клітин. Залежно від того, які із сигналів переважають, клітина-мішень елімінується або

зберігається. Інгібіторні рецептори часто виявляються сильнішими. Більшість інгібіторних НК-рецепторів розпізнають молекули МНС I-го класу. Експресуючи нормальні рівні молекул МНС I-го класу, здорові клітини у такий спосіб захищаються від знищення НК-клітинами. Лігандами для рецепторів НК-клітин можуть бути молекули I-го класу системи МНС, як класичні (Ia), так і некласичні (Ib). Найкраще вивченими є рецептори із надродини імуноглобулінів, які здатні зв'язуватися з лігандами молекул МНС класу I і називаються інгібіторними імуноглобулінподібними рецепторами кілерних клітин (KIR – killer cell inhibitory/immunoglobulin like receptor). KIR-рецептори класифікуються за номером позаклітинного Ig-домену (2D або 3D). Вони мають довгі цитоплазматичні домени інгібіторного /імуноглобулінподібного рецептора кілерних клітин (KIR-L – long domain of killer cell inhibitory/immunoglobulin like receptor) або короткі цитоплазматичні домени інгібіторного/імуноглобулінподібного рецептора кілерних клітин (KIR-S - short domain of killer cell inhibitory/immunoglobulin like receptor). Білки KIR на позаклітинній поверхні складаються із двох (KIR2D) або трьох (KIR3D) імуноглобуліноподібних доменів. KIR-рецептори експресуються на натуральних кілерних клітинах та деяких субпопуляціях Т-лімфоцитів, впливаючи на активацію обидвох типів клітин. Взаємодія лігандів з інгібіторними й активаторними KIR-рецепторами спричиняє формування різних сигнальних каскадів. Інгібіторні KIR-рецептори з довгим (L-long) цитоплазматичним кінцем (KIR2DL та KIR3DL) асоційовані з тирозинвмісними інгібіторними мотивами (ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Активаторні рецептори цієї родини (KIR2DS та KIR3DS) з коротким (S-short) цитоплазматичним кінцем асоційовані з гомодимером білком-адаптором 12, залученим в активацію апоптозу (DAP12 – death-adaptor protein 12), яка має тирозинвмісний активаторний мотив (ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif). При зв'язуванні ліганду інгібіторним KIR тирозин із ITIM активує фосфатазу, відбувається дефосфорилування протеїнів і запуск сигнального шляху фосфорилування, який веде до активації клітини. Існує ще і такий механізм: після зв'язування ліганду активованим KIR тирозин у ITAM (з гомодимеру DAP12) фосфорилується, що призводить до активації кіназ сигнального шляху та активації клітини. Лігандами для KIR є молекули I-го класу HLA. Усі антигени сублокусу HLA-C розпізнаються певними інгібіторними KIR-рецепторами, тоді як менше як 50% антигенів сублокусів HLA-A та HLA-B, присутніх у людській популяції, розпізнаються KIR-ами. Відрізняючись за амінокислотними залишками в позиції 80, алелі HLA-C розпадаються на дві групи, C1 (Asn80) та C2 (Lys80), які розпізнаються відповідно KIR2DL2/KIR2DL3 та KIR2DL1/KIR2DS1. Як правило, якщо інгібіторні та активаторні KIRs мають такі самі або подібні HLA-фенотипи (такі як KIR2DL1 або KIR2DS1), то зв'язування інгібіторного KIR з його лігандом має вищу афінність, ніж зв'язування активаторного KIR з тим самим лігандом. Це захищає здорові клітини. Деякі KIR-гени (KIR3DL2, KIR3DL4) названі «каркасними, корпусними генами», бо вони присутні у всіх гаплотипах. Ті, які складені з інгібіторних генів (так звані «А» гаплотипи), меншою мірою асоціюються з ризиком формування аутоімунних хвороб,

але вищим ризиком вірусних інфекцій, ніж гаплотипи («В» гаплотипи), які містять кілька активаторних генів KIR та більше активаторних рецепторів.

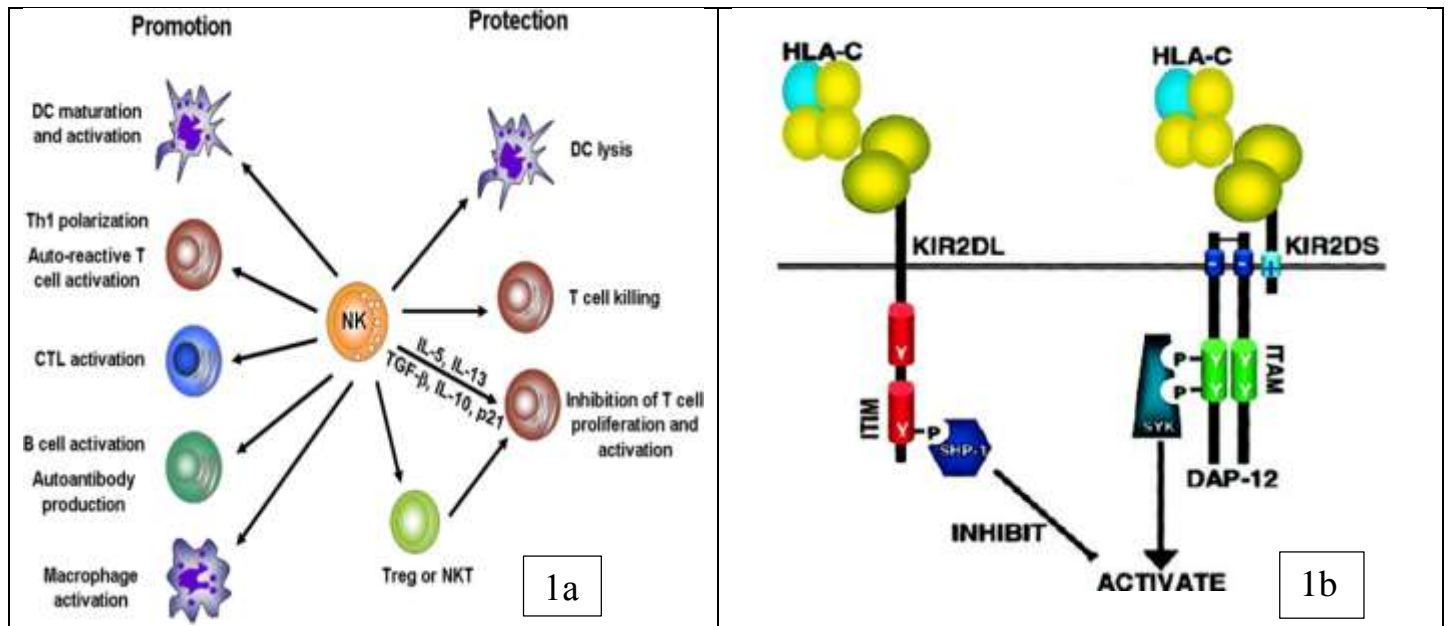
Молекули HLA-C відіграють дві важливі ролі у регуляції клітинного імунітету: 1) презентують антигенні пептиди CD8<sup>+</sup> лімфоцитам, однак ці функції їм менш властиві, ніж HLA-A та HLA-B; 2) захищають нормальні клітини тіла від атак НК-клітинами, оснащеними HLA-C-специфічними інгібіторними рецепторами (KIR2DL1, KIR2DL2 та KIR2DL3). HLA-C належать до найменш імуногенних молекул МНС і навіть не беруться до уваги при доборі трансплантату. Проте, дослідження, проведені у жінок з невиношуванням вагітності, виявили, що частота С2 групи HLA-C алелей була суттєво підвищена у чоловіків-партнерів жінок зі спонтанними викиднями, тоді як ці жінки проявляли підвищену частоту KIR-AA генотипу (який містить С2-специфічний ген KIR2DL1). Молекули HLA-C є єдиними поліморфними молекулами МНС в клітинах трофобласту. Також вони є найважливішими лігандами рецепторів KIR, які належать до рецепторів активуючих (KIR2DS) або гальмуючих (KIR2DL) кілінг клітинами НК. Гени, які кодують KIR, у людини є поліморфними і проявляються у двох гаплотипах: А та В. В гаплотипі В знаходиться більше активуючих рецепторів. При вагітності матковий фенотип KIR може бути AA, АВ чи ВВ. Так само молекули HLA-C містяться в двох головних групах: HLA-C1 та HLA-C2. HLA-C2 сильніше активують рецептори, які гальмують кілінг. Стани, які передують еклампсії, частіше розвиваються у жінок, які мають фенотип AA молекул KIR, особливо тоді, коли плід має молекули HLA-C2.

При нормальній вагітності трофобласт має безпосередній контакт з імунною системою матері – ворсинчатий трофобласт омивається кров'ю матки, а безворсинчатий трофобласт врослає в децидуум між судинами. На клітинах трофобласту немає класичних молекул МНС класів I та II, за винятком HLA-C. На цих клітинах присутні некласичні молекули МНС класу I - HLA -G та HLA-E, які не викликають активації цитотоксичних механізмів. За умов норми в першому триместрі вагітності клітини uNK становлять коло 70% всіх лейкоцитів децидууму. Вони мають на своїй поверхні димери CD94/NKG2A, які зв'язуються з HLA-E, та KIR2DL4, який зв'язує HLA-G. Клітини, які зв'язують ліганди CD94/NKG2A та KIR2DL4, підлягають активації, що проявляється передовсім синтезом цитокінів і факторів росту. Тому активація клітин uNK зв'язана не з індукцією цитотоксичності, а із збудженням процесів, які приводять до росту і міграції клітин ендотелію та збільшення припливу крові до плаценти. Патологія вагітності розвивається частіше в ситуації, коли активність клітин uNK сильніше гальмується. Ці спостереження показують, що власне активація, а не гальмування активності клітин маткових НК (uterine NK – uNK) є необхідною для правильного перебігу вагітності.

Щодо проблем з чоловічою фертильністю, то вплив KIR – рецепторів на неї відбувається опосередковано – через участь НК-клітин у регуляції автоагресії. Пацієнти, хворі на крипторхізм та варикоцеле, які визнані зараз автоімунними хворобами, мають високі рівні антиспермальних антитіл (АСАТ), які синтезуються внаслідок

патолофізіологічних змін в яєчках. Так як уже було вказано, активацію клітин при автоагресії пригнічують: KIR2DL, KIR3DL та інші, а стимулюють в основному KIR2DS та KIR3DS. Ці рецептори допомагають НК-клітинам не тільки вбивати патологічні клітини, але і попереджують їх атаку на нормальні клітини організму. У хлопчиків з крипторхізмом при наявності ACAT ген KIR-2DS5 виявлявся значно рідше. Припускають, що дефект за геном 2DS5 у хворих на крипторхізм обмежує стримуючу щодо автоагресії діяльність натуральних кілерів, що сприяє синтезу ACAT (рисунк 1b, с.24).

Рисунок 1. Дуалістична роль НК-клітин при автоімунних хворобах (1a) (Kusnierczyk P. et al., 2013), механізм дії активуючих та інгібуючих KIR-рецепторів (1b) ((Tian et al., 2012)



Загалом асоціацію генів KIR з імунопатологією вивчали не тільки у пацієток та пацієнтів з репродуктивними невдачами, але і при різних хворобах – псоріатичному артриті, atopічному дерматиті, ревматоїдному артриті (РА) і ін. Встановлене суттєве залучення НК-клітин в патогенез РА та системного васкуліту, причому наявність KIR2DS2 грає негативну роль у розвитку ускладнень при РА. Такі дослідження необхідно проводити далі, тому перед молодими вченими – імунологами, клітинними біологами та імунгенетиками – постає завдання встановити нові асоціації генів KIR з іншими імунозалежними хворобами.

### Використана література:

1. Дементьєва Н.А., Антонюк С.В., Соцко В.В. Гістологічне та імуногістохімічне дослідження в диференційній діагностиці судинних аномалій у дітей молодшого віку. Медицина транспорту України, - 2013. - №4. – С.22-27.
2. Кузик П.В., Секела М.В., О. В. Беляк О.В. Застосування імуногістохімічного дослідження у діагностиці торакальної патології. Український пульмонологічний журнал. - 2014, №1 (Додаток). - С.47-48
3. Кривешко А.С., Курик О.Г., Яковенко В.О., Баздирєв В.В. Імуногістохімічна діагностика нейроендокринних пухлин шлунково-кишкового тракту (огляд літератури та власні дослідження). Клінічна онкологія, 2016, №3(23), С.37-38
4. Роша Л.Г. Оптимізація імуногістохімічних досліджень (цикл лекцій). Одеса: в-во Одеського національного медичного університету. – 2017. – С.67-71.
5. Чопяк В.В., Потьомкіна Г.О., Гаврилюк А.М. Лекції з клінічної імунології для практичних лікарів (цикл лекцій – частина 1). Львів: в-во ЛНМУ імені Данила Галицького. – 2010. – 226 с.
6. Campbell K.S., Purdy A.K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphism, evolution, crystal structures and mutations / K.S. Campbell, A.K. Purdy // Immunology. -2011. - Vol 132. - P. 315-325.
7. Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition / E.O. Long, H.S. Kim, D. Liu [et al.] // Annu Rev Immunol. – 2013. – Vol.31. – P. 227-258.
8. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors / W. Jiang, C. Johnson, J. Jayaraman [et al.] // Genome Res. – 2012. – Vol. 22. – No 10. – P. 1845-1854.
9. Elliott J.M. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education / J.M. Elliott, W. Yokoyama // Trends Immunol. - 2008. - Vol 32. - P.364-372.
10. Extracellular domain alterations impact surface expression of stimulatory natural killer cell receptor KIR2DS5 / N.K. Steiner, S. Dakshanamurthy, C.J. VandenBussche [et al.] // Immunogenetics. - 2008. – Vol. 60. – P. 655–667.
11. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Gene Association with Cryptorchidism / Niepiekło-Miniewska W., Havrylyuk A., Chopyak V. [et al.] // Reproductive Biology. - 2015. – №15(4). - P.217-222.

**Тема самостійної роботи №5 «Алергічні хвороби: сучасні методи імунодіагностики»  
- 2 год. (С.О.Зубченко)**

**Короткий зміст теми заняття.**

**Алергія (алергічна реакція)** – результат неадекватної імунної відповіді на повторне попадання в організм певної речовини (алергену), результатом чого є пошкодження власних тканин з наступним порушенням функції органів, окремих систем чи організму в цілому.

На алергічні хвороби страждають 20-35% населення різних країн. Найбільш розповсюдженими є алергічний риніт, алергодерматит, бронхіальна астма. Згідно до прогнозів експертів ВООЗ у XXI-му столітті сформується епідемія алергії.

## **Послідовність (етапи) діагностики алергічних хвороб:**

### **1. Збір скарг та поглибленого анамнезу**

*Скарги, що мають відношення до алергії:* з боку носа: нежить, виділення, закладеність, свербіж, втрата нюху; з боку очей: свербіж, різи, слюзотеча, набряк, виділення, гіперемія; з боку органів дихання: задишка, спазм, затруднене дихання, кашель, ядуха, дистанційні хрипи, виділення харкотиння; з боку органу слуху: свербіж, закладеність, зниження гостроти слуху; з боку шкіри: свербіж, висип, набряки.

#### *Анамнез*

- ◆ встановлення алергічної природи та нозологічної форми хвороби, орієнтовна диференційна діагностика, встановлення переважного типу алергічної реакції;
- ◆ виявлення причинного алергену;
- ◆ виявлення можливої неалергічної патології та факторів, які можуть її викликати;
- ◆ виявлення спадкової схильності;
- ◆ оцінка клінічного ефекту від антиалергічного лікування;
- ◆ встановлення можливого зв'язку з підозрюваним алергеном, гострота клінічних симптомів та їх повторюваність при контакті з алергеном;
- ◆ інформація про еозинофілію;
- ◆ зв'язок хвороби з сезоном року, професійними і побутовими факторами, супутніми хворобами, харчуванням тощо;
- ◆ хвороби в дитинстві, наявність діатезу, реакцій на профілактичні щеплення, медикаменти, продукти харчування;
- ◆ профмаршрут, контакт з хатніми тваринами, птахами, акваріумними рибками тощо.

**2. Об'єктивне обстеження хворого** (огляд шкіри та слизових оболонок, пальпація, перкусія, аускультация та інші об'єктивні дослідження)

**3. Шкірне тестування з алергенами** – проводиться тільки стандартизованими алергенами; вибір шкірного тесту залежить від типу алергічної реакції (I тип – тест уколом, скарифікаційна проба та внутрішньошкірне введення алергену; IV тип – аплікаційні тести). В залежності від ступеня проникнення алергену в шкіру тести поділяються на: крапельні, аплікаційні, скарифікаційні, тест уколом (прик-тест), внутрішньошкірні.

*Абсолютні протипокази для проведення шкірних проб:* загострення алергічної хвороби, гострі інфекції чи загострення хронічних хвороб, шкірні хвороби, вагітність, туберкульоз та психічні хвороби в стадії загострення, колагенози, злоякісні новоутвори.

*Тимчасові протипокази:* приймання антигістамінних препаратів, гліюкортикостероїдів, цитостатиків.

**4. Провокаційні тести з алергенами:** введення алергену безпосередньо в шоковий

орган (назальні, інгаляційні, під'язикові, елімінаційний, лейкоцитопенічний, холодова та теплова проба).

### 5. Проведення функціональних тестів

- ◆ дослідження функції зовнішнього дихання (скринінгова – за допомогою пікфлуориметрів, поглиблена – за допомогою спірографів);
- ◆ “звукова” ринопневмометрія для рестрації провокаційних назальних проб;
- ◆ ендоскопічне дослідження порожнини носа
- ◆ рентгенографія, томографія та ультразвукове дослідження пазух носа;
- ◆ визначення порогу нюху

### 6. Лабораторні дослідження

а) неспецифічні: загальний аналіз крові і сечі, кал на яйця гельмінтів, дослідження носового секрету і харкотиння, групи крові та резус-фактору, RW, ВІЛ, рентгенограма органів грудної клітки, навколоносових пазух, виявлення дизбіозу (бактеріологічний посів калу), біохімічні дослідження (печінкові проби, ліпідний обмін), виявлення маркерів інфекційних агентів (інфекції TORCH-групи, віруси гепатитів В, С, Д) тощо;

б) специфічні: виявлення алергенів (таблиця 1) та антитіл до них класу IgE.

Найсучаснішим методом визначення імуноглобулінів класу IgE, специфічних до різних алергенів, є метод ImmunoCAP. Його основними перевагами є:

- ошадність часу та біологічного матеріалу: автоматизований режим роботи, потреба малої кількості сироватки чи плазми, можливість одночасного виконання чотирьох визначень;

- точність: метод ImmunoCAP відноситься до методів молекулярної діагностики, які розроблені на основі мікроматриць і дають можливість визначати специфічні IgE-антитіла як проти множинних рекомбінантних алергенів, так і проти їх натуральних компонентів.

Визначення специфічних IgE-антитіл є необхідне для прийняття рішення щодо застосування пацієнтові специфічної терапії алергенами (АСІТ). Шлях від діагностики до лікування складається із чотирьох етапів.

1. Первинний скринінг – шкірні проби для скринінгу алергічної хвороби

2. Остаточний діагноз – якщо шкірні алергопроби дали позитивний результат, проводимо кількісне визначення рівня специфічного IgE до відповідного алергену.

Пилок дерев		Пилок бур'янів	
Береза бородавчата	t3	Кульбаба	w8
Тополя	t14	Мар	w10
Вільха сіра	t2	Соняшник	w204
Ліщина	t4	Лобода чечевицевидна	w15
Гراب звичайний	t209	Полин	w6
		Амброзія висока	w1
Пилок трав		Епідермальні білки	



Тимоіївка лугова	g6	Хвилястий папуга, пір'я	e78
Горицвіт	g11	Кішка, лупа	e1
Рута	g3	Кролик, епітелій	e82
Овес посівний	g14	Собака, лупа	e5
Жито посівне	g12	Кліщі домашньої пилюки	
Райграс високий	g204	Dermatophagoides Pteronyssinus	d1
Овсянка лугова	g4	Dermatophagoides Farinae	d2
Лисячий хвіст луговий	g16	Отрути комах	
Мятлик луговий	g8	Бджола медоносна	i1
		Оса звичайна	i3
		Оса «паперова»	i77

Таблиця 1.

Найбільш розповсюджені алергени:

3. Відбір пацієнтів для специфічної імунотерапії алергенами. Потрібно виділити основні (мажорні) та мінорні алерген-компоненти

4. Діагностика реактивності до компонентів

Приклад:

Алгоритм прогнозу ефективності АСІТ екстрактом пилку різних бур'янів (лобода, соняшник, кульбаба, кропива, подорожник та ін.) Після визначення компонентів алергенів необхідно виключити мінорні алерген-компоненти, відповідальні за перехресні реакції: алерген g214 (g210, g212) – rPhl p 7 (Са-зв'язуючі протеїни), rPhl p 12 (профіліни)

Прогноз ефективності АСІТ	rPhl p 7, 12 “-“ (мінус)	rPhl p 7, 12 “+” (плюс)
	висока	середня/низька

в) оцінка стану імунної системи (при необхідності): дослідження рівня загального комплементу та його компонента С2 і С4, вмісту інгібітора С1q-естерази, рівня ЦІК, рівня загальних сироваткових імуноглобулінів (IgG, IgM, IgA), секреторного sIgA проводять нефелометричним методом на імунохімічному аналізаторі.

Визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів, активізаційних маркерів лімфоцитів визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів з використанням моноклональних антитіл (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD22+, CD25+ тощо), та активізаційного маркера базофілів CD63+ виконують за допомогою відповідних моноклональних антитіл методом проточної цитометрії. Визначення CD63+ (базо-тест) проводять для підтвердження активації базофілів у хворого (тобто секреції ними медіаторів – гістаміну, лейкотрієнів, цитокінів). Також модифікований базо-тест

використовують для діагностики алергічної реакції на ліки (попередньо інкубуючи базофіли із їх розчинами).

Визначення цитокінів, асоційованих із алергічними реакціями (інтерлейкінів IL-1,2,3,4, 5,6,8,10,13, інтерферону IFN- $\gamma$ , пухлинонекротизуючого фактору альфа - TNF- $\alpha$  тощо) проводять або імуноферментним методом (ELISA), або більш сучасним методом ELISPOT. Метод ELISPOT має такий же принцип реакції, як ELISA, але проводиться у супернатантах культур лімфоцитів різних популяцій, що дозволяють виявити продукцію того чи іншого цитокіну різними типами імунокомпетентних клітин даного хворого.

Такі лабораторні методи, як реакція гальмування лейкоцитів в присутності алергена, реакція бласттрансформації лімфоцитів у відповідь на стимуляцію алергеном, метод Кумбса, тест дегрануляції тканинних базофілів, тест лейкоцитолізу, тест пошкодження нейрофілів, дослідження мазків-відбитків слизової носа, очей, алергометричне титрування гістаміном, ацетилхоліном тощо є доволі старими, мають низьку діагностичну цінність і тому на сьогоднішній день рідко використовуються.

### ***Сучасний алгоритм лабораторного обстеження пацієнта із підозрою на IgE-залежний тип алергічної реакції:***

1. Визначення атопічного статусу (тотальний IgE) (метод ELISA)
2. Ідентифікація алергенів: а) шкірні тести (прік-, інтрадермальні); б) виявлення специфічного IgE у сироватці та плазмі крові різними методами (імуноферментним, радіоімуносорбентним, імунофлуоресцентним, методом ImmunoCAP тощо);
3. Визначення активації базофілів: визначення гістаміну у плазмі крові; визначення активізаційного маркера базофілів CD63+ за допомогою методу проточної цитометрії (FLOW-CAST) – базофільний активізаційний тест (BAT або базо-тест);
4. Визначення сульфідолейкотрієну (sLT) імуноферментним методом ELISA (CAST-ELISA);
5. Визначення рівня триптази у плазмі крові або сироватці методом ImmunoCAP;
6. Цитометричне визначення ступеню алергенної стимуляції методом проточної цитометрії (FAST).

**На сьогоднішній день підтвержені генетичні основи алергії.** Схильність до алергії визначається IR-генами імунної відповіді, яких налічується більше 20. Не існує єдиного гену, відповідального за алергію. Алергічні хвороби виникають при взаємодії багатьох генів. Наприклад, присутність в 5 хромосомі регіону 5q31-q33 корелює зі збільшеним рівнем Ig E, в регіоні q31.1 – з синтезом цитокінів IL-4, IL-13, IL-5, в регіоні 5q31-q33 - з схильністю до гіперчутливості. “Гени атопії” розташовані в хромосомі 11 (регіоні 11q13), хромосомі 12 (регіоні 12q14.3-q24.1), в хромосомі 16 (в регіоні 16p21). Також підтверджена імуногенетична теорія походження алергічних хвороб, яка полягає у асоціації певних HLA-антигенів з алергічними хворобами (таблиця 2).

<b>Хвороба</b>	<b>Антигени-маркери</b>
Поліноз	HLA-B7, DR2, B8, DR3 HLA-B12
Астма пилкова	HLA-B7, DR5
Астма інфекційно-алергічна	HLA-B8, DR3, B7, B12

Астматична тріада (бронхіальна астма, поліпоз, непереносимість аспірину)	HLA-B35, DR3, DQ2
Атопічна астма середньої важкості	B7, B12, DR5
Атопічна астма середньої важкості	A9, B13
Ефективність специфічної імунотерапії (СІТ) при полінозі	DR5
Відсутність ефекту СІТ	B12
Контактний дерматит	DR4, B13, DQ1, B12

Таблиця 2.

HLA-маркери деяких алергічних хвороб

Таким чином, сучасний алгоритм імунодіагностики алергічних хвороб містить у собі нові імунологічні та імуногенетичні параметри. Їх встановлення допоможе у правильній діагностиці алергічної хвороби та допоможе визначити правильний хід її лікування.

### Використана література:

1. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Гаврилюк А., Ліщук-Якимович Х., Головин Р., Толох О. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять).-Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.-207 с.
2. Chopyak V., Lishchuk-Yakymovych K., Hayevska V. Clinical immunology and allergology (The Textbook for the 5<sup>th</sup> year Students) ).-Lviv.-Publisher T.Tetiuk - 2015.-256 s.
3. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Бабаджан В., Ломіковська М., Толстяк Я. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять для студентів стоматологічного факультету).-Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.- 184 с.
4. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О.Гаврилюк А.М., Толстяк Я. Ф., Зубченко С.О. «Сучасні проблеми клінічної імунології та алергології в терапевтичній практиці». –Львів: «НеоДрук», - 2020.- 219 с.
5. Jantunen, J. Intrusion of airborne pollen through open windows and doors / J. Jantunen, K. Saarinen // *Aerobiologia*. – 2019. – Vol. 25. – P. 193–201.

## Тема самостійної роботи №6 «Автоімунні хвороби: сучасні методи імунодіагностики та імунотерапії» - 2 год. (Х.О.Ліщук-Якимович)

### Короткий зміст теми заняття:

**Автоімунні хвороби (АІХ)** - це група захворювань, в основі патогенезу яких лежить імунна відповідь на власні антигени організму (автоантигени), в результаті чого відбувається пошкодження клітин/тканин, які містять такі антигени. Автоімунні хвороби необхідно диференціювати з автоімунним синдромом, для якого характерно: нестійкий (транзиторний) патологічний процес, який перебігає з характерними лабораторними змінами: гіпергамаглобулінемія; гіперімунокомплексемія; підвищена кількість активованих лімфоцитів; гіпокомplementемія на тлі нетривалих клінічних симптомів автоагресії. Вказаний синдром завершується видужанням або розвитком автоімунної хвороби. Автоімунна хвороба відрізняється від аутоімунного синдрому наступними ознаками: наявністю аутоантитіл або сенсibilізованих Т-цитотоксичних лімфоцитів, скерованих проти власного антигену; наявністю аутоантигену, проти якого скерована імунна відповідь; можливістю створення експериментальної моделі захворювання на тваринах шляхом введення аутоантигену з наступним розвитком відповідних морфологічних порушень. *Автоантигени* поділяють на дві основні групи: 1) природні (первинні) аутоантигени – антигени “забар’єрних” органів і тканин; 2) набуті (вторинні) аутоантигени – антигени патологічних тканин, які утворюються під впливом різних факторів (інфекційні та неінфекційні аутоантигени, що утворюються внаслідок дії таких фізичних або хімічних факторів як холод, тепло, іонізуюче випромінювання, УФП, тиск, ліки, отруйні та інші хімічні речовини).

**Автоімунні хвороби поділяють на три групи:** органоспецифічні, органонеспецифічні (системні), змішані. **Органоспецифічні** - характеризуються утворенням аутоантитіл чи автоагресивних Т-ЦТЛ до антигенів одного органу. Це забар’єрні антигени, до яких в нормі існує толерантність (наприклад, тяжка міастенія, тиреоїдит Хашімото, хвороба Грейвса тощо). Органоспецифічні автоімунні захворювання розвиваються у зв’язку з пошкодженням фізіологічних бар’єрів імунологічно ізольованих органів. Це призводить до розвитку реакції імунної системи на незмінені антигени цих органів з утворенням аутоантитіл та сенсibilізованих лімфоцитів. Такими органами, до яких відсутня імунологічна толерантність, є тканина щитоподібної залози, головний мозок, яєчка, орган зору, трофобласт. В умовах патології у зазначених органах виникають морфологічні зміни, характерні для реакції гіперчутливості сповільненого типу: тканини інфільтруються лімфоцитами, паренхіматозні елементи гинуть, розвивається склероз. **Органонеспецифічні (системні)** - характеризуються утворенням аутоантитіл чи автоагресивних Т-ЦТЛ до тканин різних органів; формуються на тлі існуючої толерантності. В основі неорганоспецифічних аутоімунних захворювань лежать порушення контролю імунною системою імунологічного гомеостазу організму. Автоімунізація при цьому виникає щодо

антигенів багатьох органів та тканин, у яких виникають морфологічні зміни, характерні для реакцій як сповільненого, так і негайного типу. До цієї групи аутоімунних хвороб відносять групу ревматичних захворювань: системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, системна склеродермія, дерматоміозит та поліміозит. Залежно від провідного ефекторного механізму ця група аутоімунних хвороб поділяється: 1) захворювання, при яких у ефекторній фазі переважають клітинні механізми; 2) переважають гуморальні механізми; 3) переважають клітинно-гуморальні механізми (змішані).

Хворим з підозрою на аутоімунну хворобу **необхідно провести загальні клінічні та лабораторні імунологічні обстеження**. У хворих з аутоімунними хворобами результати лабораторних досліджень повинні характеризуватися такими змінами: 1) підвищення у сироватці рівня  $\gamma$ -глобулінів та загального IgG; 2) наявність у сироватці різних аутоантитіл та антигенів; 3) наявність у сироватці підвищеного рівня імунних комплексів та/або криоглобулінів; 4) знижений рівень загальної комплементарної активності сироватки чи певних компонентів комплекменту (в першу чергу, C3-, C4-C2-компонентів комплекменту); 5) зниження поглинальної активності фагоцитів (фагоцитарний показник), гіперактивація лізосомальних ферментів (в першу чергу, катіонних білків); 6) підвищений рівень гострофазових протеїнів (СРБ, сироваткового амілоїду А, макроглобуліну,  $\beta$ 2-мікроглобуліну); 7) підвищення показника специфічної клітинної сенсibiliзації (реакції бласттрансформації, інгібіція міграції лейкоцитів у присутності відповідного аутоантигену); 8) зміни кількості Т-хелперів та Т-регуляторно-супресорних лімфоцитів та імунорегуляторного індексу; 9) підвищення активності Т-цитотоксичних лімфоцитів, збільшення числа CD95<sup>+</sup>-лімфоцитів (маркер апоптозу); 10) підвищення числа лімфоцитів, на яких експресовані “ранні” та “пізні” активізаційні маркери; 11) типування за HLA-системою (виявлення лейкоцитарних антигенів, асоційованих з аутоімунними хворобами); 12) при гістоцитологічних дослідженнях біоптатів уражених тканин виявляють IgG та IgM-вмістні імунні комплекси.

Ключовим пунктом лабораторної діагностики аутоімунних хвороб є визначення специфічних аутоантигенів 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, віментину. У 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) тощо. При призначенні лабораторних тестів, пов'язаних з аналізом аутоантитіл, необхідно враховувати, що скринінгові тести повинні мати високу діагностичну чутливість, а підтверджуючі тести - високу діагностичну специфічність. Більшість аутоантитіл не є специфічними для одного певного захворювання, вони продукуються в різних комбінаціях. Виявлення аутоантитіл при відсутності клінічних ознак не є достатнім для постановки діагнозу АІХ. Відзначено

наростання частоти виявлення аутоантитіл у осіб похилого віку на тлі приймання лікарських засобів, при вірусних та бактерійних інфекціях, злоякісних новоутвореннях тощо. При оцінці клінічного значення аутоантитіл необхідно враховувати стійкість і вираженість їх гіперпродукції. Так, 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, однак при цьому спостерігається певний ризик розвитку уражень шкіри з підвищеною фоточутливістю. Поряд із дослідженням аутоантитіл 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.

У **терапії аутоімунних хвороб** традиційно застосовують:

- 1) протизапальна терапія (при загостренні хвороби): нестероїдні протизапальні препарати; глюкокортикостероїди; базова терапія - імуносупресивні цитотоксичні препарати (циклофосфамід, азатіоприн, метотрексат тощо);
- 2) біологічна терапія (внутрішньовенні імуноглобілини, моноклональні антитіла);
- 3) плазмаферез (плазма хворого замінюється на альбумін або свіжозаморожену плазму);
- 4) спленектомія - при лікуванні аутоімунних хвороб крові, наприклад, при тромбоцитопенічній пурпурі, тяжкій гемолітичній анемії, хронічному волосистому лейкозі);
- 5) замісна терапія - введення хворому речовини, синтез якої є пригніченим внаслідок аутоімунного пошкодження тканини (наприклад, інсуліну при цукровому діабеті 1 типу або трансплантація острівцевих клітин підшлункової залози);
- 6) метаболічний контроль застосовується при лікуванні певних органоспецифічних аутоімунних хворобах, наприклад, при гіпертиреозі (хвороба Грейвса) застосовують препарати тиреоїдних гормонів або хірургічне чи радіоізотопне (йод-131) усунення вузлів; пацієнтам із анемією аутоімунного генезу призначають вітамін В12;
- 7) антихолінестеразні препарати та тимектомія (наприклад, при лікуванні myasthenia gravis).

Залежно від тяжкості процесу застосовують імуносупресанти різної потужності. Зазвичай, імуносупресивну терапію починають з призначення нестероїдних протизапальних препаратів, глюкокортикостероїдів (ГКС: преднізолон, метилпреднізолон, дексаметазон, бетаметазон тощо), амінохінолінових засобів (делагіл, плаквеніл), фракціонованих гепаринів. У випадку агресивного перебігу аутоімунної хвороби чи неефективності попередньої терапії використовують цитостатичні препарати (метотрексат, циклофосфамід, азатіоприн, лефлуномід, циклоспорин А тощо). ГКС та цитостатичні застосовуються як перорально у відносно невеликих дозах, так і парентерально у великих дозах (пульс-терапія). ГКС виявляють виражену протизапальну дію завдяки блокаді нуклеарного фактора (NF-κB) у клітинах, задіяних в імунній відповіді, що запобігає експресії генів коstimуляційних

молекул і прозапальних цитокінів. ГКС можуть виявитися особливо корисними на початковому етапі лікування автоімунних захворювань для пригнічення занадто активного запального процесу в уражених органах. Як імуносупресанти застосовують переважно дві групи цитостатиків: алкілюючі засоби та антиметаболіти. Алкілюючі засоби (наприклад циклофосфамід) утворюють ковалентний алкілюючий зв'язок між нитками ДНК, порушуючи поділ клітин. Антиметаболітні препарати (наприклад азатіоприн, метотрексат) порушують обмін пуринових і піримідинових основ і синтез ДНК.

Заслужують уваги препарати імуноглобулінів, широкий спектр дії яких дає змогу застосовувати їх при різних патогенетичних варіантах автоагресії: цитотоксичних, імунокомплексних і клітинних аутоімунних реакціях. Нині внутрішньовенні імуноглобуліни (ВВІГ) успішно застосовують у лікуванні системного червоного вовчака, дермато- та поліміозиту, міастенії гравіс, розсіяного склерозу, аутоімунної тромбоцитопенії тощо. Основними імуносупресивними механізмами довенних імуноглобулінів є: нейтралізація антигенів (бактеріальних, вірусних; аутоантигенів, нормальних людських протеїнів тощо); нейтралізація суперантигенів (токсини золотистого стафілокока тощо); нейтралізація аутоантитіл антиідіотипічними антитілами; зниження продукції аутоантитіл шляхом блокування Fc-рецепторів на лімфоцитах; пригнічення активності прозапальних цитокінів та факторів росту, зміна властивостей Fc-рецепторів фагоцитів з посиленням кліренсу імунних комплексів; конкуренція за розпізнавання антигену CD4<sup>+</sup>-лімфоцитами з розчинними молекулами головного комплексу гістосумісності II класу (HLA-DR); пригнічення функції CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів за допомогою антитіл до молекул HLA I класу.

Перспективним методом патогенетичної терапії аутоімунних хвороб є Т-клітинна вакцинація, механізм впливу якої на аутоімунний процес включає 4 головні компоненти: 1) генерацію антиідіотипових цитотоксичних CD8<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів; 2) генерацію антиідіотипових CD4<sup>+</sup>-Т-хелперів 2-го і 3-го типів; 3) індукцію та стимуляцію функціональної активності регуляторних CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів; 4) індукцію синтезу антиідіотипових антитіл. Водночас Т-клітинна вакцинація потенційно здатна ініціювати формування імунологічної пам'яті, тобто може забезпечувати високо специфічний та тривалий вплив на аутоімунний процес. Відбувається також генетична модифікація антигенпрезентуючих клітин з метою досягнення одночасної експресії на них рецептору Fas та антигену; генетична модифікація Т-лімфоцитів з метою посилення синтезу ними ІЛ-4; щеплення плазмідом ДНК для посилення синтезу аутоантигена, наприклад, гормону інсуліну при діабеті I типу. Ці методи мають три основні недоліки: повільна дія, непередбачувана у деяких випадках результативність; висока вартість.

Встановлення важливої патогенетичної ролі певних субпопуляцій імунокомпетентних клітин і цитокінів у розвитку аутоімунопатій дало можливість застосовувати конкретні клітини та цитокіни як перспективні мішені для лікування. Основною перевагою подібного підходу, порівняно з усіма попередніми, є максимальна вибірковість впливу на імунну систему, що дає

змогу усунути одну певну ланку в патогенетичному ланцюгу, суттєво не впливаючи на клітини інших органів і систем (на відміну від призначення класичних імуносупресантів). Цей новий підхід у лікуванні автоімунних хвороб отримав назву біологічної терапії. Найбільш перспективними вважаються моноклональні антитіла (МКА): Інфліксімаб (Ремікейд®) - химерне МКА, яке складається з нейтралізуючих мишачих МКА до TNF-а; Адалімунаб та Етанерцепт (Енбрел) - нове покоління блокаторів TNF-а; Рітуксімаб (Мабтера) - застосовують при ревматоїдному артриті тяжкого і середнього ступеня тяжкості (при відсутності ефекту від застосування інгібіторів TNF-а (але не навпаки); у монотерапії і в поєднанні з метотрексатом); Анакінра (Кінерет) - МКА блокує ефект прозапального цитокіну ІЛ-1 та захищає хрящову й кісткову тканину від деструкції; Тоцилізумаб (Актемра) - рекомбінантні гуманізовані МКА до рецептора ІЛ-6; Ронталізумаб - МКА, що селективно інгібує IFN-а. Ефект від лікування МКА зберігається до 6 місяців, клінічне покращення настає через 3 тижні, максимальний ефект - протягом 16 тижнів. Застосовується терапія цитокінами з протизапальною дією (наприклад, пацієнтам із псоріазом та множинним склерозом вводять ІЛ-10, що призводить до зменшення синтезу ІЛ-12 та IFN-γ та підвищення синтезу ендогенних протизапальних цитокінів. Для гальмування міграції аутореактивних Т-лімфоцитів використовують МКА до хемокіну MIP-1α).

Ще одним перспективним методом лікування АІХ, тісно пов'язаним із генетичними та епігенетичними механізмами, вважається вплив через мікро-РНК, які регулюють і контролюють третину білок-кодуєчих генів. Мікро-РНК (miRNAs) нещодавно відкриті. Це малі, некодуєчі рибонуклеїнові кислоти, які відіграють ключову роль в експресії геному організму на посттранскрипційному рівні. Розрегульована експресія молекул miRNA виявлена при багатьох хворобах, в т. ч. автоімунних. У зв'язку з тим, що на автоімунні хвороби хворіють здебільшого жінки, обговорюється регуляція діяльності miRNAs у запальному процесі статевими гормонами, особливо естрогенами.

### **Використана література:**

1. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Гаврилюк А., Ліщук-Якимович Х., Головин Р., Толох О. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять).-Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.- 207 с.
2. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Бабаджан В., Ломіковська М., Толстяк Я. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять для студентів стоматологічного факультету).- Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.- 184 с.
3. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О.Гаврилюк А.М., Толстяк Я. Ф., Зубченко С.О. «Сучасні проблеми клінічної імунології та алергології в терапевтичній практиці». –Львів: «НеоДрук», - 2020.- 219 с.



4. Brito-Zeron P., Bootsma H., Bowman S.J. et al. Sjogren syndrome/ Nature Rev. Disease primers 2016; 2: article number 16047
5. Rosen A., Casciola-Rosen L. Autoantigens as partners in initiation and propagation of autoimmune rheumatic diseases. Annu. Rev. Immunol. 2016; 34:395-420.

## **Тема самостійної роботи №7 «Імунопроліферативні хвороби: сучасні методи імунодіагностики» - 2 год. (Г.О.Потьомкіна/А.М.Гаврилюк)**

### **Короткий зміст теми заняття:**

У клінічній практиці нерідко зустрічаються клінічні ситуації, при яких виявляється збільшення периферійних лімфовузлів (ЛВ). Збільшення розмірів ЛВ, що позначається терміном «лімфаденопатія» (ЛДП), є одним із симптомів цілої низки захворювань, різних за своєю причиною, клінічними проявами, прогнозами, методами діагностики та лікування. У зв'язку з цим у діагностичному процесі беруть участь лікарі різних спеціальностей — інфекціоністи, онкологи, гематологи, морфологи тощо. Успішне вирішення диференційно-діагностичної проблеми багато в чому залежить від конструктивної взаємодії цих фахівців та їх обізнаності щодо захворювань, які виявляються збільшенням ЛВ.

**Захворювання та патологічні процеси, що супроводжуються збільшенням ЛВ.** Основними патологічними процесами, які спричиняють збільшення ЛВ, є інфекції, пухлинні ураження (первинні або метастатичні), імунопроліферативні та дисметаболичні процеси. ЛДП інфекційного походження можуть бути зумовлені безпосереднім інфекційним ураженням ЛВ із впровадженням інфекційного агента гематогенним чи лімфогенним шляхом у тканину (туберкульоз, актиномікоз, гнійні лімфаденіти, вірусні інфекції) або реактивним запаленням у відповідь на інфекційне вогнище у відповідній зоні (пахвовий лімфаденіт при панариції чи генітальній інфекції, підщелепний лімфаденіт при ротоглотковій інфекції тощо). При одній і тій же інфекції ЛДП може носити як інфекційний, так і реактивний характер. Пухлинне ураження ЛВ буває первинним (лімфопрولیферативні пухлини) або вторинним — при лейкозі або раку (метастатичний процес). Пухлинні ЛДП становлять близько 70% усіх звернень хворих у спеціалізовані відділення з приводу збільшення ЛВ.

Коли збільшення ЛВ не пов'язане ні з інфекцією, ні з пухлинним процесом, говорять про імунопроліферативну ЛДП. При цьому в ЛВ відбувається проліферація імунокомпетентних клітин або гранульоматозне запалення внаслідок різних порушень у системі клітинного, гуморального і неспецифічного імунітету. Дисметаболичні ЛДП зумовлені проліферацією фагоцитувальних мононуклеарів у ЛВ або відкладенням амілоїду при відповідних захворюваннях.

Основна проблема диференціальної діагностики при ЛДП полягає, перш за все, у подібності клінічної картини пухлинних і непухлинних ЛДП. Лімфаденіти й реактивні гіперплазії ЛВ є важливою складовою синдрому ЛДП. За даними

дослідження непухлинні ЛДП складають 30% причин первинних звернень до гематолога з приводу збільшених ЛВ. Нозологічний діагноз встановлюється лише в 50% випадків у хворих на непухлинні ЛДП.

*I етап діагностичного пошуку — виявлення і диференціація.*

На даному етапі діагностичного пошуку слід відпрацювати навички та вміння виявляти збільшені ЛВ. При цьому важливим є вміння відрізнити збільшений ЛВ від нелімфоїдних утворень різної локалізації. До таких утворень, що являють труднощі для диференціальної діагностики, відносяться кісти шиї, фіброми, ліпоми, додаткові частки молочної залози, вузли щитоподібної залози, гідраденіт, збільшення привушних слинних залоз і нелімфоїдні вузлові утворення (панікуліт Вебера-Крісчена та ін.). До речі, нелімфоїдні об'ємні утворення в шийній і пахвовій ділянках зустрічаються майже в 5% випадків збільшення ЛВ.

*II етап діагностичного пошуку — локалізація*

Після верифікації збільшеного ЛВ, необхідно з'ясувати локалізацію й оцінити поширеність ЛДП — це може мати значення для визначення напрямку подальшого діагностичного пошуку. Так, задньошийні ЛВ зазвичай збільшуються при інфекціях волосяної частини голови, токсоплазмозі, в той час як збільшення передніх (привушних) ЛВ може пояснюватися інфекцією повік і кон'юнктивної оболонки. Часто місцеве збільшення шийних ЛВ є наслідком інфекцій верхніх дихальних шляхів, носоглотки, інфекційного мононуклеозу, однак при цьому необхідно також виключати як лімфопроліферативні пухлини (лімфогранулематоз), так і метастази в ЛВ пухлин різної локалізації (голова і шия, легені, молочна і щитоподібна залози). У той же час збільшення надключичних ЛВ практично ніколи не буває реактивним, а частіше пов'язано з лімфопроліферативними пухлинами (лімфогранулематоз) та метастатичним пухлинним процесом (пухлини шлунка, яєчників, легень, молочних залоз). Разом із поширеністю ЛДП необхідно оцінити розміри і консистенцію ЛВ. Це не є визначальними ознаками, однак може слугувати обґрунтуванням при висуненні попередньої діагностичної гіпотези (підозра на пухлинний процес при наявності щільного ЛВ розміром більше 1 см, болючість при запаленні тощо).

*III етап діагностичного пошуку — виявлення додаткових ознак.*

Важливо також врахувати наявність у хворого додаткових клінічних ознак, які виявляються при первинному огляді та проведенні рутинного лабораторно-інструментального дослідження. Одним з орієнтирів, що визначають напрямок діагностичного пошуку, може бути вік пацієнтів, оскільки ряд захворювань, які виявляються ЛДП, мають певну «вікову прихильність», наприклад: інфекційний мононуклеоз частіше зустрічається в дитячому і юнацькому віці, а хронічний лімфолейкоз — у літньому і старечому віці. Анамнестичні відомості (травма кінцівок, оперативні втручання, наявність імплантату, контакт із деякими хворими тощо) також дозволяють звужити коло діагностичного пошуку, а в ряді випадків навіть набувають вирішального значення. Варто провести ретельне клінічне обстеження пацієнта з ЛДП з метою виявлення різних додаткових симптомів, серед яких діагностично найважливішими є ураження шкіри і слизових оболонок (макульозно-папульозні висипання, геморагії, подряпини,

укуси, виразки тощо); збільшення печінки; спленомегалія; суглобовий синдром; лихоманка; респіраторна симптоматика; зміни з боку ЛОР-органів; урогенітальні симптоми. Збільшення селезінки у хворого з ЛДП може вказувати на вірусні інфекції (інфекційний мононуклеоз), гострий та хронічний лімфолейкоз, системні захворювання (системний червоний вовчак (СЧВ), хвороба Стілла у дорослих). Суглобовий синдром частіше асоціюється із системними захворюваннями (ревматоїдний артрит, СЧВ, хвороба Стілла).

#### *IV етап діагностичного пошуку — дослідження периферійної крові*

Серед рутинних лабораторних методів диференційної діагностики з ЛДП обов'язковим є дослідження показників периферійної крові: при трактуванні виявлених змін необхідно враховувати їх неоднакову специфічність. Так, стійкий абсолютний лімфоцитоз із наявністю клітин Гумпрехта є патогномонічною лабораторною ознакою хронічного лімфолейкозу, а наявність бластних клітин у крові може свідчити або про лімфобластний лейкоз, або про лейкомізацію лімфом. Такі ознаки, як нейтрофільний лейкоцитоз, лейкопенія (нейтропенія), тромбоцитопенія не є специфічними, оскільки можуть зустрічатися при ширшому колі захворювань, що супроводжуються ЛДП. Разом із загальним аналізом периферійної крові при первинному зверненні хворого з ЛДП обов'язковими дослідженнями є: рентгенологічне дослідження грудної клітки, УЗД органів черевної порожнини, імуно-серологічні дослідження (сифіліс, ВІЛ-інфекція, гепатит В і С). Методи цитологічної та гістологічної діагностики в гострій фазі захворювання малоінформативні через труднощі трактування морфологічної картини на тлі реактивної гіперплазії лімфоїдної тканини. Для остаточної верифікації природи ЛДП необхідна оцінка динаміки локального запалення і регіонарної ЛДП на тлі терапії (антибіотики, хірургічне лікування) або спонтанного зворотного розвитку. У випадках, якщо зберігається збільшення ЛВ, незважаючи на регресію місцевого запального процесу, особливо за наявності ЛВ щільної консистенції, показана біопсія ЛВ для гістологічного дослідження.

**Для лікування імунопроліферативних хвороб онкологічного генезу (В-клітинні лімфоми, Т-клітинні лейкози, пухлинні трансформації кісткового мозку тощо) застосовують трансплантацію кровотворних клітин.** Вона має основну мету – регенерацію гематопоезу. Для досягнення цієї мети часто використовують *аутологічну трансплантацію* (autoНСТ – autologous hematopoietic cell transplantation). Завчасно взяті та збережені аутологічні кровотворні клітини повертають пацієнтові після сильної хіміотерапії, яка була застосована для знищення пухлинних клітин (лімфоми або множинної мієломи), але призвела до незворотньої загибелі клітин кісткового мозку. Трансплантовані аутологічні кровотворні клітини (autoНСТ) забезпечують відновлення гематопоезу.

*Трансплантація алогенних кровотворних клітин* (alloНСТ – allogeneic hematopoietic cell transplantation) – це процедура набагато складніша, ніж autoНСТ. Вона застосовується для відновлення: 1) гематопоезу; 2) імунної системи реципієнта, хворого на гострий лейкоз або мієлодиспластичний синдром. Оскільки трансплантуються клітини імунної системи, виникає небезпека розвитку двох ускладнень: 1) реакції «Трансплантат проти господаря»

GvHD; 2) реакції «Трансплантат проти лейкозу/пухлини» GvL/GvT (graft-versus-leukemia/tumor).

Проведення autoНСТ має ряд переваг перед alloНСТ: 1) відсутність необхідності пошуку гістосумісного донора; 2) відсутність ризику реакції GvHD; 3) швидше відновлення імунної системи. Більш ніж тридцятирічний світовий досвід клінічного застосування трансплантації кісткового мозку дозволив розробити детальні покази до проведення того чи іншого виду трансплантації. Трансплантація гемопоетичних клітин кісткового мозку у 10 разів підвищує ефективність лікування онкогематологічних хвороб.

Покази до алогеної alloНСТ	Покази до аутологічної autoНСТ
Гостра нелімфобластна лейкемія (перша ремісія)	Лімфогранулематоз (друга ремісія або перша ремісія при наявності факторів ризику)
Гостра лімфобластна лейкемія (друга ремісія або перша ремісія при наявності факторів ризику)	Злоякісні неходжкінські лімфоми високого ступеня злоякісності (друга або перша ремісія при наявності факторів ризику)
Хронічна мієлолейкемія у розгорнутій стадії	Мієломна хвороба
Мієлодиспластичний синдром	Деякі солідні пухлини (нейробластоми, саркоми Юїнга, рак молочної залози, яєчок, яєчників, дрібноклітинний рак легені)
Важка апластична анемія	
Важкі вроджені комбіновані імунодефіцити	
Важкі гемоглобінопатії	
Хвороби накопичення	

Таблиця 3. Покази до аутологічної та алогенної трансплантації кровотворних клітин (Golab J. et al., 2017)

До ключових проблем alloНСТ відносяться; 1) пошуки і підбір донора; 2) кондиціонування; 3) трансплантація та регенерація; 4) відторгнення; 5) інгібіція імунітету після трансплантації. Протипоказами до трансплантації стовбурових клітин є: вік, супутні серцево-судинні хвороби, пухлини солідних органів, психічні хвороби.

### Використана література:

1. Чопяк В.В., Гаврилюк А.М., Толстяк Я.Ф., Кріль І.Й. Сучасна трансплантологія: імунодіагностика та імунотерапія. Львів: в-во «Неодрук», 2020. – 121 с.
2. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa; W-wo naukowe PWN SA, 2015. – 498 s.
3. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia (nowe wydanie). Warszawa; W-wo naukowe PWN SA, 2017. – 497 s.
4. Palucka A.K., Coussens L.M. The basis of oncoimmunology. Cell 2016; 164: 1233-1247.

## Тема самостійної роботи №8 «Імунодіагностика в трансплантології» - 2 год (А.М.Гаврилюк)

### Короткий зміст теми заняття

**Трансплантологія** - галузь медицини, яка вивчає трансплантацію органів, а також галузь медичної практики, котра здійснює трансплантацію. Для успішного здійснення трансплантації потрібно знати як фундаментальну імунологію, так і прикладну, бо роль імунологічних досліджень та правильність їх інтерпретації важко переоцінити.

Першою ключовою проблемою створення пари «донор-реципієнт» є підбір максимально подібних осіб за HLA-антигенами. Вона проводиться за трьома етапами, або кроками: 1) оцінка сумісності пари донор-реципієнт; 2) визначення імунного статусу пацієнта; 3) визначення абсолютних та відносних протипоказів до трансплантації.

Оцінка сумісності пари донор-реципієнт:

1) сумісність груп крові за системою ABO та Rh-системою - групи крові - це поверхневі молекули на еритроцитах, які можуть викликати імунну реакцію під час трансфузії;

2) типування тканин шляхом визначення HLA-антигенів. Вірогідність знайти донора, повністю сумісного за системою HLA-антигенів, складає від 1:1 000 до 1:1 000 000.

Антигени тканинної сумісності (HLA-антигени) найкраще виявляти на клітинах периферичної крові, бо на цих клітинах антигени розміщені з високою щільністю.

3) виявлення уже існуючих антитіл до HLA-антигенів донора у сироватці реципієнта. *Передіснуючі HLA-антитіла*, що утворилися в результаті гемотрансфузій, вагітностей або попередніх трансплантацій, збігаючись за специфічністю з генотипом донора, призводять до гострої і надгострої реакції відторгнення трансплантата в перші години або дні після операції. HLA-антитіла, що з'являються після трансплантації проти донорських антигенів *de novo*, запускають реакції хронічного відторгнення, погіршуючи якість функціонування трансплантата і час його життя. На всіх ядерних клітинах організму експресуються HLA-антигени 1-ого класу: HLA-A, B, C локусів. На імунокомпетентних клітинах (В-лімфоцитах), антигенпрезентуючих клітинах (макрофаги, дендритні клітини) і клітинах ендотелія судин представлені HLA-антигени 2-го класу: HLA-DRB1 (2,3,4,5), DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 локусів. У кожної людини HLA-антигени всіх локусів 1 і 2 класів експресуються попарно (кодомінантно) відповідно до гаплотипів батьків. Ступінь гістосумісності складає 5/10 (п'ять з десяти), тобто 50% (таблиця 4)

<i>Приклад реципієнта</i>	<i>гентину</i>	<i>Приклад гентину донора:</i>
HLA-A*02;24; HLA-B*07;13;		HLA-A*01;24; HLA-B*07;44;

HLA-C*08;14; HLA-DRB1*03;11; HLA-DRB1*03;06.	HLA-C*08;12; HLA-DRB1*11;15; HLA-DRB1*02;06
--	---

Таблиця 4.

Порівняння HLA-фенотипів донора та реципієнта

Існує два види передіснуючих лімфоцитотоксичних антитіл: 1) антитіла проти молекул HLA I класу (A, B, C); 2) антитіла проти молекул HLA II класу (DR, DP, DQ). Молекули (антигени) HLA I класу експресовані на всіх ядерних клітинах людського організму, в т.ч. на клітинах трансплантату. Окрім цього, трансплантат містить лімфоцити крові донора. Якщо в сироватці крові реципієнта є висока концентрація лімфоцитотоксичних антитіл проти антигенів HLA I класу, формується високий ризик розвитку надшвидкого руйнування трансплантату. Антитіла, які утворюються до молекул HLA II класу (DR, DP, DQ) – це блокуючі антитіла, які не дозволяють факторам імунної системи реципієнта розпізнати клітини трансплантату донора. Доведено, що чим більший титр цих антитіл (особливо проти антигенів сублокусу DR), тим менший ризик відторгнення трансплантату. Наявність у реципієнта передіснуючих антитіл до антигенів клітин ендотелію судин сприяють формуванню надшвидкої гострої кризи відторгнення трансплантату.

*Визначення імунного статусу пацієнта перед трансплантацією залежить від хвороби, котра викликала необхідність трансплантації.* Наявність автоантитіл при автоімунних хворобах зумовлює відторгнення трансплантату навіть при повній сумісності донора та реципієнта. Відторгнення трансплантату навіть при повній сумісності донора та реципієнта. Необхідне визначення показників імунної системи реципієнта (дослідження популяцій і субпопуляцій лімфоцитів з використанням моноклональних антитіл: CD3, CD4, CD8, CD16/56, CD19, CD25, CDHLA-DR, CD95 тощо; концентрацію цитокінів, в першу чергу ІЛ-1 та ІЛ-2 тощо). Визначення алгоритму проведення лабораторного обстеження стану імунної системи реципієнта залежить від основи хвороби, яка призвела до необхідності проведення трансплантації. Наявність автоантитіл при автоімунних хворобах зумовлює відторгнення трансплантату навіть при повній гістосумісності донора та реципієнта.

***Кризи відторгнення характеризуються такими проявами:***

1. *Загальноклінічні прояви:* гарячка (з наростанням температури тіла від субфебрильної до гіпертермічної), анорексія, головні болі, іноді помірне озноблення.
2. *Місцеві:* прогресуюча недостатність функції трансплантата (наприклад, олігоанурія – при нефротрансплантації), болі в ділянці трансплантата.
3. *Лабораторні:* лейкоцитоз із еозинофілією і збільшенням ШОЕ, показники недостатності аллографта (наприклад, наростання вмісту креатиніну і сечовини – при нефротрансплантації).
4. *Імунологічні:* важливими критеріями кризи є зростання співвідношення CD4/CD8, пригнічення функції Т-цитотоксичних лімфоцитів і виявлення

антитіл до ендотелію. Інформативними можуть бути також наступні показники:

- активація споживання комплементу;
- визначення цитотоксичної дії лімфоцитів на культуру фібробластів, використаних як клітини-мішені. Попередня інкубація лімфоцитів із сироваткою крові реципієнта зумовлює ефект підсилення цитотоксичності. Реакція позитивна у 80-90 % випадків вже за 1-2 тижні до перших клінічних проявів кризи;
- посилення реакції бласттрансформації лімфоцитів і реакції змішаних культур лімфоцитів виявляється за 3-4 дні до клінічного підтвердження кризи;
- лімфоцитотоксичний тест; найбільш результативним є визначення антитіл до В-лімфоцитів, який позитивний у 80 % випадків.
- спонтанна стимуляція лімфоцитів; завдяки простоті та швидкості постановки, реакцію застосовують як експрес-метод для підтвердження кризи відторгнення.

Дуже важливою є диференційна діагностика кризів відторгнення з іншими захворюваннями, які часто виявляються у реципієнтів органів, наприклад септичними станами. Небезпека виникнення останніх пояснюється постійним прийомом імунодепресантів, що зумовлює стан постійної керованої імуносупресії. Створюються умови, за яких можливі: 1) активація наявних персистентних інфекцій (обумовлених вірусами простого герпесу, цитомегалії, Епштейна-Барр тощо); 2) агресія з боку умовно-патогенної мікрофлори, яка населяє організм реципієнта і проявила патогенність на тлі імуносупресії; 3) агресія з боку мікроорганізмів, які потрапили в організм донора разом із трансплантатом (неідентифіковані або атипові віруси гепатитів, герпесвіруси, вірус імунодефіциту та ін.).

Спільними ознаками кризів відторгнення і септичних станів є загальні септичні симптоми, функціональна недостатність органів і систем, лейкоцитоз та ін. Лікування цих ускладнень принципово різне, причому помилково вибрана тактика терапії, як правило, завершується трагічно. Особливу небезпеку складають збудники, які можуть потрапити в організм реципієнта в післяопераційний період – у відділеннях чи палатах інтенсивної терапії. Такі мікроорганізми, крім високої патогенності, часто ще й полірезистентні до найновіших засобів етіотропної терапії (карбапенеми, монобактами, фторхініолони, флюконазоли).

### ***1. Лабораторні дослідження під час обстеження пацієнта «листа очікування»:***

- HLA-генотипування реципієнта за локусами HLA-A, B, DRB1 на низькому і високому дозволі.
- Скринінговий тест на HLA-антитіла дає змогу розділити реципієнтів «листа очікування» на сенсibilізованих і несенсibilізованих. Сенсibilізованим пацієнтам здійснюють подальше обстеження на ідентифікацію антитіл.

- Ідентифікаційні тести дають змогу визначити специфічності виявлених HLA-антитіл і розрахувати % PRA.

## **2. Обстеження пацієнта перед трансплантацією.**

- Перед проведенням операції лабораторія має інформацію про генотип реципієнта за локусами HLA-A, B, DRB1 і наявність у нього HLA-антитіл тієї чи іншої специфічності.
- Тому на першому етапі проводять HLA-генотипування донора. На підставі отриманих результатів проводять співставлення з генотипами реципієнтів «листа очікування», виділяючи тих, що підходять максимально.
- Важливо визначити генотип донора не лише за локусами HLA-A, B і DRB1, а також за HLA-C і DQA1; DQB1, а за можливості і за DP-локусом. Це дасть змогу в подальшому співставити специфічності виявлених у реципієнта HLA-антитіл з антигенами донора, і встановити неприйнятні комбінації донорських антигенів.
- На другому етапі здійснюють процедуру віртуального кроссматчу, яка полягає у співставленні HLA-антигенів донора з профілем специфічностей HLA-антитіл реципієнта.
- У разі, коли антидонорські антитіла не виявлено – віртуальний кроссматч негативний. У разі збігу специфічностей HLA-антитіл з антигенами донора віртуальний кроссматч позитивний.
- На третьому етапі може бути проведено серологічний лімфоцитотоксичний тест на сумісність (CDC). Цей вид аналізу здебільшого має суб'єктивний характер, залежить від методу детекції, виду досліджуваного зразка і визначає в основному HLA-антитіла першого класу.

## **3. Моніторинг пацієнтів після трансплантації**

- На першому етапі IgG HLA-антитіла зв'язуються з чужорідними донорськими антигенами на поверхні клітин трансплантата (збіглися за специфічністю). Далі цей комплекс взаємодіє з білками системи комплементу, запускаючи каскадний ланцюжок реакцій, що приводить до утворення пори в мембрані клітини і неминучого її лізису. Через деякий час картину комплементзалежної загибелі клітин можна побачити морфологічно. У зразку біоптата донорського органу буде видно загиблі клітини і відкладення комплементу, що свідчить про процес відторгнення.
- Біопсія, як правило, показує відтерміновану картину відторгнення, коли вже настала загибель клітин і можна бачити відкладення комплементу в тканинах. Лабораторний тест, який підтверджує наявність антидонорських HLA-антитіл дає можливість передбачити розвиток цієї реакції на ранньому етапі, коли імунна система тільки готується до атаки, а шкідлива дія антитіл ще не реалізувалася в комплементзалежну цитотоксичність. Це дає можливість заздалегідь вжити заходів, спрямованих на видалення ушкоджувальних антитіл з циркуляції.
- Однак показано, що серед пулу циркулюючих донорспецифічних HLA-антитіл не всі вони володіють комплементфіксувальною активністю.



Виявити пул комплементфіксувальних HLA-антитіл серед усіх HLA-антитіл даної специфічності дає змогу спеціальний лабораторний тест, що виконується на платформі Люмінекс до C3d-компоненту комплементу.

### ***Основні лабораторні тести на генетичну і імунологічну сумісність:***

- Визначення HLA-генотипу реципієнтів листа очікування за локусами HLA-A, -B, -DR.
- Визначення HLA-генотипу донора за локусами HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DQ.
- Визначення передіснуючих HLA-антитіл у реципієнтів “листа очікування” для виявлення HLA-сенсibiliзації і визначення показника PRA%. Встановлення прямої перехресної проби (cross-match).
- Посттрансплантаційний моніторинг реципієнта для попередження гострого і хронічного імунологічного відторгнення.

### ***Післятрансплантаційний моніторинг реципієнтів.***

Особливості посттрансплантаційного моніторингу принципово відрізняються залежно від типу трансплантації. При ауто- та ізотрансплантації приживлення трансплантата залежить майже повністю від якості проведеного хірургічного втручання – імунологічний моніторинг у таких випадках зайвий. При алло- чи ксенотрансплантації процес відторгнення наявний завжди – можна контролювати лише його вираження, продовжуючи таким чином тривалість життя трансплантата. Обов'язковими компонентами посттрансплантаційного моніторингу є контроль ефективності імуносупресивної терапії і прогнозування кризи відторгнення. Одним з найефективніших критеріїв прогнозу в посттрансплантаційному періоді є показник імунорегуляторного індексу (співвідношення Т-хелпери/Т-цитотоксичні лімфоцити). Цей показник достатньо індивідуальний і значній мірою генетично детермінований. У нормі він знаходиться у межах 1,5-3,5. При зниженому показника <1,0 різко зростає ризик розвитку інфекційних ускладнень, а у випадку збільшення >4 з'являється загроза відторгнення трансплантата або загострення аутоімунного захворювання, яке було до трансплантації. Остання причина, як правило, також призводить до відторгнення.

Успіх і ефективність розвитку трансплантації у тій чи іншій країні залежить від того, як законодавчо вирішується проблема презумпції згоди чи презумпції незгоди на вилучення донорських органів. Але на розвиток трансплантології впливають і інші фактори: повна інформованість суспільства, пропаганда медичних знань, вплив різних релігійних конфесій і т.ін. Оскільки трансплантація багатьох життєво важливих органів рятує життя, рівень розвитку цієї медичної дисципліни в країні свідчить про рівень морального розвитку суспільства.

### **Використана література:**

1. Клиническая трансплантология.- Под ред. Б.А. Константинова. - М.: Анд-Арт, 2004. – 304 с.

2. Лісовий В.М, Андон'єва Н.М. Актуальні питання трансплантації нирки / Навчальний посібник для лікарів-інтернів // Харків-2013. – 184 с.
3. Чопяк В.В., Гаврилюк А.М., Толстяк Я.Ф., Кріль І.Й. Сучасна трансплантологія: імунодіагностика та імунотерапія. Львів: в-во «НеоДрук», 2020. – 121 с.
4. Transplantation immunology: Methods and Protocols. - Published by Human Press, Editors A.Zachary, M.S.Leffells (Second Editions). - 2013.- 411 p.

**Тема самостійної роботи №9 «Сучасні біотехнології. Таргетна терапія з використанням сигнальних та ядерних клітинних систем» - 2 год.  
(А.М.Гаврилюк)**

**Короткий зміст теми заняття:**

**Таргетна терапія або молекулярно-таргетна терапія («молекулярно-прицільна») терапія** (англ. *target* «ціль, мішень») є однією з важливих різновидностей медикаментозного лікування раку (крім гормональної терапії та хіміотерапії). Таргетна терапія блокує ріст пухлинних клітин, втручаючись в механізм дії конкретних молекул, залучених у канцерогенез та ріст пухлини, а не просто пригнічує поділ всіх клітин (як традиційна хіміотерапія). Лікування таргетними препаратами набагато ефективніше від інших видів терапії онкологічних хвороб, так як вона скерована на певні молекули у самій пухлинній клітині. Препарати, які застосовують при проведенні таргетної терапії, безпосередньо блокують ріст пухлинних клітин та пригнічують утворення нових судин. Більшість таких препаратів є біофармацевтичними. Її синонімом є термін *біологічна терапія*, якщо він вживається контексті лікування онкологічних хвороб.

Часом таргетний препарат є комплексом кількох лікувальних засобів, у якому об'єднані кілька біологічних та цитотоксичних механізмів. Таргетну терапію застосовують: 1) для стабілізації злоякісного процесу та його переходу з активної фази розвитку в хронічну; 2) поєднання таргетної терапії з іншими видами лікування дозволяє знизити дозу хіміотерапевтичних препаратів або променевого навантаження; 3) з профілактичною метою для попередження рецидиву і для контролю за ростом метастазів; 4) у випадках лікування людей похилого віку або тяжкохворих, бо вона малотоксична.

**За механізмом дії препарати для таргетної терапії поділяються на:** 1) гормональні препарати; 2) індуктори апоптозу; 3) інгібітори ангиогенезу; 4) імуномодулюючі препарати. **Види таргетних препаратів:** 1) малі молекули (низкомолекулярні біологічно активні речовини); 2) моноклональні антитіла.

Найуспішнішими є таргетні методи лікування з використанням хімічних субстанцій, які націлені на якийсь генетично змінений білок або фермент,

специфічний для пухлинних клітин і не властивий здоровим клітинам господаря. Одним з найуспішніших молекулярних таргетних препаратів є Глівек (Gleevec) - інгібітор кінази, близькоспоріднений з гібридним (химерним) білком BCR-ABL. Білок BCR-ABL має такі молекулярні характеристики: 1) презентується до імунної відповіді молекулами HLA-A2; 2) має антигенний епітоп SSKALQPRV. Як утворюється химерний білок BCR-ABL? При хронічному мієлолейкозі відбувається транслокація протоонкогену ABL з 9-ої хромосоми до 22-ої, у якій він зливається з геном BCR, який кодує певний пухлинний антиген. Запускається функція матричної РНК, і в результаті цього синтезується химерний білок BCR-ABL. Дана молекула є продуктом злиття двох попередніх білків і містить унікальні епітопи, яких немає на здорових клітинах. Наявність білків – продуктів мутацій чи транслокацій - сприяє більш динамічному розвитку пухлини, але разом з тим вона краще відповідає на імунотерапію, бо внаслідок мутацій утворюються специфічні пухлинні антигени. Це дуже важливо, бо рідко які пухлини експресують специфічні пухлинні антигени. Це дуже важливо, бо імуноонкології відомо мало специфічних пухлинних антигенів, тобто характерних одному виду пухлини одного органу. Навіть якщо даний химерний пухлинний антиген не буде специфічним, це не заперечує його використання для виявлення, моніторингу чи лікування пухлини. Антитіла проти пухлинних антигенів можуть індукувати знищення пухлинних клітин з високою їх експресією, але «оминати» здорові клітини, на яких вона значно менша. Недивлячись на ряд інших показів, Глівек найефективніше працює проти цього химерного білка. Іншим прикладом молекулярно-таргетних препаратів, які пригнічують мутовані онкогени, є PLX27892, скерований проти мутантного B-Raf при меланомі. Інгібітори B-Raf вемурафеніб, дабрафеніб, LGX(818) використовують для лікування метастатичної меланоми, яка розвивається внаслідок мутації V600E онкогену B-Raf.

Загалом таргетні препарати можуть діяти і проти немутованих факторів – гормонів, цитокінів, регуляторів апоптозу, білків теплового шоку тощо, які відіграють певну роль у прогресуванні пухлинного процесу. Щодо цитокінів – це гефітініб (іресса, також відомий як ZD1839), скерований проти рецептора епідермального фактору росту (EGFR) та тирозинкінази та ерлотініб (торгова назва Tarceva), який інгібує рецептор епідермального фактора росту та володіє аналогічним механізмом дії, як гефітініб; щодо апоптозу - бортезоміб (Velcade), який є інгібітором синтезу білка в протеасомах, чим посилює апоптоз пухлинних клітин, та інгібітори антиапоптичного фактора Bcl-2 (обатоклак, навітоклак та госсіпол); щодо гормонів – це селективний модулятор рецептора естрогену тамоксіфен; щодо білків теплового шоку – це інгібітори Hsp90.

В окрему групу таргетних препаратів входять інгібітори ферментів кіназ. Це інгібітори PARP (ініпаріб, олапаріб); PI3K (перифозін); MEK (мітоген-активуючої протеїнкінази (траметініб<sup>1</sup>, MEK162), який використовується у нових схемах для лікування меланоми, часто в поєднанні з інгібіторами B-Raf. Чому таким важливим у лікуванні онкопатології є блокування кіназ різних видів? Бо ферменти цієї групи забезпечують сигнали з Т-клітинного рецептора (TCR), який

зв'язав пухлинний антиген, після чого повинне розпочатися антигенспецифічне диференціювання Т-лімфоцитів і наступні етапи, які мають призвести до продукції антитіл проти пухлинних антигенів. Зв'язування антигену і молекули МНС зовнішньоклітинною частиною ланцюгів  $\alpha$  і  $\beta$  комплексу TCR започатковує передачу сигналу всередину клітини. У цьому процесі велике значення має фосфорилування білків, однак комплекс TCR не має ферментативних властивостей. Тому участь у цьому процесі нерецепторних тирозинових кіназ, таких як кінази LCK і FYN з родини кіназ SRC-подібних (регульованих через CSK), а також кінази ZAP-70 і SYK (spleen tyrosine kinase) з родини кіназ SYK – подібних та кіназа ITK (inducible T cell kinase) з родини кіназ TEC є необхідною.

Ключове значення на ранньому етапі передачі сигналу має фосфорилування тирозинових залишків в рамках послідовності ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ці послідовності знаходяться у внутрішньоплазматичних частинах ланцюгів молекули CD3, по одному в ланцюгах  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  і три в кожному з ланцюгів  $\xi$ . Уже фосфорильовані послідовності тирозину ITAM утворюють місця, відповідні до кінази ZAP-70. Вона є необхідною для правильного дозрівання тимоцитів в тимусі та активації периферичних Т-лімфоцитів. Результатом активації тирозинових кіназ є запуск каскаду білків, відповідальних за подальшу передачу сигналу до середини клітини. Частина з них належить до так званих адапторних білків, у однаковій мірі зв'язаних з клітинною мембраною (наприклад, LAT), як і цитоплазматичних (наприклад, SLP-76). Адапторні білки, наприклад білок CBL (casitas B-lineage lymphoma), не мають ферментативних властивостей, зате діють як молекулярний з'єднувач між поверхневими рецепторами та молекулами, які беруть участь в подальшій передачі сигналу, проявляють як позитивні, так і негативні регуляторні функції щодо активації клітин. Саме тому лікування онкопатології інгібіторами кіназ різних видів має регуляторний характер і модулює імунну відповідь пацієнта щодо пухлинних антигенів.

## Використана література

1. Zhukov N. V., Tjulandin S. A. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory (англ.) // Biochemistry journal. — 2008. — May (vol. 73, № 5). — P. 605—618. — doi:10.1134/S000629790805012X. — PMID 18605984.
2. Katzel J. A., Fanucchi M. P., Li Z. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer (англ.) // J Hematol Oncol. — 2009. — January (vol. 2, № 1). — P. 2. — doi:10.1186/1756-8722-2-2. — PMID 19159467.
3. Jordan V. C. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy (англ.) // Eur. J. Cancer (англ.). — 2008. — January (vol. 44, № 1). — P. 30—38. — doi:10.1016/j.ejca.2007.11.002. — PMID 18068350.
4. Warr M. R., Shore G. C. Small-molecule Bcl-2 antagonists as targeted therapy in oncology // Curr Oncol journal. — 2008. — December (vol. 15, № 6). — P. 256—261. — PMID 19079626.

5. Li J., Zhao X., Chen L., et al. Safety and pharmacokinetics of novel selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor YN968D1 in patients with advanced malignancies (англ.) // BMC Cancer journal. — 2010. — Vol. 10. — P. 529. — doi:10.1186/1471-2407-10-529. — PMID 20923544.

**Тема самостійної роботи №10 «Сучасні підходи до підбору вакцин для імунопрофілактики імунокомпроментованих пацієнтів» - 2 год.  
(А.М.Гаврилюк)**

**Короткий зміст теми заняття**

Наміри медиків застосувати вакцинацію з профілактичною метою повинні ґрунтуватися на доброму знанні стану імунної системи пацієнта в момент вакцинації. Зрозуміло, що вакцинація чинить собливий вплив на імунну систему імунокомпроментованих пацієнтів. Призначення імуносупресивної терапії, включаючи протиревматичні препарати, синтетичні медикаменти, таргетні синтетичні та біологічні препарати, з однієї сторони, покращило контроль за хворобами та якістю життя пацієнтів з автоімунними та запальними захворюваннями, а з іншої – погіршило їх імунітет. У деяких пацієнтів зріс ризик розвитку інфекцій умовно-патогенними мікроорганізмами інфекцій, підвищилися показники захворюваності та смертності. Лікарі часто вагаються щодо того, чи слід вакцинувати цих пацієнтів через невизначеність стосовно безпеки та ефективності імунізації під час прийому імуносупресивних препаратів.

Пропонуємо опис клінічних рекомендацій щодо вакцинації дорослих, які отримують імуносупресивні препарати, та немовлят, котрі внутрішньоутробно перебували під впливом таких ліків (в III-му триместрі вагітності матері, або через грудне вигодовування. Розроблені вказівки складаються з 13 позицій. З них 10 позицій стосуються лікування дорослих з імунозалежними хворобами, які отримали первинну та вторинну імунізацію живими або інактивованими вакцинами, в тому числі і проти герпесу (таблиця 5).

	<b>Позиція</b>	<b>Рекомендація</b>	<b>Рівень доказовості</b>
1	I	Рекомендовано оцінювати стан пацієнтів, у яких нещодавно була діагностована імунозалежна хвороба. Проведення імунізації та введення вакцини, яка відповідає віку та стану цього пацієнта, до початку імуносупресивної терапії	Сильна рекомендація, середній рівень доказовості
		Інактивовані вакцини	

2	IIa	Для оптимізації встановлення імуногенності інактивованих вакцин у пацієнтів з імунозалежними хворобами рекомендоване проведення вакцинації щонайменше за 2 тижні до початку імуносупресорної терапії, якщо це можливо	Умовна рекомендація, середній рівень доказовості
3	IIb	Рекомендовано не припиняти імуносупресивну терапію для введення інактивованих вакцин пацієнтам з імунозалежними хворобами	Сильна рекомендація, середній рівень доказовості
4	IIc	Рекомендовано відкласти імунізацію до 5 місяці пацієнтам, що отримували ритуксимаб, після останньої дози та принаймні за 4 тижні до наступної дози ритуксимабу	Нагальна рекомендація, низький рівень доказовості
5	IIIa	Жива ослаблена вакцина проти герпесу Для оптимізації встановлення імуногенності живої атенуйованої вакцини проти простого герпесу в пацієнтів, що не перебувають на імуносупресивній терапії, рекомендовано проведення імунізації щонайменше за 2–4 тижні до початку імуносупресивної терапії	Умовна рекомендація, середній рівень доказовості
6	IIIb	Пацієнтам з імунодефіцитними захворюваннями, що приймають імуносупресивні препарати, рекомендовано вводити живу атенуйовану вакцину проти герпесу, альтернативою є субодична вакцина.  Рекомендовано у разі призначення живої вакцини оцінювати можливі переваги та ризики індивідуально для кожного пацієнта  Інші живі ослаблені вакцини	Сильна рекомендація, середній рівень доказовості
7	IVa	Рекомендовано враховувати тривалість віремії після імунізації живими атенуйованими вакцинами у пацієнтів, що не піддаються лікуванню, при визначенні оптимального часу для початку імуносупресивної терапії	Сильна рекомендація, дуже низький рівень доказовості
8	IVb	Рекомендовано враховувати тривалість віремії після імунізації під час визначення оптимального часу для початку імуносупресивної терапії у пацієнтів, що переривають імуносупресивну терапію	Сильна рекомендація, дуже низький рівень доказовості

9	IVc	Пацієнтам з імунодефіцитними захворюваннями рекомендоване введення живої атенуйованої вакцини, коли індивідуальні переваги перевищують можливі ризики	Умовна рекомендація, середній рівень доказовості
10	IVd	У ситуаціях, коли безпека пацієнта є найважливішою проблемою, а клінічна ситуація дозволяє — слід переривати імуносупресивну терапію до імунізації живими вакцинами	Умовна рекомендація, середній рівень доказовості
Діти <1 року, які піддаються впливу імуносупресивної терапії			
11	Va	Рекомендовано немовлятам, які піддавалися впливу імуносупресивної терапії внутрішньоутробно, протягом III-го триместру вагітності матері, вводити інактивовані вакцини відповідно до місцевого графіка імунізації	Сильна рекомендація, дуже низький рівень доказовості
12	Vb	Немовлятам, які піддавалися впливу імуносупресорів внутрішньоутробно протягом III-го триместру вагітності матері, рекомендовано вводити вакцини проти кору, паротиту та краснухи відповідно до графіка імунізації	Сильна рекомендація, низький рівень доказовості
13	Vc	Немовлятам на грудному вигодовуванні, мати яких перебуває на імуносупресивній терапії, рекомендовано невідкладне введення інактивованої та живої ослабленої вакцини згідно з місцевим графіком імунізації	Сильна рекомендація, дуже низький рівень доказовості

Таблиця 5.

Рекомендації щодо моніторингу імунокомпроментованих пацієнтів після вакцинації.

Сила рекомендацій оцінювалася згідно із системою градації якості аналізу GRADE та вважалася «сильною рекомендацією», коли бажані наслідки явно переважали небажані, «умовною рекомендацією» — коли бажані наслідки, ймовірно, переважали небажані наслідки, або «слабкою рекомендацією» — коли баланс між бажаними та небажаними наслідками був урівноваженим або невизначеним.

Таким чином, проблема застосування вакцинації з профілактичною метою на сьогоднішній день складається здебільшого із запитань, на які немає однозначних відповідей. Тому перед молодого генерацією вчених-медиків та

молодих практичних лікарів стоїть ряд викликів, які їм доведеться подолати у своїй майбутній діяльності.

### **Використана література:**

1. Хиць А. Вакцинація: рекомендації при імуносупресивних захворюваннях. Український медичний часопис. – 2019. – №4. – С.45-57.
2. Papp K.A., Haraoui B., Kumar D. et al. (2019) Vaccination Guidelines for Patients with Immune-Mediated Disorders on Immunosuppressive Therapies—Executive Summary. J. Can. Assoc. Gastroenterol., Dec, 2(4): 149–152. PMID: 31616855, doi: 10.1093/jcag/gwy069.

### **Тема самостійної роботи № 11 «Первинні та вторинні імунодефіцити: сучасні методи імунологічної діагностики» - 2 год. (Л.В.Костюченко/Г.О.Потьомкіна)**

#### **Короткий зміст теми заняття**

**Первинні імунодефіцити (ПІД)** – це група захворювань, що є результатом вроджених дефектів імунної системи, які зазвичай мають тяжкий перебіг. Основна роль у ранньому виявленні ПІД належить первинній ланці надання медичної допомоги, оскільки провідними в підозрі на ПІД є дані анамнезу та результати простих лабораторних методів, доступних кожному лікарю. Підтвердити діагноз можна при спеціальному обстеженні з використанням імунологічних, генетичних і молекулярних методів аналізу.

На сьогодні виділяють такі групи ПІД: 1) комбіновані імунодефіцити, в тому числі тяжкі комбіновані імунодефіцити; 2) комбіновані імунодефіцити із синдромальними рисами; 3) дефіцити антитілоутворення; 4) дефекти імунної регуляції; 5) дефіцити системи фагоцитозу; 6) автозапальні захворювання; 7) дефекти вродженого імунітету; 8) дефіцити системи комплементу. Загалом на сьогоднішній день описано понад 180 нозологічних форм. Найбільшу питому вагу серед усіх ПІД становлять дефіцити антитілоутворення (більше 50%).

Основним під час оцінювання пацієнта з підозрою на первинний імунодефіцит є ретельний збір анамнезу. Важливими є всі складові анамнезу: анамнез життя, детальний аналіз перенесених захворювань, сімейний, вакцинальний. Найбільш характерним клінічним проявом ПІД є підвищена чутливість до інфекцій. В анамнезі пацієнта з ПІД, як правило, є рецидивні інфекції дихальних шляхів: бронхіти, отити, синусити, повторні пневмонії з формуванням бронхоектазів, плеврити. Характерні інфекційні ураження шкіри і слизових оболонок, травного тракту. Іноді зустрічаються остеомієліт, сепсис, менінгіт, мастоїдит. У хворих з ПІД поряд з тяжкими інфекційними процесами в анамнезі можливі автоімунні і онкологічні захворювання. Важливим є факт початку клінічних проявів імунодефіциту.



Етіологію інфекцій визначають за характером імунного дефекту. Так, при дефіцитах антитілоутворення типовими є інфекції, спричинені інкапсульованими мікроорганізмами (стрептококи, в тому числі пневмокок, золотистий стафілокок, гемофільна паличка). Пацієнти з дефіцитами антитілоутворення є чутливими до деяких вірусів: ентеровіруси, аденовіруси, ротавірус, парвовірус В19. У хворих з комбінованими імунодефіцитами та Т-клітинними імунодефіцитами, збудниками, що спричинюють тяжкі процеси, є не тільки бактерії, а також віруси (віруси герпесу, цитомегаловірус, вірус Епштейна–Барр та ін.), гриби (*Candida albicans*), найпростіші (*P. carinii*). При дефектах фагоцитозу як збудники найбільш характерні стафілококи, грамнегативні бактерії, гриби – *Candida albicans*, *Aspergillus*. При дефіциті компонентів комплементу – гноерідні бактерії і бактерії роду *Neisseria*.

Оцінювання функцій імунної системи починається зі скринінгових тестів, які доступні в більшості клінічних лабораторій. Ці методи обстеження включають: загальний аналіз крові з формулою, кількісне визначення сироваткових імуноглобулінів IgM, IgA, IgG та IgE, визначення титру специфічних антитіл до вакцинальних антигенів, комплементарна активність сироватки крові за 50% гемолізом, тестування на ВІЛ.

До більш поглиблених методів оцінювання функцій імунної системи, які проводять, орієнтуючись на клініко-анамнестичні дані і результати скринінгових обстежень, належать визначення кількості популяцій (Т-, В-, НК-) та субпопуляцій лімфоцитів периферійної крові (Т-хелпери, Т-цитотоксичні, Т-регуляторно-супресорні), активаційних маркерів лімфоцитів, дослідження експресії рецепторів, зокрема, до цитокінів, концентрації цитокінів, визначення субкласів IgG, а також тести для визначення кількості фагоцитів та їх функцій. Остаточо діагноз первинного імунодефіциту встановлюють після проведення молекулярно-генетичних досліджень, які доступні лише у спеціалізованих медичних центрах в Україні та за кордоном..

Лікування первинних імунодефіцитів є непростим, так як такі пацієнти мають цілу низку супутніх захворювань і потребують надання комплексної медичної допомоги, в тому числі лікування і профілактику інфекцій, аутоімунних та інших хронічних запальних захворювань, онкопатології. Основними лікувальними напрямками є: 1) замісна терапія – при дефіцитах антитілоутворення довшими імуноглобулінами або імуноглобулінами для підшкірного введення; при дефіциті рецептора до ІЛ-12 - інтерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ); при тяжких вроджених нейтропеніях - гранулоцитарний колоніестимулюючий фактор (G-CSF) тощо; 2) генна терапія - при всіх захворюваннях з відомим моногенним дефектом, зокрема в лікуванні дефіциту аденозиндезамінази та тяжкого комбінованого імунодефіциту, зчепленого з Х-хромосомою; 3) аллогенна трансплантація стовбурових клітин кісткового мозку - при лікуванні вроджених комбінованих імунодефіцитів. Хворим з комбінованими формами ПІД рекомендованим є профілактичний прийом антибактеріальних та інших протиінфекційних середників, безперервно пожиттєво або перерваними курсами; тривала профілактика опортуністичних інфекцій (котримоксазол – профілактика кандидозу, герпес-вірусних інфекцій).

**Набуті (вторинні) імунодефіцити (ВІД/НІД)** — це стійкі зміни в роботі імунних механізмів, які обумовлені тривалим патологічним впливом на імунну систему природних чи соціальних факторів, що потребують медикаментозної корекції. Лікування може бути спрямоване як на корекцію розладів імунної системи, так і на усунення причин, які їх зумовили.

**Діагностика ВІД/НІД ґрунтується на** анамнестичних даних, інфекційних, клінічних та лабораторних ознак імунодефіциту.

1. *Дані анамнезу:* тяжкі реакції на вакцинацію, наявність у родичів ендокринопатій, алергічних, аутоімунних хвороб, злоякісних пухлин, туберкульозу, ВІЛ-інфекції/СНІДу; реакція на гемотранфузію компонентів та препаратів крові; часті інфекції (особливо опортуністичні); оперативні втручання; наявність тривалого лікування тощо.
2. *Інфекційні клінічні ознаки:* підвищена частота (6 разів і більше – для дорослих, 8 разів і більше для дітей протягом року) *неускладнених* інфекційних захворювань; частий (2 рази і більше протягом року) розвиток ускладнених гострих запальних захворювань; часті (4-6 рази і більше протягом року) загострення хронічних хвороб; активація латентних інфекцій; змішані форми інфекцій (бактерійно-вірусно-грибкові); системні мікози; розвиток гнійних процесів шкіри та/або внутрішніх органів; розвиток остеомієліту, менінгіту, сепсису, перитоніту (2 випадки і більше протягом життя); резистентність до стандартних схем етіотропної та патогенетичної терапії.
3. *Клінічні імунологічні ознаки імунодефіциту:* тривала гіпертермія чи гіпотермія (більше 1 місяця); регіональна (4 місяці і більше) чи системна лімфаденопатія; хронічні лімфаденіти; гіперплазія, гіпоплазія, аплазія мигдаликів; спленомегалія, гіпоспленія чи аспленія; тривала гепатомегалія, непов'язана з токсичними факторами та гепатотропними вірусами (більше 1 місяця); синдром кріопатії; синдром хронічної втоми; відсутність шкірної реакції на введення стандартних інфекційних антигенів (туберкулін тощо); загострення інфекційних захворювань чи формування аутоімунних ускладнень після щеплення; неможливість визначення групи крові через відсутність ізогмаглютинінів. *Інші клінічні синдроми імунодефіциту:* тривала діарея (більше 1 місяця); синдром мальабсорбції; атралгії; артрити; міалгії; дерматоміозит; склеродермія; вовчакоподібний синдром; прояви алергічного/атопічного дерматиту; гіпо- чи гіперпігментація шкіри, вітіліго; велика кількість неvusів та кавернозних гемангіом; вогнищева алопеція; аутоімунні ендокринопатії; швидка зміна ваги (зменшення чи збільшення ваги більше, ніж на 5 кілограмів протягом останнього місяця); тривала регенерація ран; вади розвитку внутрішніх органів (серця, нирок тощо); формування онкологічних хвороб, особливо в ранньому та молодшому дитячому віці; ознаки передчасного старіння; вікове відставання в рості; неврологічні порушення: прогресуюча ментальна недостатність, ізольована мікроцефалія, прогресуюча атаксія; дефекти розвитку скелету.

4. *Лабораторні ознаки імунодефіциту:* а) тривалі зміни показників клітин крові та загальних гуморальних імунологічних показників (більше 1 місяця): лейкопенія, лімфопенія, лімфоцитоз, нейтропенія, моноцитоз, гемолітична анемія, апластична анемія, еозинофілія/еозінопенія, тромбоцитопенія, гіпогамаглобулінемія, зниження рівня IgG, IgM, IgA, підвищення рівня IgE, IgM; б) низький титр або відсутні захисні специфічні післявакцинальні антитіла через 3-4 тижні після проведеної вакцинації.

Принципово важливим є правильне розуміння того, що дефіцит може стосуватися не тільки кількості якихось певних імунних факторів, але і їх функції. Так, внаслідок дефіциту супресорної функції імунних клітин та білків розвивається автоімунний синдром, внаслідок дефіциту функції цитотоксичних клітин – онкозалежний синдром і т.д. Функціональні імунодефіцити набагато тяжче виявляються і лікуються, бо у такому випадку перед фахівцем клінічним імунологом стоїть завдання відновити нормальну регуляцію імунної відповіді.

### **Використана література:**

1. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Гаврилюк А., Ліщук-Якимович Х., Головин Р., Толох О. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять).-Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.- 207 с.
2. Чоп'як В., Потьомкіна Г., Бабаджан В., Ломіковська М., Толстяк Я. Клінічна імунологія та алергологія (посібник для проведення практичних занять для студентів стоматологічного факультету).- Львів.-Видавець Тетюк Т.В.-2015.- 184 с.
3. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О.Гаврилюк А.М., Толстяк Я. Ф., Зубченко С.О. «Сучасні проблеми клінічної імунології та алергології в терапевтичній практиці». –Львів: «НеоДрук», - 2020.- 219 с.
4. Picard C. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. J Clin Immunol 2015; 35: 696-726