DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-4-2
УДК 619:616.937.5

Рецепторный профиль лимфоцитов крови вакцинированных овец

Ездакова И.Ю.
Ezdakova I.Yu.

Ездакова И.Ю., доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии,
Капустина О.В., доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии,
Вальциферова С.В., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии
ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко Российской академии наук", г. Москва,
e-mail: ezdakova.i@viev.ru

Ключевые слова: поствакцинальный иммунный ответ, овцы, лимфоциты, CD-маркеры, овцы

Резюме. В организме происходит постоянное взаимодействие лигандов с рецепторами иммунокомпетентных клеток, что приводит к перераспределению последних на поверхности лимфоцитов и изменению функциональной активности клетки и, следовательно, её фенотипа. У животных данные процессы изучены недостаточно, поскольку идентификация лимфоцитов является сложной задачей из-за отсутствия на отечественном рынке препаратов антител к CD-рецепторам животных. В настоящей работе приведены экспериментальные данные исследования динамики экспрессии CD-маркеров лимфоцитами крови овец. Для

Receptor profile of blood lymphocytes of vaccinated sheep

Ezdakova I.Yu.,
Kapustina O.V.,
Valtsiferova S.V.

Federal State Scientific Institution "Federal Research Center - All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named KI Scriabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences",
Moscow, e-mail: ezdakova.i@viev.ru

Key words: post-vaccine immune response, sheep, lymphocytes, CD markers, sheep

Abstract. There is a constant interaction of ligands with receptors of immunocompetent cells, which leads to the redistribution of the latter on the surface of lymphocytes and a change in the functional activity of the cell and, consequently, its phenotype. In animals, these processes are not well understood, since the identification of lymphocytes is a difficult task due to the lack of antibodies against animal CD receptors in the domestic market. In the present work, experimental data on the dynamics of expression of CD markers by lymphocytes of sheep blood are given. For this, the immunoperoxidase staining method with monoclonal antibodies to IgM, CD19, CD5, CD4, CD8, CD16 was used. For the experiment, blood samples were taken from 11 sheep of the Romanov breed aged 5-6 years. Animals ($n = 5$) were immunized subcutaneously with inactivated colibacillosis vaccine. Studies were performed before and after vaccination on the 1st and 2nd day of the immune response. As studies have shown, the parameters of B cells obtained by the IPO method using monoclonal antibodies to bovine IgM and to the human B-lymphocyte CD19 receptor have a high degree of correlation ($r = 0.95$). On this basis, it can be concluded about partial interspecific homology of B-lymphocyte receptors. As a result of the research, it was established that on the 1st day of the post-vaccination immune response in the peripheral blood of sheep, the population of killer cells, granulocytes, macrophages and the cytotoxic lymphocytes increased. As a result of immunophenotyping by IPO using monoclonal antibodies to markers of bovine and human lymphocytes, it was established that the phenotypic characteristic of the blood lymphocytes of the first day post-vaccine immune response to an inactivated vaccine was $slgM^+/CD19^+/CD5^+/CD4^+/CD8^+/CD16^+$, respectively, second day - $slgM^+/CD19^+/CD5^+/CD4^+/CD8^+/CD16^-$.

этого был использован метод иммунопероксидазного окрашивания с моноклональными антителами к IgM, CD19, CD5, CD4, CD8, CD16. Для эксперимента были отобраны образцы крови 11 овец романовской породы в возрасте 5-6 лет. До эксперимента у животных брали кровь для определения лейкоформулы по стандартной методике. Иммунизировали животных (n=5) подкожно инактивированной вакциной против колибактериоза. Исследования проводили до и после вакцинации на 1-е и 2-е сутки иммунного ответа. Как показали проведенные исследования параметры В-клеток, полученные методом ИПО с использованием моноклональных антител к IgM рогатого скота и к CD19-рецептору В-лимфоцитов человека, имеют высокую степень корреляции ($r=0,95$). На этом основании можно сделать вывод о частичной межвидовой гомологии рецепторов В-лимфоцитов. В результате проведенных исследований установлено, что в 1-е сутки поствакцинального иммунного ответа в периферической крови овец в три раза увеличивается популяция клеток-киллеров, гранулоцитов и макрофагов и в два раза цитотоксических лимфоцитов. В результате иммунофенотипирования методом ИПО с использованием моноклональных антител к маркерам лимфоцитов рогатого скота и человека установлено, что фенотипической характеристикой лимфоцитов крови овец первых суток поствакцинального иммунного ответа на инактивированную вакцину является $slgM^+/CD19^+/CD5^+/CD4^+ CD8^+ CD16^+$, соответственно, вторых суток - $slgM^+/CD19^+/CD5^+/CD4^+ CD8^+ CD16^+$.

Жизнедеятельность клеток сопровождается постоянным движением белков, в том числе CD (кластеров дифференцировки), по цитоплазматической мембране. Количественная характеристика данных молекул может служить диагностическим ориентиром не только при оценке иммунного статуса, но и для изучения механизмов поствакцинального иммунного ответа. CD-рецепторы являются маркерами функционального состояния клеток в определенный промежуток времени. В настоящей работе приведены экспериментальные данные исследования динамики экспрессии CD-маркеров лимфоцитами крови овец. Для этого был использован метод иммунопероксидазного окрашивания (ИПО) с моноклональными антителами к IgM, CD19, CD5, CD4, CD8, CD16.

Лимфоциты делятся на две основные популяции Т- и В-клеток со своими, только им присущими CD-маркерами. В корковой зоне Т-клетки начинают экспрессировать молекулы CD4, CD8, обуславливая реаранжировку генов, вследствие чего каждый тимоцит приобретает свой определенный $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор. Маркером Т-клеток служит CD-рецептор для антигена, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов - гетеродимер из двух полипептидных цепей ($\alpha\beta$ или $\gamma\delta$) с константными и переменными доменами, соединенных дисульфидными связями. Дифференцировочные белки семейства иммуноглобулинов влияют на развитие и функциональную активность иммунокомпетентных клеток, а также определяют их фенотип. Количество поверхностных маркеров клеток изменяется, так как постоянно происходит рециркуляция мембранных белков. Например, скорость интернализации CD4-молекул составляет 2% поверхностных молекул в минуту, при этом 40% всех молекул CD4 находится внутри клетки. При этом изменения уровня экспрессии CD8-маркера на Т-клетках инициирует модуляцию иммунного ответа [1].

При определенных условиях лимфоциты могут редактировать свои рецепторы. МНС класса II-рестриктированные $CD4^+CD8^-$ тимоциты, экспрессирующие перфорин, могут при определенных условиях изменить фенотип на $CD4^+CD8^+$.

Образование В-клеток начинается в эмбриональной печени, затем в течение жизни организма в костном мозге - важнейшем кроветворном органе, где развиваются различные клоны В-клеток. Развитие этой популяции лимфоцитов зависит от экспрессии пре-BCR (рецептор В-клеток для антигена), сформированного из молекул суперсемей-

ства иммуноглобулинов - $slgM$ и $CD79$, а также $IL-7R\alpha$. При отсутствии этих рецепторов снижается количество периферических В-клеток. Пре-В клетки могут впоследствии проходить продуктивную реаранжировку генов легких цепей, чтобы стать IgM -несущими В-клетками. Незрелые, несущие мембранный иммуноглобулин IgM В-лимфоциты легко становятся иммунологически толерантными или погибают после контакта с антигеном. В формировании рецептора В-клеток (BCR) принимают участие три компонента: мембранная форма IgM и два полипептида $Ig\alpha$, $Ig\beta$ ($CD79$). В цитоплазме пре-В-клеток обнаруживается тяжелая μ -цепь IgM . Наивная В-клетка на своей поверхности экспрессирует полные молекулы данного иммуноглобулина. Циркулирующая фолликулярная и экстра-фолликулярная В-клетки также несут на своей мембране $slgM$ [2].

Цитоплазматическая часть мембранного IgM состоит из трех аминокислотных остатков, которых не достаточно для формирования структурных мотивов, поэтому сигнал передается через ассоциированные с ним гликопротеиды $Ig\alpha$, $Ig\beta$, которые подвергаются фосфорилированию. Мембранные IgM ориентированы Fab-областью по направлению к внешней среде, тогда как Fc-фрагмент находится в контакте с клеточной поверхностью. S- IgM содержит на С-концах тяжелых цепей домены, образованные гидрофобными аминокислотами, которые удерживают молекулу Ig на наружной поверхности мембраны.

В онтогенезе дифференцировка в зрелые В-клетки сопровождается изменением фенотипа поверхности лимфоцита, определяемого с помощью моноклональных антител методами иммуноцитохимии.

Специфичность антигенного рецептора лимфоцита в течение жизни может подвергаться редактированию. Это происходит как с поверхностными иммуноглобулинами В-клеток, так и с Т-клеточными рецепторами, которые принадлежат к одному суперсемейству иммуноглобулинов. В результате реактивации генов RAG, образованию новых легких и тяжелых цепей, изменяется специфичность рецепторов.

Антитела, продуцируемые $CD5^+B-1$ -лимфоцитами, в основном, IgM . Эти лимфоциты предназначены для быстрого реагирования на наиболее распространенные антигены клеточных стенок бактерий и преимущественно специфичны к тимуснезависимым антигенам

Для активации В-клеткам необходимы костимулирующие рецепторы - Ig -подобная молекула $CD19$, регулятор активации компонента $CD21$ ($CR2$) и $CD81$. Рецептор $CD19$ В-клеток играет важную роль в трансдукции позитивного сигнала как при Т-зависимом, так и Т-независимом иммунных ответах. Так в его отсутствии блокируется позитивная селекция В-лимфоцитов и усиливается редактирование В-клеточного рецептора [3].

В организме происходит постоянное взаимодействие лигандов с рецепторами иммунокомпетентных клеток, что

Рис. Рецепторная характеристика первых суток поствакцинального иммунного ответа.

Fig. Receptor characterization of the first day post-vaccine immune response.

приводит к перераспределению последних на поверхности лимфоцитов и изменению функциональной активности клетки и, следовательно, её фенотипа. У животных данные процессы изучены недостаточно, поскольку идентификация лимфоцитов является сложной задачей из-за отсутствия на отечественном рынке препаратов антител к CD-рецепторам животных.

Целью исследований было определение фенотипа лимфоцитов крови овец в первые сутки иммунного ответа, а также изучение возможности использования метода иммунопероксидазного окрашивания на основе моноклональных антител мыши к CD рецепторам лимфоцитов человека.

Материалы и методы

Для эксперимента были отобраны образцы крови 11 овец романовской породы в возрасте 5-6 лет. До эксперимента у животных брали кровь для определения лейкоформулы по стандартной методике. Иммунизировали животных ($n=5$) подкожно инактивированной вакциной против колибактериоза. Исследования проводили до и после вакцинации на 1-е и 2-е сутки иммунного ответа. Лимфоциты крови выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 при 3000 об/мин. в течение 45 мин. Концентрацию мононуклеарных клеток в суспензии доводили до $1,0 \cdot 0,5 \times 10^6$ кл/мл. Определение количества лимфоцитов в крови проводили методом иммунопероксидазного окрашивания (ИПО) [4]. Для удаления экзогенных иммуноглобулинов 100 мкл взвеси мононуклеарных клеток крови обрабатывали 1%-ным раствором лимонной кислоты в течение 1 мин., центрифугировали 5-кратно в фосфатном буфере (PBS pH 7,2) при 1100 об/мин. по 5 мин. Взвесь клеток фиксировали этанолом на предметном стекле. Блокаду пероксидазы проводили 1%-ным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. В качестве блокирующего раствора использовали 10%-ный раствор сыворотки лошади. Инкубировали 60 мин. при комнатной температуре и тщательно отмывали клетки фосфатным буфером pH 7,2 (PBS). К фиксированным клеткам добавляли моноклональные антитела к IgM рогатого скота (1:400). Также использовали набор моноклональных антител к CD19, CD5, CD4, CD8, CD16 (ООО "Сорбент" согласно инструкции производителя). Затем добавляли антивидовой конъюгат в рабочем разведении (1:1500). Для визуализации пероксидазы использовали 3-амино-9-этилкарбазолом (АЕС "Sigma"). АЕС-позитивные клетки идентифицировали по красно-коричневому окрашиванию при просмотре препаратов под микроскопом ($\times 1000$).

Результаты и обсуждение

До эксперимента у овец брали кровь для определения относительного количества лейкоцитов крови. Проведенный анализ показал, что относительное количество сегментоядерных нейтрофилов составляет $36,3\% \pm 2,6$, а лимфоцитов - $49,6\% \pm 2,2$, что находится в пределах нормы у овец.

В результате проведенных исследований установлено, что в 1-е сутки поствакцинального иммунного ответа в периферической крови овец в три раза увеличивается популяция клеток-киллеров, гранулоцитов и макрофагов и в два раза цитотоксических лимфоцитов (рис.).

CD16 является линейным маркером клеток-киллеров, а также встречается на поверхности макрофагов и нейтрофилов. CD16 - это рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулинов класса G и обозначается как Fc γ RIIIA. В первые сутки иммунного ответа клетки-киллеры могут выступать в качестве регуляторных клеток. Иммунокорректирующие свойства киллерных лимфоцитов проявляются по отношению к гранулоцитам и антигенпрезентирующим клеткам [5].

При введении вакцины в организме овец активируются прежде всего клетки врожденной иммунной системы. Гранулоциты, моноциты, клетки-киллеры, получив антигенный сигнал, активируются и способствуют развитию иммунного ответа на введенный антиген. В процессе иммуногенеза формируется иммунная клеточная сеть, связанная продукцией клетками низкомолекулярных белков (цитокины) с разнообразным спектром функциональной активности. Цитокины регулируют клеточные реакции, принимая непосредственное участие в формировании поствакцинального иммунного ответа.

Как видно на диаграмме (рис.) в 1-е сутки поствакцинального иммунного ответа произошло повышение уровня лимфоцитов с CD8-рецепторами. Это может быть связано с тем, что CD8-маркер также экспрессируется на CD16⁺ клетках-киллерах.

Уровень В-клеток с фенотипом slgM⁺/CD19⁺/CD5⁺ и CD4⁺ Т-клеток в первые двое суток иммунного ответа на инактивированную вакцину практически не изменялся.

Как показали проведенные исследования параметры В-клеток, полученные методом ИПО с использованием моноклональных антител к IgM рогатого скота и к CD19-рецептору В-лимфоцитов человека, имеют высокую степень корреляции ($r=0,95$). На этом основании можно сделать вывод о частичной межвидовой гомологии рецепторов В-лимфоцитов [6].

В результате иммунофенотипирования методом ИПО с использованием моноклональных антител к маркерам лимфоцитов рогатого скота и человека установлено, что фенотипической характеристикой лимфоцитов крови овец первых суток поствакцинального иммунного ответа на инактивированную вакцину является slgM⁺/CD19⁺/CD5⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD16⁺, соответственно, вторых суток - slgM⁺/CD19⁺/CD5⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD16⁺. Таким образом, показано, что рецепторный профиль лимфоцитов в процессе иммуногенеза меняется в течение первых суток, отражая этапы формирования иммунного ответа.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0578-2014-0018. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Ездакова И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных / И.Ю.Ездакова. - М.: Компания Спутник+, 2008. - 88 с.: ил.; Библиогр.: с.72-73. - 500 экз. - ISBN 978-5-364-01149-7.
 - Бурмистер Г.-Р., Пецутто А. Наглядная иммунология. 2007. - Москва-Бином. - 320с.
 - Сидорова Е.В. Что нам известно сегодня о В-клетках // Успехи совр.биол.2006. 126.№3.С.227-241
 - Ездакова И.Ю., Капустина О.В. Определение В-клеток в крови крупного рогатого скота методом иммунопероксидазного окрашивания // Российская сельскохозяйственная наука. 2018. №3. С.40-43.
 - Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров -М: Медицина-Здоровье, - 2005. -465 с.
 - Sopp P., Werling D., Baldwin C. Cross-reactivity of mAbs to human CD antigens with cells from cattle// Veterinary Immunology and Immunopathology.2007.119. P. 106-114
- #### References
- Ezdaikova I.Yu. Immune recognition receptors in animals / I.Yu.Ezdaikova. - M.: Sputnik +, 2008. - 88 pp., Il.; Bibliography: pp.72-73.-500 copies. - ISBN 978-5-364-01149-7.
 - Burmester G.-R., Pezutto A. Visual Immunology. 2007.- Moscow-Binom.-320p.
 - Sidorova E.V. What do we know today about B cells // Successes of modern biology.2006.126.№3.P.227-241
 - Ezdaikova I.Yu., Kapustina OV Determination of B-cells in the blood of cattle by immunoperoxidase staining // Russian agricultural science.2018.№3.P.40-43.
 - Sepiashvili R.I., Balmasova I.P. Physiology of natural killers - M: Medicine-Health, - 2005.-465 p.
 - Sopp P., Werling D., Baldwin C. Cross-reactivity of mAbs to human CD antigens with cells from cattle// Veterinary Immunology and Immunopathology.2007.119. P. 106-114

Для цитирования / For citation

Рецепторный профиль лимфоцитов крови вакцинированных овец/ Ездакова И.Ю. [и др.] //Ветеринария и кормление.- М.,2019.-№4 С.8-10

Receptor profile of blood lymphocytes of vaccinated sheep/ Ezdaikova I.Yu. [et al.]// Veterinaria i kormlenie. -М., 2019. - № 4 P.8-10