

РЕЦЕПТОРИ ПОВЕРХНЕВИХ СТРУКТУР ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН У ТВАРИН. СУЧАСНІ МЕТОДИ ЇХ ВИЗНАЧЕННЯ

І. Я. Коцюмбас, М. І. Жила, Н. В. Шкодяк, О. Й. Сободош, С. Я. Мартиник

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

У статті наведено аналітичний огляд сучасних уявлень про імуноглобулінові рецептори основних імунокомпетентних клітин у тварин та їх роль у становленні адаптивного імунітету. Аналіз даних літератури свідчить про відкриття все нових Ig-подібних структур клітин у різних групах тварин, що дозволяє встановити еволюційні механізми формування специфічного імунітету та розробити нові підходи до діагностики і лікування різних захворювань. Оцінені перспективи застосування методів визначення морфофункціонального стану клітин імунітету тварин із використанням моноклональних антитіл. Відзначена провідна роль методів імунохімії у розвитку сучасної фундаментальної та прикладної імунології.

Провідна роль у реакціях набутого (адаптивного) імунітету людини і тварин належить лімфоцитам, відповідальним за специфічне розпізнавання патогенних організмів. Взаємодія лімфоцитів з антигенами і між собою здійснюється за допомогою мембранних рецепторів клітини, які через відповідні внутрішньоклітинні молекули трансформують антигенний сигнал у клітинні реакції [1, 15, 16].

Фундаментальні відкриття та нові методи дослідження в галузі молекулярної біології, зокрема, гібридомна технологія створення моноклональних антитіл (МКА), дозволили виявити на поверхні лімфоцитів та інших імунокомпетентних клітин специфічні молекули рецепторів, які слугують маркерами різних субпопуляцій і груп (кластерів) клітин [6, 12].

Для вивчення та встановлення механізмів імунної системи у 1982 році була створена номенклатура, яка характеризує клітини кровотворної і лімфоїдної системи за поверхневими маркерами. Згідно з міжнародною класифікацією всі основні антигенні маркери лімфоцитів позначаються як кластери диференціювання або CD (від англ. cluster differentiation), та відповідними номерами. На даний час створена єдина номенклатура системи CD, яка складається із більш ніж 300 диференційованих молекул клітин людини. 30 % CD-антигенів відноситься до родини імуноглобулінів [9, 17].

Корисно враховувати таку схему функціонального розподілу клітин імунітету за CD ознакою [6, 8]:

1. Первинно зв'язані з Т-клітинами:

CD1 — кортикальні тимоцити;

CD2 — усі Т-клітини: тимусні та клітини периферійних лімфоїдних органів, а також НК-клітини;

CD3 — Т-клітини периферійних лімфоїдних органів;

CD4 — хелперні клітини (частина Т-лімфоцитів периферійних органів);

CD5 — усі Т-клітини та деякі В-лімфоцити;

CD7 — усі Т-клітини;

CD8 — цитотоксичні клітини та деякі НК-клітини.

2. Первинно зв'язані з В-клітинами:

CD10 (CALLA) — В-клітини, які розвиваються;

CD19 — В-лімфоцити, які розвиваються і зрілі, але не плазмоцити;

CD20 — зрілі лімфоцити, а також В-клітини, які розвиваються та експресують CD19;
 CD22 — зрілі В-клітини.

3. Первинно зв'язані з моноцитами і макрофагами:

CD13 — незрілі та зрілі (диференційовані) моноцити і гранулоцити;

CD14 — усі моноцити;

CD15 — усі гранулоцити (не лейкоцити, а мононуклеарні гранулоцити);

CD33 — клітини-попередники в кістковому мозку та моноцити.

4. Первинно зв'язані з NK-клітинами:

CD16 — усі NK-клітини і гранулоцити;

CD56 — усі NK-клітини і частина Т-лімфоцитів.

5. Первинно зв'язані з клітинами-попередниками та стовбуровими клітинами:

CD34 — поліпотентні стовбурові клітини та клітини-попередники багатьох ліній гемопоезу.

Згідно з даними літератури, у процесі еволюції тваринного світу з ускладненням будови тіла виникали нові молекулярні компоненти імунної системи [2, 3]. Зокрема, підкласи імуноглобулінів появилися пізніше класів, тому вони значно відрізняються у групах тварин (табл.). Виявлено, що становлення набутої імунної реактивності та її зв'язок із неспецифічними факторами здійснюється за допомогою антибактеріальних пептидів, побудованих із С2-доменів. До них відносяться такі білки як гемолін, інгібіторні рецептори натуральних кілерів (NK-клітин) і Т-клітин. Ці молекули вважаються попередниками антигенного рецептора Т-клітин і поверхневого імуноглобуліну В-клітин [17, 23]. Деякі вчені вважають імуноглобулін М найбільш філогенетично древнім з усіх ізотопів [6].

Таблиця

Основні клітинні та молекулярні компоненти імунної системи різних груп тварин

Тварини	Компоненти імунної системи
Ссавці	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig G, M, A, E, D, Thy-1, CD56, KIR
Птахи	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig G, M, A
Рептилії	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig M, Y
Амфібії	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig M, Y
Кісткові риби	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig M
Хрящові риби	Фагоцити, Т-, В-клітини, МНС, Ig M, W
Голкошкірі	Фагоцити, Thy-1, CD56, KIR

Упродовж еволюції багатоклітинних організмів відбувся перехід від гомофільної міжклітинної взаємодії до більш удосконаленої гетерофільної взаємодії для розпізнавання чужорідних агентів. Особливий інтерес викликали антибактеріальні пептиди гемолін гігантської шовковичної молі *Hyalophora cecropia* і захисна молекула молюска *Lymnaea stagnalis*, які побудовані з імуноглобулінових доменів (С2-доменів), здатних розпізнавати і нейтралізувати бактеріальні антигени [20]. Встановлено 14 рецепторів родини KIR (killer Ig-like receptors) натуральних кілерів не тільки у хребетних тварин, але і в голкошкірих.

Групою авторів описано структуру нового антигенного рецептора (NAR) в акулі-няньки (*Ginglymostoma cirratum*), який має трансмембранну і хвостову ділянку, і за цими ознаками подібний до імуноглобулінів ссавців [23].

На сьогодні відомо більш, ніж 200 різних маркерів клітин, які є факторами міжклітинної взаємодії. За структурними характеристиками виділяють сім родин рецепторів адгезії: суперродина імуноглобулінів (Ig), родина інтегринів (In), селектинів (Sl), муцинів (Mc), кадхеринів (Cd), молекул аналогічних до рецепторів фактору некрозу пухлин і

фактору росту нервів (TNF/NGF-R), мембраноасоційованих екстраферментів і компонентів екстраклітинного матриксу (Lf – link family) [6, 22].

Розробка нових імунологічних методів призвела до відкриття все нових рецепторних молекул, функціонально важливих для онто- і імуногенезу. Так, Ramanathan B. et al. у 2004 році клонували рецептор мієлоїдних клітин TREM-1 із клітин кісткового мозку великої рогатої худоби, який є членом родини імуноглобулінів. Було показано, що TREM-1 посилює експресію адгезивних молекул на імунокомпетентних клітинах, сприяючи міжклітинним контактам [16, 21].

T-лімфоцити — найбагаточисельніша популяція клітин імунної системи, яка за функціональними властивостями є різномірною. Серед них розрізняють: T-лімфоцити-індуктори/хелпери і T-лімфоцити-супресори/цитотоксичні клітини [18, 20]. Маркер CD4, в основному, зв'язаний з хелперною, індуктивною активністю, і виявляється у 95 % T-клітин. Клітини з маркером CD8, володіють переважно цитотоксичною активністю. 50 % T-клітин, морфологічно представлених малими негранульованими лімфоцитами, також несуть маркер CD8. Маркер CD1 присутній тільки на незрілих лімфоцитах, які розвиваються, а для всіх зрілих T-лімфоцитів характерним є наявність маркерів CD3, CD2, CD5 і CD7 [8, 10].

У периферійній крові ВРХ виявлено: 20–40 % CD4 клітин, 10–20 % CD8 T-клітин, 5–30 % $\gamma\delta$ T-клітин, 5–20 % WC 1 $\gamma\delta$ -T-клітин [19, 21].

Особливістю T-клітинного рецептора є здатність розпізнавати антиген тільки у комплексі з власними клітинними антигенами на поверхні допоміжних антиген-презентуючих клітин (дендритних чи макрофагів). На відміну від В-лімфоцитів, здатних розпізнавати антигени в розчині і зв'язувати білкові, полісахаридні і ліпопротеїдні розчинні антигени, T-лімфоцити здатні розпізнавати тільки короткі пептидні фрагменти білкових антигенів, репрезентовані на мембрані інших клітин у комплексі з власними антигенами головного комплексу гістосумісності (ГКГС) [6].

CD4 T-лімфоцити здатні розпізнавати антигенні детермінанти в комплексі з ГКГС молекулами II класу [10]. Вони виконують посередницьку сигнальну функцію, передаючи інформацію про антигени імунокомпетентним клітинам. У гуморальній імунній відповіді T-хелпери реагують з несучою частиною тимусзалежного антигену, індукуючи перетворення В-лімфоцитів у плазмацити, посилюючи синтез антитіл на один-два порядки. T-хелпери – довгоживучі лімфоцити, що містять рецептори до мітогенів, та індукують утворення цитотоксичних T-лімфоцитів [9].

CD8 T-лімфоцити беруть участь у формуванні імунологічної толерантності, їх цитотоксична функція полягає у здатності руйнувати інфіковані та злоякіснозмінені клітини. Ці клітини здатні розпізнавати широкий спектр антигенних детермінант, що можна пояснити низьким порогом активації їх рецепторного апарату або наявністю декількох специфічних рецепторів. Вони містять рецептори до мітогенів, дуже чутливі до іонізуючої радіації та мають короткий період життя [1, 4, 7].

Виявлено, що у периферійній крові новонароджених телят переважають WC1-T-клітини (workshop cluster I) — трансмембранні глікопротеїни, які експресуються на різних субпопуляціях $\gamma\delta$ -T-клітин [21]. Їх кількість при народженні досягала до 45 %, у річному віці – 30 %, а у дорослих тварин – 10 %. Чисельність CD2-T-лімфоцитів із віком практично не змінювалася: 25 % — при народженні телят, 30 % – у дорослих тварин [20].

В-лімфоцити, порівняно з T-клітинами, мають на поверхні клітинної мембрани значно більшу кількість Ig-подібних рецепторів [5]. Клітинна оболонка В-лімфоцитів, що походять від стовбурових клітин, містить рецептори CD1 (спільні з T-клітинами), CD19 (sIgM-асоційована молекула), CD22 (адгезія В-клітин на моноцитах і T-лімфоцитах), CD28 (активація), CD31 (адгезія), CD32 (Fc-рецептор RII), CD50 (адгезія), CD79 (компоненти В-клітинного рецептора), CD80 (костимулятор), CD83 (участь у презентації антигену), CD86 (костимулятор), CD96 (взаємодія з CD62E) тощо [6, 18].

Дозрівають В-лімфоцити поетапно — спочатку в кістковому мозку, потім у селезінці, де розвиваються різні клони В-клітин. Виявлено, що попередники В-лімфоцитів (пре-В-клітини) з'являються на 16 день внутрішнього розвитку плоду людини [16]. На найбільш ранній стадії дозрівання на цитоплазматичній мембрані В-клітин експресуються імуноглобуліни класу М, дещо пізніше — в комплексі з ними з'являються імуноглобуліни G або А, а до моменту народження, коли відбувається повне дозрівання В-лімфоцитів, — імуноглобуліни D. Вважається, що у дозрілих В-лімфоцитів на цитоплазматичній мембрані присутні одразу три імуноглобуліни — М, G, D чи М, А, D. Ці рецепторні імуноглобуліни не секретуються, але можуть злизуватися з мембрани [9].

Одним із основних методів визначення Т-, В-лімфоцитів і їх субпопуляцій є непряма імунофлюоресцентна реакція з МКА до диференціювальних антигенів поверхні клітин [14]. Цей метод може використовуватися як для фундаментальних (вивчення механізму диференціювання лімфоцитів у процесі онто- і імуногенезу тварин), так і у прикладних (визначення субпопуляцій лімфоцитів) імунологічних дослідженнях залежно від вибору МКА.

МКА отримали широке розповсюдження як імунологічні реагенти у різних сферах біології та медицини, зокрема, при діагностиці інфекційних хвороб. Це стало особливо актуально, коли на фоні посиленої дії природних і антропогенних факторів на збудників інфекційних хвороб виникають біотиipi і варіанти мікроорганізмів із різко зміненими таксономічними ознаками [7, 12]. Відповідні набори МКА дозволяють виявити лімфоцити, які мають конкретні антигени. Як відомо, моноклональними називаються антитіла, які виробляються одним клоном клітин, що походять з однієї материнської клітини. На відміну від поліклональних, МКА мають молекулярну ідентичність і моноспецифічність, тобто взаємодіють тільки з певною антигенною детермінантою. Завдяки їх унікальній специфічності, МАК використовують для імунодетекції. Вони належать до імуноглобулінів класу G і містять 2 важких (H) і 2 легких (L) пептидних ланцюги, з'єднаних між собою дисульфідними містками. Внаслідок ферментативного розщеплення утворюються два F(ab)-фрагменти (antigen – binding fragment – фрагмент, що зв'язується з антигеном) і Fc-фрагмент. F(ab)-фрагмент містить антиген-зв'язуючу ділянку молекули, Fc-фрагмент являє собою залишкову частину молекули, його назва пов'язана зі здатністю до кристалізації. Молекула може розщеплюватися на F(ab')₂- і Fc-фрагменти, де F(ab')₂ – фрагмент, еквівалентний двом фрагментам F(ab) [1, 15].

Вивчення характеру локалізації та способу розподілу мембранних Ig-подібних рецепторів В-клітин у тварин різного віку є перспективним напрямом у рамках дослідження механізмів клітинної активації і енергії в процесах онто-і імуногенезу [2, 6, 18]. Поверхневі імуноглобуліни визначають за допомогою різних методів, що базуються на реакції антигену з антитілом, у тому числі в реакції імунофлюоресценції на живих і фіксованих клітинах [8, 11]. Принцип методу базується на тому, що антитіла здатні зв'язуватися із флуоресцентними барвниками, такими як флуоресцеїн ізотіоціанат і родамін, зберігаючи при цьому специфічність. Завдяки цьому флуоресцентні кон'югати антитіл, які взаємодіють з антигенами клітинної поверхні, можуть бути візуалізовані за допомогою флуоресцентного мікроскопу.

Принциповою основою імуногістохімічного методу є виявлення відповідного антигену за допомогою специфічних антитіл, які на нього наносяться, і зв'язані з незафарбованим ферментом (пероксидаза хрому, лужна фосфатаза), та наступним виявленням утвореного специфічного комплексу (антиген-кон'югована сироватка) шляхом додавання хімічних речовин (хромогенів), здатних перетворюватися у зафарбований продукт при окисненні киснем пероксидази хрому, що міститься в сформованому кон'югаті [8].

Аналізуючи доступні публікації, можна прийти до висновку, що вчені ветеринарної імунології найчастіше застосовують імунохімічний метод для індикації маркерів CD3, CD4,

CD8, TcR1, TcR2 — для індикації Т-лімфоцитів. Для індикації маркерів CD10, CD19, CD20, CD22, CD35 В-лімфоцитів використовують моноклональні сироватки IgM, IgG і IgA, а для виявлення поверхневих молекул макрофагів — моноклональну сироватку CVI [4, 5].

В И С Н О В К И

Отже, імуноцитохімічні і імуногістохімічні дослідження дозволяють визначати динаміку формування імунітету, тонко оцінити морфофункціональний статус імунокомпетентних клітин при захворюваннях тварин і вакцинації, вияснити невідомі раніше механізми взаємодії різноманітних клітинних складових імунітету, на принципово новому рівні визначити нормальну будову і функцію органів імунітету в нормі та при патології.

Аналіз даних літератури свідчить про відкриття все нових і нових Ig-подібних структур клітин у різних груп тварин, що дозволяє встановити еволюційні механізми формування специфічного імунітету та розробити нові підходи до діагностики і лікування різних захворювань тварин.

ANIMAL IMMUNECOMPETENT CELL'S SURFACE RECEPTORS. MODERN METHODS OF DETERMINING

I. Y. Kotsyumbas, N. I. Zhyla, N. V. Shkodyak, O. Yo. Sobodosh, S. Ya. Martynyk

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

The article presents an analytical overview of current ideas about the basic animal immunoglobulin receptors of immune cells and their role in the development of adaptive immunity. Analysis of the literature testifies the detection of many new Ig-like structures of cells in different groups of animals. It allows to establish evolutionary mechanisms of specific immunity and to develop new approaches to diagnosis and treatment of various animal diseases. The prospects of application of methods for determining of animal immune cell's morpho-functional state by using monoclonal antibodies are estimated. The leading role of immunochemistry methods in the development of modern basic and applied immunology is considered.

РЕЦЕПТОРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У ЖИВОТНЫХ. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

И. Я. Коцюмбас, Н. И. Жила, Н. В. Шкодяк, О. И. Сободош, С. Я. Мартынык

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В публикации приведен аналитический обзор современных представлений об иммуно-глобулиновых рецепторах главных иммунокомпетентных клетках у животных и их роль в становлении адаптивного иммунитета. Анализ данных литературы свидетельствует об открытии всё новых Ig-подобных структур клеток в разных группах животных, что даёт возможность установить эволюционные механизмы формирования специфического

иммунитета и разработать новые подходы к диагностике и лечению разных заболеваний. Оценены перспективы применения методов определения морфофункционального состояния клеток иммунитета животных с использованием моноклональных антител. Отмечена ведущая роль методов иммунохимии в развитии современной фундаментальной и прикладной иммунологии.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Бурместер Г. Р.* Наглядная иммунология / Г. Р. Бурместер, А. Пецутто. — М. : Бином, 2007. — 320 с.
2. *Галактионов В. Г.* Основные направления исследований в эволюционной иммунологии / В. Г. Галактионов // Известия РАН. Серия биологическая. — 2004. — Т. 6. — С. 645–658.
3. *Давтян Т. К.* Эволюция интегративной функции иммунной системы. Молекулярная эволюция антиген-распознающих рецепторов / Т. К. Давтян, Г. А. Геворкян, Д. А. Погосян // Успехи совр. биол. — 2005. — Т. 2. — С. 151–156.
4. *Ездакова И. Ю.* Динамика иммунологических показателей стельных коров / И. Ю. Ездакова // Ветеринарная патология. — 2007. — № 2. — С. 148–151.
5. *Ездакова И. Ю.* Поверхностные иммуноглобулины В-клеток крови крупного рогатого скота / И. Ю. Ездакова // Ветеринарная медицина. — 2007. — № 4. — С. 11–13.
6. *Ездакова И. Ю.* Рецепторы иммунного узнавания у животных / И. Ю. Ездакова. — М. : Компания Спутник+, 2008. — 88 с.
7. *Иванов А. В.* Радиоэкотоксикологическая микробиология / А. В. Иванов, Р. Н. Низамов, Э. М. Плотникова. — М. : Колос, 2009. — 680 с.
8. *Красников Г. А.* Перспективы использования гистологических и иммуногистохимических (иммунохимических) методов при изучении иммунитета животных / Г. А. Красников, П. А. Шутченко // Ветеринарная медицина. — Харьков, 2004. — Т. 84. — С. 384–389.
9. *Лаповець Л. Є.* Посібник з лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик, Г. Б. Лебедь, В. М. Акімова. — Львів, 2008. — 268 с.
10. *Макарков А. И.* Механизмы регуляции экспрессии поверхностных структур дифференцированного лимфоцита / А. И. Макарков, Г. В. Порядин, Ж. М. Салмаси // Иммунология. — 1997. — Т. 3. — С. 4–8.
11. Методические рекомендации по определению sIg В-клеток (иммунопероксидазное окрашивание) / ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко Россельхозакадемии. — М., 2011. — 14 с.
12. Моноклональные антитела. Гибридомы: новый уровень биологического анализа: Пер. с англ. / Под ред. Р. Г. Кеннета, Т. Дж. Манн-Керна, К. Б. Бехтол. — М.: Медицина, 1983. — С. 200–245.
13. *Новикова М. С.* Иммунофенотипическая характеристика лейкозных клеток в панели моноклональных антител : дисс. ... канд. мед. наук / М. С. Новикова. — М., 1990. — 21 с.
14. Определение поверхностных структур иммунокомпетентных клеток методом иммунофлуоресценции. Методические рекомендации / ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко Россельхозакадемии. — М., 2011. — 11 с.
15. *Рабсон А.* Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз. — М. : Мир — 2006. — 320 с.
16. *Ройт А.* Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М. : Мир, 2000. — 592 с.

17. Тутельян А. В. Прайминг фагоцитов и его применение в системе оценки специфической активности иммунорегуляторных соединений / А. В. Тутельян, Г. И. Клебанов // Иммунология. — 2004. — Т. 25, № 1. — С. 14–16.
18. Ярилин А. А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа / А. А. Ярилин // Иммунология. — 1999. — Т. 1. — С. 17–24.
19. Asai K. Predominant subpopulations of T lymphocytes in the mammary gland secretions during lactation and intraepithelial T lymphocytes in the intestine of dairy cows / K. Asai, Y. Komine, T. Kozutsumi // Veterinary Immunology and Immunopathology. — 2001. — P. 233–240.
20. Benoist Ch. T-lymphocyte differentiation and biology / Ch. Benoist, D. Mathis // In. Fundamental Immunology. — 1998. — P. 303–323.
21. Fikri Y. Purification and characterization of bovine WC1 $\gamma\delta$ -T lymphocytes from peripheral blood / Y. Fikri, J. Nyabenda, M. Denis // Vet. Research. — 2000. — Vol. 31. — P. 229–239.
22. Springer T. A. Adhesion receptors of the immune system / T. A. Springer // Nature. — 1990. — Vol. 346. — P. 425–434.
23. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR) / K. H. Roux, A. S. Greenberg, L. Greene et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 11804–11809.