

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

Т.С. Угольник, С.А. Шут

Антигены системы HLA: структура и функции

Методические рекомендации

Утверждено Научно-методическим советом института
в качестве методических рекомендаций, протокол № 5 от 01.06.01

Гомель 2001

УДК 616.98-07
ББК54.132+55.14

Рецензент: кандидат биологических наук Острейко Н.Н.

Угольник Т.С., Шут С.А.

Антигены системы HLA: структура и функции / Методические рекомендации /
Т.С.Угольник, С.А.Шут. – Гомель: ГоГМИ, 2001. – 37 с.

ISBN

Методические рекомендации предназначены для студентов 3 - 6 курсов лечебно-профилактического факультета медицинского института.

УДК 616.98-07
ББК54.132+55.14

ISBN

© Коллектив авторов, 2001
© Гомельский государственный
медицинский институт, 2001

В конце XIX – начале XX веков началось бурное развитие иммунологии. И одним из наиболее ярких открытий в этой области является установление феномена «генетики иммунного ответа».

Среди основоположников этого научного направления следует назвать Карла Ландштейнера, который в начале XX века ввел в науку понятия об антигенах, антисыворотках, естественных антителах, серологической специфичности, гаптенах и носителях. Им положено начало учению об изоантигенах тканей и крови.

Следующей вехой развития иммуногенетики считаются 30-е годы, когда работами П.Горера было постулировано существование локусов генов тканевой совместимости мышей. Было установлено, что экспериментальные животные различных чистых линий развивают различный уровень иммунного ответа на введение одного и того же антигена.

В 50-е годы работами группы Ж.Доссе (J.Dausset) были разработаны методы агглютинации лейкоцитов и установлено наличие лейкоцитарных антигенов, что привело к формированию представлений об HLA комплексе.

Работы Ван Руда (J.van Rood), П. Терасаки (P.Terasaki) и К.Хиршхорна (K. Hirschhorn) в 60-е годы показали значимость HLA системы для трансплантации органов и тканей.

В 1965 году впервые постулировано наличие аллельного полиморфизма генов HLA комплекса. В 1967 году был сформирован Номенклатурный комитет ВОЗ, который регистрирует новые аллели HLA-генов и утверждает их новую и единую для всех лабораторий иммуногенетики и центров трансплантации номенклатуру.

В 1974 году группой Ван Сомерена (van Someren) HLA комплекс локализован на коротком плече 6 хромосомы человека.

В 1980 году произведено первое клонирование HLA генов (Plotgh H.L., Orr H.T., Strominger J.L.)

Многочисленными экспериментами показано, что в организме не существует «общей» иммунологической реактивности, и что на каждое антигенное воздействие формируется специфический иммунный ответ, который протекает независимо от интенсивности иммунного ответа на другой антиген. Это означает, что в одно время может протекать неограниченное количество строго специфичных иммунных ответов.

В иммунной системе человека постоянно происходит скрининг стабильности антигенного состава тканей, постоянно протекают процессы распознавания своего и чужеродного, а также процессы элиминации чужеродных антигенов.

Структуру антигенсвязывающих сайтов кодируют гены главного комплекса гистосовместимости HLA.

В экспериментальных исследованиях на чистопородных животных был доказан генетический характер интенсивности иммунного ответа и локализован участок генов на соответствующей хромосоме, ответственный за наследование этого признака.

Было доказано, что HLA молекулы играют центральную роль в иммунном ответе, определяя выраженность реакции иммунной системы индивида на каждое антигенное воздействие. Этот факт дал второе функциональное наименование главному комплексу генов гистосовместимости - гены иммунного ответа. Свой эффект эти гены реализуют в ходе межклеточных взаимодействий путем формирования макромолекулярного комплекса из распознаваемых антигенов, собственно HLA молекул и T-клеточного рецептора.

В настоящее время для координации исследований в этой области существуют постоянно действующие международные Рабочие совещания и конференции (Histocompatibility Workshops).

В рамках международных программ ведущие лаборатории иммуногенетики в различных странах проводят исследования по многим направлениям, среди которых можно назвать:

1. Исследование роли HLA-молекул в процессах антигенного распознавания и формирования специфического иммунного ответа на

растворимые и мембранноассоциированные антигены. Генетика иммунного ответа.

2. Исследование роли HLA-антигенов в процессах позитивной и негативной селекции клеток иммунной системы. Молекулярная иммунология.
3. Исследование генного и аллельного полиморфизма HLA-комплекса. Молекулярная иммуногенетика.
4. Исследование этнических различий в характере распределения аллельных вариантов генов HLA-комплекса. Антропологическая иммуногенетика.
5. Исследование ассоциированности HLA-антигенов с болезнями и разработка иммуногенетических методов раннего диагноза и прогноза заболеваний человека. HLA и болезни.
6. Разработка новых методов анализа структуры генов и молекул HLA-комплекса. Молекулярная иммуногенетика.
7. Совершенствование методологии подбора аллогенных органов и тканей для трансплантации, методов мониторинга за состоянием пересаженного органа и способов преодоления трансплантационного барьера. Трансплантационная иммуногенетика.
8. Использование иммуногенетических методов для идентификации личности и установления отцовства. Судебная медицина.

9. Исследование полуаллогенных взаимоотношений иммунной системы матери и плода и преодоление иммуногенетических причин бесплодных браков. Иммуногенетика репродукции.
10. Исследование последствий экологически неблагоприятных факторов на динамику характера распределения HLA-антигенов в популяции. Экологическая иммуногенетика.

Строение и функции HLA-генов и HLA-молекул

Генетическая система, ответственная за развитие специфического иммунного ответа, представляет собой комплекс генов, кодирующих отдельные цепи димерных гликопротеинов, основной функцией которых является антигенное распознавание и межклеточное взаимодействие. Она получила общее наименование для всех видов млекопитающих – «главный комплекс гистосовместимости» (ГКГС) или МНС в английской транскрипции. У человека этот комплекс генов получил наименование HLA от английского Human Leukocytes Antigens.

Он занимает на коротком плече 6 аутосомной хромосомы расстояние около 4000 kb и состоит из трех групп генов I, II и III классов, кодирующих структуру охарактеризованных генов, псевдогенов и генов с неизвестной функцией.

К классу I отнесены гены локусов A, B и C, содержащих 8 экзонов, кодирующие 3 экстрацеллюлярных домена, трансмембранный и цитоплазматические участки соответствующих HLA-молекул, широко представленных на поверхностной мембране соматических клеток принимающих участие в реализации цитотоксических реакций клеток иммунной системы.

HLA-молекулы I класса состоят из α - и β -цепей. α цепь состоит из трех доменов, два из которых $\alpha 1$ и $\alpha 2$ образуют дистальную часть молекулы, а проксимальная ее часть формируется третьим доменом тяжелой цепи $\alpha 3$ и $\beta 2$ -микроглобулином. Конформация антигенсвязывающего участка представляет собой антипараллельные β -складчатые структуры, переходящие в α -спирали. Последние состоят, приблизительно, из 35 аминокислот. Оба домена $\alpha 1$ и $\alpha 2$ взаимно расположены таким образом, что по четыре β -складки каждого из них вместе образуют платформу из восьми полос, а α -спирали того и другого домена находятся друг от друга на некотором расстоянии. В результате этого образуется углубление или так называемая «бороздка», ограниченная с обеих сторон α -спиралями. Последние имеют форму арок, т.к. они удаляются друг от друга в центре бороздки и сближаются у ее концов с обеих сторон. Бороздка служит для размещения антигена, образовавшегося

в результате процессинга антигенпредставляющими клетками, с которым связываются HLA-молекулы I класса.

Процессированный антиген представляет собой наномер, имеющий развернутую структуру. Боковые его цепи взаимодействуют только с молекулой HLA, другие его цепи могут взаимодействовать и с молекулой HLA и с T-клеточным рецептором, а третьи обращены только в сторону T-клеточного рецептора. Кристаллографическое изображение комплексов HLA + олигопептид свидетельствует о том, что боковые цепи антигена принимают участие в образовании его определенной конформационной структуры, пространственно соответствующей бороздке в HLA-молекуле.

После трансляции на рибосомах тяжелая α -цепь HLA-молекулы и β_2 -микроглобулин, являющийся ее легкой цепью, поступают в эндоплазматический ретикулум клетки, где происходит их объединение в гетеродимер. Образовавшийся комплекс поступает в аппарат Гольджи, в котором происходит гликозилирование цепей HLA-молекул.

Антиген, поступающий в клетку подвергается деградации в цитоплазматическом протеолитическом комплексе до фрагментов длиной около 9 аминокислотных остатков, а затем транспортируется белками переносчиками в эндоплазматический ретикулум. Там он связывается с HLA молекулами I класса, обеспечивая стабильность их димерной формы.

После этого комплекс HLA молекулы I класса в комплексе с антигеном перемещается к клеточной поверхности, встраивается в клеточную мембрану макрофага, где и взаимодействует с Т-клеточным рецептором CD8-позитивного лимфоцита с цитотоксической функцией.

Ко II классу относятся гены локусов HLA-DR, -DQ и -DP, также кодирующие α - и β -цепи молекул, из которых наиболее полиморфна β -цепь. HLA-молекулы II класса являются мембранными гликопротеинами и также состоят из нековалентно связанных тяжелой α -цепи и легкой β -цепи. Каждая из них образует по два экстрацеллюлярных домена $\alpha 1$, $\alpha 2$, и $\beta 1$, $\beta 2$. В формировании антигенсвязывающего участка HLA-молекул II класса принимают участие дистальные домены, принадлежащие к тяжелой $\alpha 1$ и легкой $\beta 1$ цепям. Антигенсвязывающий участок представлен в виде β -складчатого основания, на котором распложены две α -спирали, расположенные в противоположных направлениях. Достаточно большое расстояние между концами обеих α -спиралей допускает размещение в бороздке больших олигопептидов длиной от 10 до 20 аминокислотных остатков.

Синтезированные α - и β -цепи объединяются в эндоплазматическом ретикулуме с инвариантной цепью, представляющей собой гликопротеид с трансмембранным доменом и сигнальным N-концевым цитоплазматическим участком. Внутри клетки эти тримеры объединяются

до мультимера, состоящего из трех тримеров. После гликозилирования тримеры транспортируются в эндосомальный отдел, где происходит процессинг экзогенного антигена и связывание его с α - и β -цепями HLA-молекул II класса.

Молекулярные продукты генов II класса играют ключевую роль в процессах распознавания антигенов, участвуя в формировании макромолекулярного комплекса, включающего в себя собственно HLA-молекулы класса II, процессированный антиген, α - и β -цепи молекулы T-клеточного рецептора, CD4-детерминанту и молекулы межклеточной адгезии. Взаимодействие CD4 на мембране T-лимфоцита с HLA-молекулами на мембране антигенпредставляющей клетки приводит к активации тирозинкиназы и последующему фосфорилированию ϵ -цепей T-клеточного рецептора, приводящему к клеточной активации.

HLA-молекулы I и II класса, участвующие в формировании этого тримолекулярного комплекса, обладают сходной третичной структурой и имеют два участка связывания и для пептида, обращенного внутрь антигенсвязывающего участка, и для T-клеточного рецептора, расположенного снаружи.

Практически все CD4 позитивные T-клетки снабжены HLA-молекулами II класса, а все CD8 позитивные клетки – HLA-молекулами I класса.

К III классу отнесены гены C4, кодирующие 4 компонента комплемента; сходный по функции ген Bf; гены RING, участвующие в контроле синтеза белков; гены LMP, кодирующие протосомные элементы, функции которых заключаются в установлении длины и специфичности чужеродных антигенов в ходе внутриклеточного процессинга; гены TAP, кодирующие структуры белков транспортеров, участвующих во внутриклеточном процессинге антигенов, связавшихся в цитозоле с молекулами HLA I класса; гены CYP, контролирующие активность ферментов цитохрома P450; гены белков теплового шока HSP 70, участвующих во внутриклеточном транспорте и представлении антигенов; гены TNF фактора некроза опухолей; BAT гены И-ассоциированные транскриптеры и ряд других генов, кодирующих белки с важнейшими биологическими функциями.

HLA-молекулы участвуют в процессах позитивной и негативной внутритимической селекции, приводящих к выходу из тимуса зрелых T-клеток с различной аффинностью к собственным молекулам гистосовместимости. По этим механизмам в тимусе элиминируются аутореактивные клеточные клоны и допускаются на периферию клетки, не способные взаимодействовать с собственными HLA-молекулами. Нарушения этих процессов могут являться одним из важнейших факторов развития аутоиммунных заболеваний.

HLA-молекулы на поверхности клеток иммунной системы принимают участие в реализации их функций. Как и другие поверхностные гликопротеины лимфоцитов, тесно ассоциированные с клеточной мембраной, они обладают рецепторными свойствами.

Экспрессия HLA-молекул на поверхности клеток иммунной системы является сложным динамическим процессом, от которого во многом зависит их функциональная активность. Эти макромолекулы постоянно перемещаются в плоскости поверхностной мембраны, собираясь в агрегаты и вновь возвращаясь в диффузное распределение. Они секретируются во внеклеточную среду и вновь встраиваются в клеточную мембрану. Комплекс таких молекулярных механизмов может быть объединен понятием биогенеза HLA молекул на поверхности клеток иммунной системы. Эти сложные организованные в околочасовые биоритмы процессы влияют на способность макромолекул образовывать макромолекулярные комплексы, обеспечивающие процессы антигенного распознавания, межклеточной кооперации, активации функций специализированных субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

На ключевой момент формирования иммунного ответа оказывают влияние два основных механизма: структура макромолекулярного комплекса, включающего в себя CD, T-клеточный рецептор, презентруемый фрагмент антигена, CD4/CD8 молекулы, CD3 рецептор,

молекулы клеточной адгезии, и процессы биогенеза этого комплекса на клеточной мембране. Представляется, что сочетание условий функционирования этих молекулярных механизмов во многом определяет силу иммунного ответа индивида на конкретный антиген и именно они лежат в основе феномена генетики иммунного ответа. Баланс этих механизмов вероятно определяет соотношение специфического и неспецифического в функционировании иммунной системы, когда комплементарность антигенсвязывающего сайта в бороздке экстрацеллюлярного домена HLA молекулы с процессированным фрагментом антигенного пептида определяет эффективность процессов специфического распознавания, а процессы биогенеза поверхностного молекулярного комплекса, связанного с клеточной активностью, оказывают заметное неспецифическое воздействие на интенсивность процессов формирования иммунного ответа. В свою очередь процессы активации многочисленных и специализированных субпопуляций клеток иммунной системы находятся под контролем цитокиновой сети клеточной регуляции.

Эта ключевая регуляторная цепь участвует в реализации процессов воспаления, гемопоэза и иммунного ответа.

На первой фазе воспаления секретируется комплекс провоспалительных цитокинов интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL6),

фактор некроза опухолей- α (TNF- α), интерферон- γ (INF- γ) и др., которые попадая в печень, приводят к синтезу гепатоцитами белков острой фазы: С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, С3-компонента комплемента, гаптоглобина, α 1-гликопротеина, фибриногена, α 2-макроглобулина и т.п.; попадая в гипоталамический отдел головного мозга приводят к повышению температуры тела и выработке аденокортикотропного гормона (АКТГ), который в свою очередь способствует продукции надпочечниками кортикостероидов. На второй фазе воспаления эти цитокины способствуют мембранной экспрессии молекул адгезии на лейкоцитах и эндотелиальных клетках, усиливая их взаимодействие. На третьей фазе воспаления происходит продукция хемокинов и активация интегринов, связывающих соответствующие лиганды ICAM и VCAM. В свою очередь хемокины класса С-С являются общими хемоаттрактантами для моноцитов, CD4-позитивных клеток памяти и эозинофилов. К ним относятся макрофагальные белки воспаления MIP-1 α и MIP-1 β , моноцитарные хемотаксические протеины MCP-1, MCP-2, MCP-3 и MCP-4, факторы ингибиции предшественников меланоидных клеток MIP1F-1 и MIP1F-2 и т.п. Хемокины класса С-Х-С являются общими хемоаттрактантами для нейтрофилов и лимфоцитов и к ним относятся такие протеины, как тромбоцитарный фактор 4 PF4, β -тромбоглобулин β TG, протеининдукции INF- γ IP10, связанный с

эпителием нейтрофильный аттрактант-78 ENA78, гранулоцитарный хемотаксический протеин-2 GCP2, лимфотаксин и т.п. Наконец, на четвертой фазе воспаления лейкоциты с модифицированными функциями мигрируют через эндотелий в ткани и оказывают там весь комплекс своего повреждающего действия в виде местного воспаления.

В гемопоэзе продукция перитубулярными клеткам почки эритропэтина (EPO) индуцирует пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников эитропоэза.

Гранулоцитарный колонии стимулирующий фактор (G-CSF) усиливает активацию и дифференцировку нейтрофилов.

Гранулоцитарный макрофагальный колониистимулирующий фактор (GM-CSF) является белком роста и дфференцировки полипотентных клеток-предшественников и стимулятором клеток гранулоцитарного, макрофагального и эозинофильного рядов.

Интерфероны $INF-\alpha\beta\gamma$ модулируют экспрессию молекул гистосовместимости 1 и 2 класса на большинстве клеток иммунной системы, стимулируют инкорпорацию продуктов генов HLA-LMP в протеосомы, в которых они определяют длину и соответствие процессируемых чужеродных антигенов связывающим участкам HLA молекул II класса.

Интерлейкин-1 (IL-1 $\alpha\beta$) обладает противовоспалительной активностью, взаимодействует с центральной нервной и эндокринной системами.

Интерлейкин-2 (IL-2) стимулирует пролиферацию Т-клеток, пролиферацию и секрецию иммуноглобулинов активированных В-лимфоцитов.

Интерлейкин-3 (IL-3) является синергистом образования и дифференцировки макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, мегакариоцитов и эритроидных клеток, поддерживает пролиферацию полипотентных клеток-предшественников.

Интерлейкин-4 (IL-4) индуцирует дифференцировку CD4 позитивных Т-клеток в Т-хелперы 2 типа, индуцирует пролиферацию и дифференцировку В-клеток, оказывает разнообразные эффекты на Т-клетки, моноциты, гранулоциты, фибробласты и эндотелиальные клетки.

Интерлейкин-5 (IL-5) стимулирует рост и дифференцировку эозинофилов.

Интерлейкин-6 (IL-6) активировывает гемопоэтические клетки-предшественники, ускоряя созревание мегакариоцитов увеличивает число тромбоцитов, индуцирует рост и дифференцировку Т- и В-клеток, гепатоцитов. Кератиноцитов и нервных клеток.

Продукция интерлейкина-7 (IL-7) поддерживает рост пре-B и про-B-клеток, поддерживает пролиферацию Т-клеток, стимулирует пролиферацию, цитотоксическую активность Т-лимфоцитов и LAK-клеток.

Интерлейкин-8 (IL-8) обладает хемотаксической активностью для нейтрофилов, Т-клеток и базофилов, активирует нейтрофилы и индуцирует их адгезию с эндотелиальными клетками.

Интерлейкин-9 (IL-9) является синергистом эритропоэина в поддержке дифференцировки клеток эритроидного ряда.

Интерлейкин-10 (IL-10) является потенциальным супрессором функций макрофагов, подавляет продукцию провоспалительных цитокинов активированными макрофагами, усиливает пролиферацию В-клеток и продукцию иммуноглобулинов.

Интерлейкин-11 (IL-11) является синергистом интерлейкина-3, усиливая все его дифференцировочные эффекты.

Интерлейкин-12 (IL-12) индуцирует дифференцировка некомитированных CD4 позитивных клеток в Т-хелперы 1 типа, стимулирует рост и дифференцировку наткральных киллеров и Т-лимфоцитов.

Интерлейкин-13 (IL-13) индуцирует рост и дифференцировку В-клеток и также ингибирует синтез провоспалительных цитокинов активированными макрофагами.

Интерлейкин-14 (IL-14) индуцирует пролиферацию и активацию В-клеток.

Интерлейкин-15 (IL-15) индуцирует пролиферацию активированных, но не покоящихся В-лимфоцитов, ингибирует секрецию иммуноглобулинов.

Интерлейкин-16 (IL-16) является хемооттрактантом для CD4 позитивных клеток и эозинофилов.

Интерлейкин-17 (IL-17) индуцирует продукцию IL-6, IL-8, G-CSF и PGE₂, экспрессию ICAM-1 на фибробластах, эндотеоциальных и эпителиальных клетках.

Интерлейкин-18 (IL-18) индуцирует продукцию INF- γ и усиливает продукцию и усиливает продукцию GM-CSF.

Трансформирующий ростовой фактор- β (TGF β) ингибирует рост различных типов клеток, стимулирует остеобласты и ингибирует остеокласты, стимулирует продукцию иммуноглобулинов А.

Фактор некроза опухолей β TNF β подавляет рост опухолевых клеток, усиливает рост фибробластов, усиливает поверхностную экспрессию молекул гистосовместимости и клеточной адгезии.

В ходе иммунного ответа формирование макромолекулярного комплекса на поверхности контактирующих антигенпредставляющих клеток с прецитотоксическими CD8⁺Т-лимфоцитами для HLA молекул I класса и с CD4⁺ хелперными Т-лимфоцитами для HLA молекул II класса приводит также к каскадным цитокиновым реакциям. Активированные в ходе презентации антигена макрофаги продуцируя IL-1 и IL-12 усиливает экспрессию HLA молекул на поверхности Т-лимфоцитов, что является дополнительным стимулом для активации этих клеток и формированием устойчивого антигенспецифического сигнала в иммунной системе. Баланс продукции IL-4 и IL-12 регулируя соотношение хелперов Th1/Th2 предопределяет путь формирования иммунного ответа, на последующих этапах которого вновь происходит продукция цитокинов (TNF, INF, IL-18) обладающих способностью усиливать экспрессию HLA молекул на поверхности уже эффекторных клеток, активируя их функции.

Из представленных данных следует, что продукция цитокинов и процессы биогенеза молекул гистосовместимости, в частности величина экспрессии HLA-молекул на поверхностной мембране клеток иммунной системы, являются компонентами единого процесса функционирования иммунной системы и реализации ее основных функций.

Методы исследования в иммуногенетике

Иммуногенетические исследования проводятся в настоящее время в медицинских учреждениях для подбора органов и тканей для аллогенных трансплантаций; в медицинских учреждениях, где решаются проблемы раннего диагноза и прогноза заболеваний, развитие которых ассоциировано с HLA-антигенами; в центрах планирования семьи для установления причин бесплодных браков; в судебно-медицинских центрах для установления отцовства; в лабораториях антропологии и этнографии при анализе путей миграции и происхождения народов; в научных лабораториях клинической иммуногенетики при изучении механизмов генетики иммунного ответа и т.п.

В 60-е годы была разработана методика серологического типирования HLA-антигенов, использующая принцип микролимфоцитотоксического теста, заключающегося в избирательном взаимодействии HLA-молекул на поверхностной мембране лимфоцитов обследуемого пациента со специфическими анти-HLA-антителами и комплементом, приводящим к гибели клеток, что определяется при световом микроскопировании клеток с витальными красителями. Существуют и автоматизированные варианты учета таких реакций с использованием двух- и трехцветной цитофлуориметрии в планшетном и проточном вариантах с использованием специальных приборов.

Для проведения таких исследований по методике американского ученого П.Терасаки, необходимы одноразовые пластиковые микрокамеры, микрошприцы, дозаторы; а также жизнеспособные мононуклеарные клетки периферической крови пациента и выделенные из них В-лимфоциты; специфические к отдельным HLA-антигенам антитела в виде моноспецифических аллоантисывороток или моноклональных антител; активный пуллированный кроличий комплемент, специальные витальные красители и оборудование для визуализации результатов в виде микроскопа или специальных приборов.

Выделение клеток периферической крови (по Воум А., 1968): мононуклеарные клетки пациента выделяют из гепаринизированной крови (100 ЕД гепарина на 10мл крови). 5мл гепаринизированной крови смешивают с равным объемом среды Хенкса (или другой питательной средой: среда 1999, RPMI) и наслаивают пастеровской пипеткой на градиент плотности верографин/фикола (плотность смеси 1,076- 1,077), налитого в центрифужную пробирку в объеме 2,5мл. Центрифугируют 40 мин. При 1500 об/мин; осторожно отсасывают «белое облачко» лимфоцитов, образовавшихся в интерфазе, и переносят его в мерную центрифужную пробирку. Дважды отмывают в двойном объеме питательной среды в режиме: 10 мин. при 1500 об/мин и второй раз – 10 мин. при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок

ресуспензируют в растворе Хенкса, доводя концентрацию лимфоцитов до 2,5-3,0 млн. в 1мл. Постановка реакции: типизирующие сыворотки раскапывают в лунки планшетов Терасаки под вазелиновое масло и замораживают (-70°C) до момента использования. Лимфоцитарную взвесь раскапывают микрошприцем Терасаки в планшеты по 1 мкл в лунку и инкубируют при 26°C 40 мин. вместе с типизирующими сыворотками. В каждую лунку добавляют 5 мкл свежемороженого кроличьего комплемента и инкубируют при комнатной температуре час. Резко стряхивают планшеты для удаления вазелинового масла и закапывают в каждую лунку 1мкл трипанового синего или эозина; через 10мин избыток краски удаляют стряхиванием и учитывают реакцию; клетки «убитые» цитотоксическими антителами, окрашены в голубой или красный цвет. Интенсивность цитотоксической реакции оценивают по следующей шкале:

8 – 100-81% гибель клеток

6 – 80-41% гибель клеток

4 – 40-31% гибель клеток

2 – 30-21% гибель клеток

Определение HLA-DR-фенотипа проводится в пролонгированном лимфоцитотоксическом тесте (модификация Van Rood, 1977; Singal, 1977).

1 этап – до добавления комплемента – время экспозиции 1 час при 37°C.

2 этап с 5 мкл компонента – 2 часа при 20-25°C.

Для определения HLA-DR антигенов используются лимфовзвеси, обогащенные В-лимфоцитами. Для этого клетки, выделенные из крови на верографин-фиголе, необходимо разделить на Т- и В-субпопуляции с помощью нейлоновой ваты, 200мг которой помещается в пластиковый шприц объемом 1-2мл. Вата смачивается смесью питательной среды с инактивированной сывороткой человека АВ (IV) – 5% смесь. Взвесь лимфоцитов помещают в колонку с нейлоновой ватой и инкубируют 40 мин. в горизонтальном положении при температуре 37°C. Дважды капельно промывают колонку теплым раствором Хенкса (37°C) Полученные в результате смыва с нейлона клетки – Т-лимфоциты. Трижды используя небольшие количества раствора Хенкса (общий объем 5-7мл), форсированно отжимают с помощью поршня шприц с нейлоновой ватой. Полученные в результате отжимания клетки – В-лимфоциты, используют для постановки микролимфоцитотоксического теста.

Полученные результаты реакции заносятся в таблицу, соответствующую строению лунок микропланшета, и выводят результат типирования с учетом специфичности прореагировавших антисывороток, интенсивности реакции цитотоксичности, моно- или полиспецифичности прореагировавших антисывороток и перекрестно реагирующих групп антигенов. Эти группы представлены в таблице 1.

Перекрестно реагирующие группы HLA-антигенов

HLA-A A1, A36 A1, A3, A11 A2, A28 A2, A9, A28 A10, A11 A10, A28, A33 A29, A30, A31, A33 A30, A31 HLA-B B5, B15, B17, B18, B21, B35, B53, B70 B7, B22, B27, B40, B42, B48 B8, B14, B18, B39 B12, B13, B21, B47 B13, B21, B40, B41, B45, B47, B48 B15, B17, B21, B35, B70 B27, B13, B47	HLA-A/B A2, B17 A9, A25, A32, BW4 HLA-B/C B46/CW3 HLA-C CW4, CW6 CW5, CW8 HLA-DR DR1, DR10 DR3, DR5, DR6 DR4, DR7, DR9 DR5, DR8
---	---

Недостатками серологического типирования являются наличие перекрестных реакций, слабая аффинность антител или низкая экспрессия HLA-антигенов, отсутствие белковых продуктов у ряда HLA-генов.

В настоящее время номенклатура серологически выявляемых антигенов включает в себя 28 специфичностей локуса HLA-A, 61 специфичность локуса HLA-B, 10 специфичностей локуса HLA-C, 23 специфичности локуса HLA-DR, 9 специфичностей локуса HLA-DQ и 6 специфичностей локуса HLA-DP (табл.2).

HLA-антигены, выявляемые серологическими методами

(HLA Report, 1996)

A	B		C	DR	DQ	DP
A1	B5	B48	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B49(21)	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B50(21)	Cw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B51(5)	Cw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5102	Cw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B5103	Cw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B52(5)	Cw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B53	Cw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B54(22)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(30)	
A23(9)	B17	B55(22)	Cw10(w3)	DR9		
A24(9)	B18	B56(22)		DR10		
A2403	B19	B57(17)		DR11(5)		
A25(10)	B20	D58(17)		DR12(5)		
A26(10)	B21	B59		DR13(6)		
A28	B22	B60(40)		DR14(6)		
A29(19)	B27	B61(40)		DR1403		
A30(19)	B2708	B62(15)		DR1404		
A31(19)	B35	B63(15)		DR15(2)		
A32(19)	B37	B64(14)		DR16(2)		
A33(19)	B38(16)	B67		DR17(3)		
A34(10)	B39(16)	B70		DR18(3)		
A34(10)	B3901	B71(70)				
A36	B3902	B72(70)		DR51		
A43	B40	B73				
A66	B4005	B75(15)		DR52		
A68(28)	B41	B76(15)				
A69	B42	B77(15)		DR53		
A74(19)	B44(12)	B78				
A80	B45(12)	B81				
	B46	Bw4				
	B47	Bw6				

В 90-х годах на смену серологическим методам типирования пришли так называемые процедуры ДНК-типирования, основанные на различных вариантах полимеразной цепной реакции и молекулярной гибридизации.

Эти методы заключаются в накоплении необходимого для анализа значительного количества ДНК путем ее полимеризации и в использовании зондов, комплементарных анализируемым участкам ДНК. Переход на новые технологии позволил вместо 23 серологически типизируемых HLA-антигенов локуса DR, установить наличие около 70 аллельных вариантов; аналогичная ситуация сложилась и при анализе других локусов.

Практика показывает, что для типирования аллелей HLA-DR наиболее приемлемыми являются молекулярно-генетические методы. Это обусловлено трудностями получения специфических антисывороток. Кроме того, одним из преимуществ методов молекулярной генетики является то, что для типирования не требуется наличие жизнеспособных клеток, материал для исследования, то есть ДНК, может храниться в течение многих лет, что дает возможность повторных исследований с включением дополнительных генетических маркеров. Для работы достаточно несколько микролитров крови или можно ограничиться соскобом со слизистой оболочки рта.

Разработано несколько вариантов генотипирования HLA. Среди них:

- PCR-SSOP-гибридизация амплифицированных фрагментов ДНК, фиксированных на мембранах, с олигонуклеотидными зондами;
- SSP-амплификация праймерами, имеющими аллельную специфичность;

- PCR-RFLP-рестриктивный анализ продуктов амплификации;
- RH-метод обратной гибридизации амплифицированного фрагмента с олигонуклеотидными зондами, фиксированными на мембране или другой твердой подложке (пластике).

Полиморфизм генов HLA-комплекса необычайно высок и широкое внедрение в иммуногенетику методов молекулярной биологии приводит к дальнейшему расширению перечня аллельных вариантов исследуемых генов. Этот процесс с одной стороны затрудняет адекватный подбор полностью совместимых пар донор-реципиент для трансплантации, но с другой стороны позволяет проводить эту процедуру с максимальной эффективностью. Уточнение истинного аллельного полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости может способствовать и установлению их более выраженной ассоциированности с заболеваниями, т.к. становится понятным, что установленные на первом этапе развития клинической иммуногенетики ассоциативные связи предрасположенности к различным болезням с серологически выявляемыми широкими специфичностями, носили предварительный характер и подлежат детальному уточнению на современном этапе развития науки.

К настоящему моменту число идентифицированных аллелей генов HLA-комплекса приближается к одной тысяче и продолжает расти.

Необходимо отметить, что механизмы ассоциированности HLA антигенов с заболеваниями до сих пор полностью не расшифрованы. Они несомненно связаны с непосредственным участием этих уникальных молекул, локализованных на клеточных мембранах, в формировании межмолекулярных комплексов, приводящих к избирательной специфической активации клонов иммунокомпетентных клеток со специализированными функциями. Существование множественных путей формирования иммунопатологических процессов снижает значимость отдельно взятых факторов, что находит свое отражение в относительном характере ассоциированности HLA антигенов с заболеваниями.

В 1973 году выявлено увеличение частоты встречаемости антигена HLA-B27 у больных анкилозирующим спондилоартритом. Этот факт дал толчок для развития направления клинической иммуногенетики «HLA и болезни». В рамках этого направления было установлено, что целый ряд тяжелых заболеваний человека ассоциирован с наличием в его геноме тех или иных аллельных вариантов HLA-генов. Существуют также HLA-антигены, определяющие резистентность их носителей к развитию данного заболевания – протективные антигены.

Установлена ассоциация антигенов HLA-B8 с заболеваниями аутоиммунной природы, в частности с системной красной волчанкой -

HLA-B7, -B8, -B17, -DR2, -DR3, ассоциации антигенов – HLA-A3-B17, протективные антигены при этом заболевании - HLA-A11, B15 и B35.

Чаще других выявляется антиген HLA-B8 при дерматомиозите, хроническом вирусном гепатите В.

Антиген HLA-B35 ассоциирован с развитием сахарного диабета I типа.

При гипертрофической кардиомиопатии имеется ассоциация с антигенами гистосовместимости HLA-B23, -B12, -DR4.

При ревматоидном артрите отмечается ассоциация заболевания с антигеном HLA-DR4, при болезни Рейтера – с антигеном HLA-B27.

Доказана ассоциация антигена HLA-B17 с острым лимфобластным лейкозом.

Положительная корреляционная взаимосвязь при ВИЧ-инфекции выявлена с антигенами HLA-A1, -A5, -A11, -A23, -A28, -A29, -DR2, -DR5, а также с ассоциациями антигенов HLA-B8-DR3, D35-Cw4. Отрицательная связь - с HLA-A9, -A25, -A26, -A32, -B4, -B14, -B18, -B27, -B51, -B57, -DR5, -DR6, -DR7, -DR13.

При рассеянном склерозе – ведущая роль принадлежит антигену HLA-DR2, ремиттирующее течение ассоциировано с HLA-DRw17, DQw2, прогрессивное течение - с HLA-B7, -B8, DR3, неблагоприятный прогноз и тяжелое течение - с HLA-DR4, -DR7, -DQw8, -DR17, -DQ2, -DR1, -DQ5, благоприятный прогноз - с HLA-DQw5.

Предрасполагающими факторами при лимфогранулематозе являются HLA-Cw7, -DR5, -DR6, протективные антигены - HLA-DR1, -DR7.

Выявление этих антигенов на доклиническом этапе заболевания позволяет отнести пациента к группе риска по развитию того или иного заболевания, а при появлении первых клинических симптомов способствует ранней дифференциальной диагностике.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ИММУНОГЕНЕТИКА исследует вопросы происхождения и расселения человечества по планете. Была составлена генетическая модель родословного дерева человечества, подтвержденная независимыми исследованиями археологов и лингвистов на основе анализа памятников культуры и языков на различных континентах.

Исследованиями иммуногенетиков были получены данные об африканском происхождении человеческого вида. Учитывались варианты расчета минимального генетического пути, скорость эволюционных изменений и соотношение длины ветвей генетического дерева с продолжительностью хронологического промежутка по многим полиморфным генетическим системам. Африканское происхождение человечества подтверждено анализом митохондриальной ДНК, наиболее дифференцированной в Африке в сравнении с другими континентами. Сопоставление этих данных с результатами палеонтологических и

археологических исследований показало, что человечество, возникнув 200 тыс. лет назад в Африке постепенно мигрировало через Суэцкий перешеек и заселило Европу и Азию, откуда волны миграции достигли Америки через сухопутный тогда Берингов пролив и Австралии через острова Тихого океана после развития мореплавания.

Важным аспектом иммуногенетики является популяционный анализ распределения HLA-антигенов в различных этнических группах. Установлены расовые различия распределения HLA-антигенов: HLA-A1 преобладает у представителей белой расы, HLA-A24 и HLA-B54 – у представителей желтой расы, для которой нехарактерно наличие антигенов HLA-A25, HLA-B8 и B18.

Международные программы по популяционной иммуногенетике позволили сопоставить распределение HLA-антигенов среди отдельных современных народов всех континентов. Распределение HLA-антигенов в типичных для Европы и Азии популяциях представлено в таблице 3.

Таблица 3

Частота распределения HLA-антигенов среди
некоторых этнических групп Европы и Азии

(по данным 11-го уоркшопа по гистосовместимости, 1991)

HLA	Этнические группы					
	европеоиды			монголоиды		
	немцы	поляки	шведы	японцы	монголы	Казахи
A1	18,0	10,0	19,1	0,7	8,3	11,4
A2	27,8	34,0	38,7	24,4	23,1	29,2
A3	14,1	16,5	12,0	0,6	4,8	8,0

A11	4,6	3,4	3,9	10,4	9,7	9,2
A23	2,7	1,0	1,1	0,0	2,2	0,8
A24	7,5	7,6	6,6	35,1	18,6	20,4
A25	2,4	4,0	1,1	0,0	0,7	0,8
A26	4,7	6,0	2,6	10,9	5,8	5,3
A28	5,1	4,0	1,6	0,0	0,7	1,7
A29	2,2	1,0	1,1	0,0	1,4	0,0
A30	2,4	3,0	0,5	0,4	4,3	0,8
A31	2,2	1,0	4,2	9,0	4,2	4,2
A32	3,2	3,0	1,1	0,0	1,8	0,0
A33	3,1	2,0	0,0	7,7	6,3	1,7
A34	0,2	1,0	1,1	0,0	1,4	0,0
A36	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	0,0
B7	10,7	8,0	15,7	5,0	3,5	4,2
B8	9,8	6,0	16,0	0,0	6,4	4,2
B13	3,2	6,0	1,1	1,8	6,2	1,7
B14	3,7	2,0	1,1	0,1	0,7	1,7
B18	3,4	3,0	1,1	0,0	1,1	0,0
B27	4,6	5,6	8,8	0,4	5,1	4,4
B35	7,6	13,8	8,7	8,1	6,6	1,7
B37	2,0	0,0	1,1	0,7	4,3	0,0
B38	1,9	6,0	0,0	0,3	2,2	0,0
B39	1,9	1,0	0,5	4,5	2,2	1,7
B41	1,7	2,0	0,5	0,0	1,4	0,8
B42	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,8
B44	9,2	13,6	11,1	7,4	1,4	2,5
B45	0,8	1,3	1,1	0,0	0,0	0,8
B46	0,2	0,0	0,0	4,4	1,1	0,8
B47	0,7	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0
B48	0,2	0,0	0,5	3,2	4,7	0,8
B49	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,8
B50	1,0	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0
B51	4,9	7,0	2,6	9,3	8,7	8,5
B52	1,0	1,0	0,0	10,7	5,8	3,5
B53	0,8	0,0	0,5	0,0	0,4	13,3
B54	0,0	0,0	0,0	6,3	1,4	1,7
B55	1,5	1,0	0,0	2,9	2,2	0,8
B56	1,5	2,0	0,5	1,6	0,7	0,8
B57	6,3	1,0	0,5	0,0	1,8	4,3
B58	3,4	5,0	2,4	0,7	5,1	3,4
B59	0,0	0,0	0,0	1,9	0,4	0,0
B60	4,6	6,0	6,2	5,6	4,0	6,2
B61	2,5	0,0	0,0	10,7	6,9	4,3
B62	4,9	3,0	4,7	8,3	5,4	4,3
B63	1,7	3,0	4,2	0,0	3,3	1,7
B67	0,0	0,0	0,0	1,5	0,7	0,0
B70	1,4	0,0	0,0	1,6	0,4	0,8
B73	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B75	0,3	0,0	0,5	1,1	0,0	0,9
B76	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B77	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cw1	3,3	2,1	3,7	11,8	9,1	6,9
Cw2	7,2	8,2	7,7	0,1	2,9	4,3
Cw4	11,2	18,1	9,3	4,2	4,3	8,7
Cw5	4,7	1,0	3,7	0,4	0,0	8,8
Cw6	14,2	10,8	3,7	1,0	13,6	4,3
Cw7	28,0	16,6	26,3	15,3	17,2	5,2

Cw9	5,3	6,2	5,3	13,9	7,6	9,1
Cw10	4,8	3,1	7,6	8,8	17,1	18,6
Cw11	0,3	0,0	0,0	4,2	1,8	0,0
DR1	9,5			5,5	4,0	
DR3	10,1			0,2	9,1	
DR4	13,4			22,8	13,4	
DR7	11,3			0,4	13,4	
DR8	4,2			13,3	7,9	
DR9	1,0			13,0	5,9	
DR10	1,2			0,6	2,0	
DR11	18,1			2,6	8,0	
DR12	3,9			7,0	8,4	
DR13	10,9			7,8	5,4	
DR14	3,3			5,5	2,0	
DR15	8,8			17,4	13,0	
DR16	2,3			0,8	2,8	
DQ1	36,3			45,6	36,3	
DQ2	19,1			0,6	20,8	
DQ3	11,1			18,8	2,5	
DQ4	6,1			14,9	1,5	
DQ7	27,3			15,2	25,7	

Из вышеприведенной таблицы следует, что в этнических группах в пределах одной расы, а также различных рас существуют выраженные различия в характере распределения антигенов гистосовместимости.

При сравнении русских жителей европейской и азиатской частей России выявлено повышенное количество антигенов HLA-A1, -B13 и -B27; снижена частота встречаемости антигенов -A19, -A28 и -DR8 по сравнению с распределением в группе европеоидов. Такое распределение характерно для русской популяции в целом, а среди жителей азиатской части России чаще встречаются антигены -A9 и DR3.

Исследованиями популяционной иммуногенетики установлено, что для каждой популяции, проживающей в определенном регионе, наличие наиболее распространенных аллелей отражает адаптивные процессы

приспособления к конкретной экологической ситуации на популяционном уровне. Редкая же встречаемость аллеля в популяции может быть связана с низкой приспособляемостью данного индивида к условиям проживания в регионе и соответственно с низкой возможностью к репродуктивной функции.

Результаты исследований в области иммуногенетики позволили уже сегодня решить целый ряд проблем в различных областях естествознания и наметить пути решения его наиболее существенных проблем.

Литература

1. Акопян А.В., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Особенности распределения аллелей и гаплотипов HLA I, II и III классов в Армянской популяции. // Иммунология. – 1998. - №1. – С.11-13.
2. Бубнова Л.Н., Зубарева Т.С., Лысова Л.В. и др. Применение метода молекулярного типирования для определения HLA специфичностей II класса в Республиканском центре иммунологического типирования тканей. // Иммунология. - № 6. - С.54-55.

3. Волянский Ю.Л., Телепнева Л.Г., Васильев Н.В. О возможной роли некоторых иммуногенетических факторов в патогенезе ВИЧ-инфекции // Жур. микробиол., эпидемиол. и иммунологии. - 1999. - № 1. - С.49-51.
4. Зарецкая Ю.М., Пивник А.В., Клинова Э.Г. и др. Факторы наследственной предрасположенности к лимфогранулематозу // Тер. архив. – 1998. - № 7. – С.53-57.
5. В.И. Коненков Медицинская и экологическая иммуногенетика. // СО РАМН, Новосибирск, 1999. – 250 с.
6. Коненков В.И., Воронова И.А., Прокофьев В.Ф. и др. Прогностические критерии клинического течения системной красной волчанки // Тер. архив. – 1995. - № 4. – С.57-59.
7. Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. – М., -1989. - 678С.
8. Наумов Ю.Н., Коненков В.И., Алексеев Л.П. Молекулярные механизмы функционирования антигенов гистосовместимости. // Иммунология. – 1993. - № 5. – С.13-18.
9. Одинак М.М., Бисага Г.Н., Калинина Н.М. и др. Рассеянный склероз в Северо-Западном регионе России: результаты HLA-типирования // Журнал неврологии и психиатрии. – 2000. - № 2. – С.40-44.

10. Тимонова Л.А., Румянцев А.Г. HLA-антигены I и III классов при остром лимфобластном лейкозе у детей // Гематол. и трансфузиол. – 1989. - № 5. – С.19-22.
11. Хайтов Р.М. Алексеев А.П. Генетика иммунного ответа. Иммунология. – 1998. - № 5. – С.11-15.