

ОБЩ ИМУНОЛОГИЧЕН АСПЕКТ НА КРЪВНИТЕ
ГРУПИ:АНТИГЕНИ (ВИДОВЕ, СТРУКТУРНИ ОСНОВИ
НА АНТИГЕННАТА СПЕЦИФИЧНОСТ); АНТИТЕЛА
(ВИДОВЕ, СТРУКТУРА, СВОЙСТВА;
ИМУНОХЕМАТОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА);
КОМПЛЕМЕНТ-ПЪТИЩА НА АКТИВИРАНЕ.

Д-р Жанина Йорданова Иванова дм,



Общ имунологичен аспект на кръвните групи: антигени

- Механизмите на имунния отговор са тясно свързани с елементите на кръвната система, което определя и значението на имунохематологията като неразделна част от общата имунология. Големите постижения в областта на молекулярната биология и генното инженерство дадоха ценна информация за структурата на еритроцитната мембрана, биохимичния строеж на антигените, разположени по нейната повърхност и на антигените, специфични за други кръвни клетки, разкриха механизмите на алоимунизацията при кръвопреливане, бременност и трансплантация.

Антигени

- Антигените са чужди за организма високомолекулни субстанции, които при контакт с клетките на имунната система индуцират имунен отговор и специфично се свързват с ефекторните звена – антитела и клетки. За да бъде едно вещество антиген трябва да отговаря на следните условия:
- 1. да бъде разпознато от имунокомпетентните клетки като чуждо, т.е. да притежава структури, различни от тези, генетично заложи в съответния организъм
- 2. да бъде имуногенно, т.е. да индуцира синтез на антитела
- 3. да се свързва специфично със съответното антитяло, качество наречено антигенност
- Субстанции, които не са имуногенни, но имат антигенни свойства се наричат хаптени. Те придобиват качеството имуногенност, когато се свържат с високомолекулни вещества. Последните се наричат носители или „шлепери“.

Антигени

- **Имуногенност**

- Едно вещество е имуногенно, когато е чуждородно спрямо индивида, има високо молекулно тегло и сложен химичен състав.
- Биологичният произход на антигените е един от важните фактори определящ качеството имуногенност. Във връзка с това антигените се разделят на три групи:
 - 1. Хетероантигени – характерни за даден животински вид. Такъв е например форсмановия антиген, който се открива в овнешките еритроцити, но липсва в говеждите еритроцити
 - 2. Алоантигени /изоантигени/. Те определят генетичната индивидуалност и неповторимост на индивида, т.е. Те са израз на генетичните различия на всеки индивид от даден животински вид. Такива са антигените на кръвните клетки, на серумните белтъци, на клетъчните ензими.

Антигени

- 3. Автоантигени. При нормални условия антигенните структури на организма се приемат като „свои“ и се разграничават от всичко „чуждо“. При някои патологични състояния този толеранс се нарушава и организмът започва да синтезира антитела, насочени специфично към антигените на собствените клетки и тъкани, т.е. Имунокомпетентните клетки осъзнават собствените си антигени като чужди. Класически пример за това са автоимунните хемолитични анемии.
- 4. Органоспецифични антигени. Те са характерни само за определен орган. Понякога имат еднакви или почти еднакви структури в различни животински видове. Например кристалина на окото, тиреоглобулина и пр.

Антигени

- **Антигенност**

- Участъкът от антигенната молекула, който се свързва специфично със съответното антитяло се нарича антигенна детерминанта или епитоп. Последният има комплементарна структура по отношение на активния център на антитялото. Това е важно условие за създаване на тесен контакт между двете структури и за действието на нековалентните сили при антиген-антитяло реакцията.
- При кръвногруповите антигени А, В, Н, Р, Lewis, специфичността се определя от монозахаридни структури в края на гликопротеинна и гликолипидна молекула. Захаридите, които инхибират напълно съответните специфични антитела се наричат имунодоминантни. Епитопите на антигените стават достъпни само след ензимна обработка на еритроцитите. Например, ензимът невраминидаза отцепва сialова киселина, която е имунодоминантна за М и N антигените.

Антитела

- Антителата са имуноглобулини, които имат способността да се свързват специфично със съответните антигенни детерминанти.
- **Структура** – всяка имуноглобулинова молекула се състои от 4 полипептидни вериги – 2 тежки /H/ и 2 леки /L/ с различна дължина и аминокиселинна последователност.
- Според първичната структура и антигенните свойства тежките вериги се разделят на 5 вида: γ , α , μ , δ , ϵ . Въз основа на тези различия имуноглобулините се разделят на 5 класа: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.
- В рамките на клас IgG са установени 4 субкласа – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, а при IgA и IgM – по два: IgA1, IgA2 и IgM1, IgM2. Двете H вериги в една молекула винаги са идентични.

Антитела

- Леките вериги са общи за имуноглобулините от всички класове и са два типа – капа /к/ и ламбда /λ/. Две леки вериги в една молекула независимо от класа и субкласа са винаги еднотипни – или капа или ламбда.
- Всяка верига Н и L се състои от две части – константна /С/ с трайно подреждане на аминокиселините и вариабилна /V/, където аминокиселинната последователност варира под влияние на генетични и мутагенни фактори. Полипептидните вериги образуват по дължината си симетрични глобуларни нагъвания, наречени хомоложни зони или домени. Областта, в която са разположени дисулфидните мостове между Н-веригите се нарича шарнирна област. Поради гъвкавостта си тя осигурява голяма подвижност на двата клона на молекулата спрямо общата част и помежду им.

Антитела

- Под въздействието на ензими имуноглобулиновата молекула може да се разкъса в областта на талията /шарнирната област/. Образуват се два вида фрагменти.
- Когато се използва папаин се получават два еднакви фрагмента Fab /antigen binding fragment и един Fc /crystalisable fragment/. С пепсин се получава един общ фрагмент, който обхваща двете Fab части и шарнирната област.
- Във Fab-фрагмента се намира активният център на антителата, т.е. Това е участъкът, който се свързва специфично с епитопа.
- Fc фрагментът е свързан с ефекторните функции на имуноглобулиновата молекула: стимулира пролиферацията и диференциацията на В-лимфоцитите; свързва комплемента и предизвиква цитолиза; фиксира се към тъканни клетки и мастоцити и отключва анафилактични реакции; свързва се с макрофагите и стимулира фагоцитозата; осигурява преминаването на IgG молекулите през плацентата;

Антитела. Биологични свойства.

- IgG – в серума на възрастните индивиди е около 15% от общия белтък и разпределен почти равномерно интраваскуларно и екстраваскуларно. Полуживот 23 дни. Синтез при вторичния имунен отговор. Свързват комплекта, при наличието на две молекули в непосредствена близост. Синтезът до раждането е незначителен. Нараства прогресивно между 3 и 6та седмица, като достига 60% от нивото му при възрастните към 10-18 месечна възраст.

Антитела. Биологични свойства.

- IgM – предимно в кръвната плазма. Антигенните детерминанти активират комплемента. Синтез при първичен имунен отговор. Естествени антиеритроцитни антитела, които нормално се откриват в серума на здрави индивиди. Полуживот средно 5 дни. Синтезът им стартира на 2-3 ден след раждането, прогресивно нараства и на 9 месечна възраст достига 100% нивото на възрастен индивид.

Антитела. Биологични свойства.

- IgA – предимно в секретите като моно- и димери, но се срещат и полимерни форми. Образува се в епителните клетки на мукозата или екзокринните жлези. Не свързва комплемента. Концентрацията в коластрата е около 90% от количеството му в серума, а в слюнката – 20%. Не се открива в серума на кръвта от пъпна връв. Към двумесечна възраст, количеството е около 20%, а към 5-та година – около 50% от това на възрастните индивиди.
- IgD – свързан основно с участието си в клетъчните имунни реакции като повърхностни рецептори на лимфоцитите
- IgE – реагини, които са в основата на свръхчувствителността от бърз тип.

Антитела. Имунохематологична характеристика.

- В кръвногруповата серология антителата се разделят на два основни типа: естествени и имунни.
- Естествени – нормално присъстват в серума, без предшестващ антигенен стимул – анти-А, анти-В, анти-Р, анти-Le^a, анти-М.

Етапи на хемаглутинационните реакции

- Първият етап на хемаглутинацията е свързване на антигена с антитялото и формиране на антиген-антитяло комплекси или сенсibiliзация на еритроцитите от антителата. В кръвногруповата серология антителата най-често са един от двата имуноглобулинови класа – IgM или IgG, но са описани и антитела от IgA клас.
- Еритроцитите имат диаметър около 7-8 микрометра, а IgG имуноглобулините имат максимален размер около 14 нМ (нанометра). IgM и IgG молекулите свързват отделни еритроцити като разстоянието, на което са отдалечени, е около 30 нанометра. За да разберем какво означава това, трябва да си представим еритроцит с големина 50 метра свързан с IgG молекула с размери 7 сантиметра! Независимо, че молекулата на IgM е малко по-голяма от IgG и двата класа антитела трябва да се свържат с повече от една клетка, за да се реализира втория етап на хемаглутинацията. IgM молекулите в сравнение с IgG имат 5 пъти по-голяма възможност да предизвикат директна аглутинация на еритроцити. За да може IgG молекулите да предизвикат аглутинация на еритроцити, условията в реакционната среда трябва да се подобрят, така че еритроцитите да се доближат един до друг, за да могат IgG молекулите да се свържат образувайки мостчета между тях или пък да се използват други антитела, които да се присъединят към IgG молекулите и пак да доведат до образуване на аглутинация. Това е втория етап, който съществува както при директната, така и при индиректната аглутинация.

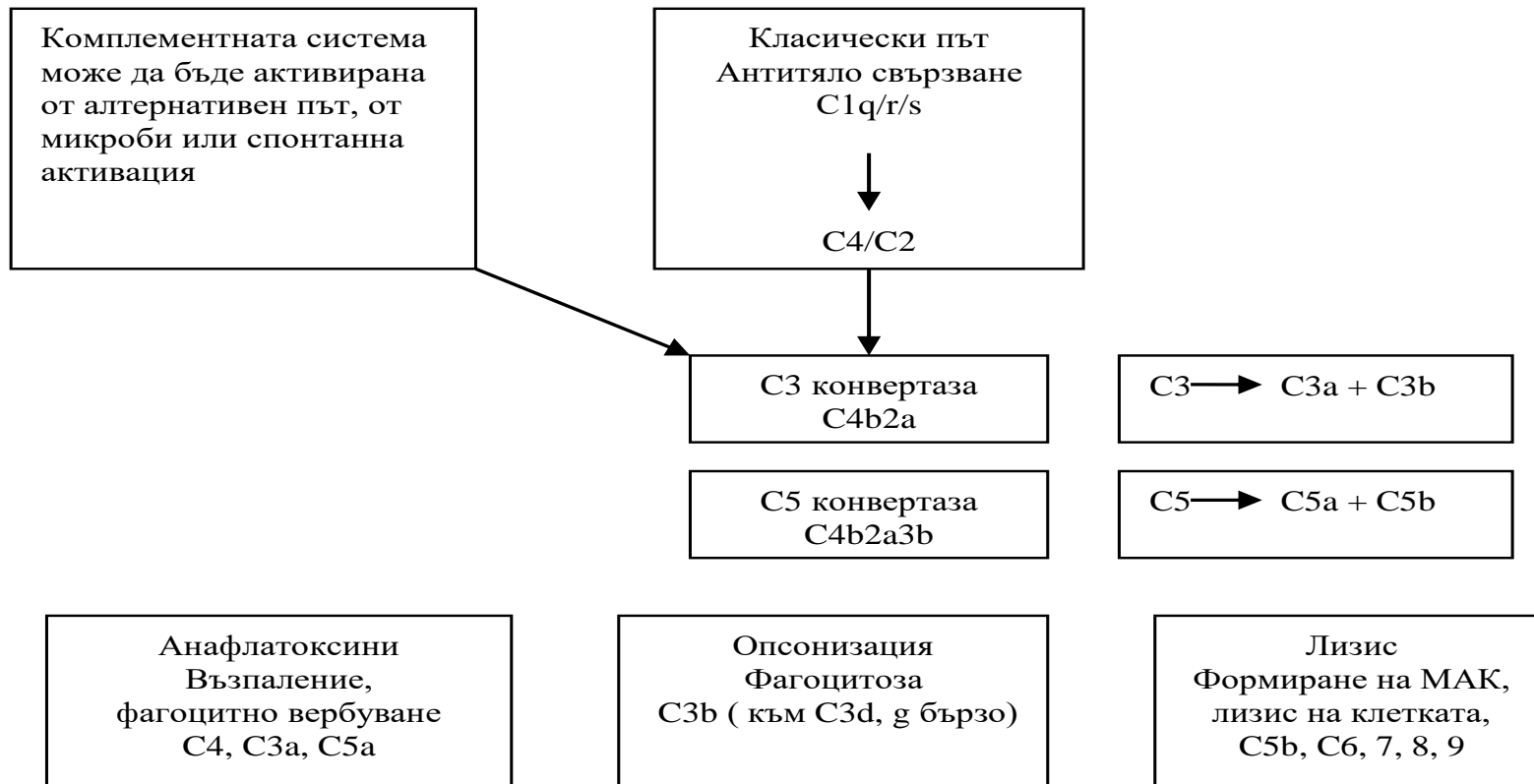
Директна аглутинация

- Както самото име подсказва, директната аглутинация е директно следствие от реакцията антиген-антитяло. Обикновено антителата са от IgM имуноглобулинов клас и реакциите протичат оптимално при по-ниска от 37°C температура. Познати са примери и на IgG антитела, които също предизвикват директна аглутинация. Например такива са някои anti-A, anti-B и някои anti-M антитела. Това обаче е възможно, ако структурата, която носи антигенното продължение над еритроцитната повърхност е разположена така, че разстоянието между антигените на близко разположени клетки е по-малко от 14nm. Тази минимална дистанция между близко разположени клетки в условията на нормална йонна концентрация води до ефект на взаимно отблъскване поради негативния заряд на еритроцитите. Все пак IgG молекулите могат да осъществят свързване между две клетки и да образуват аглутинация. IgM антителата могат да осъществят захват на по-голяма дистанция и имат по-голям капацитет за образуване на връзки с антигени, което води до по-голяма готовност за предизвикване на директна аглутинация. Антигенната гъстота също оказва влияние. Колкото повече антигенни участъци имат клетките, толкова по-голям е шанса за образуване на антиген-антитяло комплекс и последваща аглутинация. Но близостта на антигените върху клетката не води непременно до аглутинация. Една молекула антитяло може да свърже само антигени от една клетка и да не образува мостове с други клетки, което се изисква за образуването на аглутинация.

Директна аглутинация

- В рутинната работа директната аглутинация се използва при определяне на АВО кръвногруповите антигени или при определяне на други еритроцитни антигени с човешки, поликлонални или моноклонални антитела, които директно предизвикват аглутинация. Използваните тестове могат да се осъществят на плочка, в епруветка, с технология използваща микроплаки с твърда и течна фаза или колонно аглутинационна техника без необходимост от потенциране на реакцията, за да се визуализира хемаглутинацията. Изследването на плочка или предметно стъкло не се препоръчва за начално, или окончателно определяне на антигени, особено при неонатални кръвни проби, тъй като не всички кръвногрупови антигени са напълно развити при раждането. Използването на относително нечувствителна техника може да пропусне определянето на антигени в някои случаи.

Комплементната активация може да се предизвика от свързване на антитяло със съответния антиген върху еритроцитите. IgM антителата активират комплемента много ефикасно и често включват комплементната каскада до атакувания мембранен комплекс (МАК) с последващо лизиране на еритроцитите. IgG антителата изискват минимум от две молекули в близко съседство върху еритроцита, за да се инициира активирането на комплемента само до C3 ниво.



КОМПЛИМЕНТНА АКТИВАЦИЯ

- Някои антитела могат да активират комплемента. Чрез каскадно протичащи последователни реакции се образува мембранно атакуващ комплекс – МАК (MAC–membrane attack complex), който предизвиква хемолиза на еритроцитите. Това може да доведе до получаване на фалшиви негативни резултати, които всъщност са положителни. Ето защо се използва EDTA като антикоагулант за кръвните проби при кръстосаното определяне на кръвнотгруповата принадлежност по АВО система. EDTA възпрепятствува активирането на комплемента след C1q ниво, като свързва Ca^{++} йони, необходими за продължаване на комплементната каскада. Активирането на комплемента се задейства от антитяло свързващо се със съответен еритроцитен антиген. IgM антителата активират комплемента много ефикасно(ефективно) и често включват комплементната каскада до MAC, с последващо лизиране на клетки. IgG антителата изискват минимум от две молекули в близко съседство върху еритроцитната повърхост за активиране на комплемента и то само до C3 ниво.

Индиректна аглутинация

- Антитела, които не могат директно да аглутинират клетки, се откриват като се използва ензимна обработка на еритроцитната мембрана или антиглобулинов тест.
- Ензимно третираните клетки се използват при скрининг за еритроантитела и най-вече при идентификацията им. Те са много полезни при определяне специфичността на смес от различни антитела, където едно или повече антитела са насочени срещу ензим-чувствителни антигени.
- Ензимните методи са трудни за стандартизиране. Традиционно ензимните разтвори се приготвят като се използва тегло за обемен метод. Обаче не всички прахообразни форми на ензими ще съдържат същото количество от активността след приготвяне на определен обем разтвор. Необходимо е всяка приготвена партида да се подложи на анализ, за да се гарантира на стандарта на теста. Например процедурата по папаинизиране на еритроцитите трябва внимателно да се наблюдава и контролира, за да не се допусне сенсibiliзация към криптантени, какъвто е Т-антигена.

-

**БЛАГОДАРЯ
ЗА ВНИМАНИЕТО**

