УДК: 616. 097. 053. 2

Маслянко Р.Л., д.б.н, професор
Олексюк І.І., к.б.н., доцент
Божик Л.Я., к.в.н., асистент
Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького

РОЛЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ІМУНОДЕФІЦИТАХ

У статті дана характеристика В-лімфоцитів різного фенотипу та їх роль у тварин і людини з імунодефіцитним станом. Встановлено, що у більшості хворих тварин виявлено значне зниження усіх субпопуляцій В-лімфоцитів, особливо В-клітин пам'яті. При дослідженні клінічних проявів імунодефіциту в залежності від зниження В-клітин пам'яті показана схожість цього феномену з аутоімунною патологією та іншими лімфоденопатіями .

***Ключові слова**: В-лімфоцити, В-клітини пам'яті, імунодефіцит*

Комплексний імунодефіцит (КІД) – один із найбільш поширених імунодефіцитів, серед різних захворювань тварин [7, 11, 13]. Такий імунодефіцитний стан людини і тварин об'єднує групу дефіцитів природної резистентності, антитілоутворення, гетерогенну як за патогенезом, так і за клінічними та лабораторними аналізами. Цей імунодефіцит характеризується зниженням рівня імуноглобулінів різних класів, яким передує недостатність Т- і В- клітинних ланок імунітету, що призводить до розвитку рецидивуючих інфекційних захворювань. Найхарактернішою клінічною ознакою такого імунодефіциту є рецидивуючі інфекції дихальної системи. При цьому у значної кількості хворих розвиваються розлади шлунково-кишкового тракту, супутні лімфопроліферативні та аутоімунні патології [1, 5, 17]. У тварин з КІД нормальна або знижена кількість В-лімфоцитів у периферичній крові часто поєднується з з дефектом їх диференціації у відповідь на різноманітні стимули. Результатом дефекту диференціації В-клітин є відсутність плазмоцидів у лімфоїдних органах і порушення синтезу специфічних антитіл [6,7,21].

Активація та диференціація В-клітинами вимагають взаємодії їх з Т-клітинами, в процесі якої обидві клітини передають сигнали як через безпосередній контакт рецепторів з лігандами, так і через виділення цитокінів. Взаємодія між В-клітинами рецептором СД 27^+ та його лігандом СД 70 на активованих Т-лімфоцитах – гелперах є критичною для диференціації В-лімфоцитів у плазматичні клітини, які представляють собою «мікроскопічні фабрики по виробництву імуноглобулінів (антитіл)». Відомо, що СД 27^+ є маркером В-клітин пам'яті – субпопуляції В-клітин, які при активації антигеном швидко трансформуються спочатку у бластні клітини, а потім у плазмоцити. Молекули СД 27^+ належать до групи рецепторів фактора некрозу пухлин (ФНП), що контролюють диференціацію В- лімфоцитів [12,16,23].

Після цього – незалежного стану розвитку в кістковому мозку (КМ) В-лімфоцити залишають КМ і створюють популяцію первинних «незайманих» СД 27^+ В-лімфоцитів (naïve B-cells).

Після стимуляції лімфоїдних В-лімфоцити прямують в центри розмноження вторинних ліпоїдних органів (лімфовузлів, селезінки) і диференціюються у плазматичні клітини, або В-клітини пам'яті. В-клітини пам'яті беруть участь у вторинній імунній відповіді на вакцинацію чи спонтанне зараження конкретним збудником інфекції (табл. 1).

Таблиця 1

Участь В-лімфоцитів у первинній і вторинній імунній відповіді

Властивості	Первинна відповідь	Вторинна відповідь
Клітини, що беруть участь	Первинні «незаймані» В-лімфоцити	В-лімфоцити пам'яті
Після контакту з антигеном (активація)	4-7 днів	1-3 дні
Час появи імунітету	10-14 днів	8-10 годин
Напруженість імунітету	Залежить від антигену	У 100-1000 разів вища, ніж при первинній імунізації
Продукція ізотопів антитіл	Домінує IgM	Домінує IgG
Тип антигену	Т-залежні і Т-незалежні	Т-залежні
Афінність антитіл	Низька	Висока

В-клітини пам'яті (СД 27^+) розподіляються на дві субпопуляції: В-клітини пам'яті СД 27^+ $IgД^+$ (маргінальної зони селезінки та більш диференційовані СД 27^+ $IgД^-$ В-клітини пам'яті центрів розмноження фолікулів лімфатичних вузлів [22]. СД 27^+ $IgД^+$ беруть участь у Т- незалежній імунній відповіді, а СД 27^+ $IgД^-$ - у Т-залежній імунній відповіді організму на антиген і характеризуються здатністю переключення синтезу антитіл класу IgM на IgG (switched memory B cells) [4, 12, 19].

При наявності КІД значно порушується розвиток плазматичних клітин, В-клітин пам'яті, що вказує на дефект стадії диференціації В-лімфоцитів [10,18,24]. За даними [9, 11, 15], клінічні прояви у пацієнтів з КІД корелюють зі ступенем порушення В-клітин пам'яті.

Матеріали і методи досліджень. Визначення фенотипу В-лімфоцитів у крові телят з КІД, які належали навчально-науково-виробничому центру (ННВЦ) «Комарнівський» Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького, проведено на кафедрі епізоотології цього ж університету. Досліди проводились на двох групах телят раннього віку (дослідна, в кількості 12 голів – з наявними ознаками КІД і контрольна – 8 голів – клінічно здорові тварини). Діагноз КІД встановлено на підставі аналізу клітинних проявів та імунологічних порушень

згідно з критеріями ВООЗ та Європейського товариства первинних імунодефіцитів.

У всіх піддослідних телят визначали рівень імуноглобулінів у сироватці крові за методом Манчіні та осадження розчином сульфіту натрію (Na_2SO_3) за Р.П. Маслянко та ін. (2001).

Подальше імунологічне обстеження включало визначення кількості лімфоцитів та їх субпопуляцій (СД 3^+, СД 4^+, СД 8^+, СД 19^+) за допомогою методу проточної цитометрії (FACS can, "Becton Dickinson").
Визначення кількості субпопуляції В-лімфоцитів проводили шляхом трикольорової проточної цитофлуорометрії за B.L. Ferry et.al. (2005).

Принцип методу полягає в тому, що 50 мл гепаринізованої крові обробляють сумішшю моноклональних антитіл СД 27-FITC (BD- Biosciences, USA), анти- IgD-Biotin (BD-Biosciences, USA) та СД 19-PE (BD-Biosciences, USA) протягом 30 хв. при кімнатній температурі у темному місці. Потім лізують еритроцитарну масу за допомогою 1,5 мл розчину FACS lyse (BD-Biosciences, USA) протягом 10 хв. у затемненому місці. Клітини двічі відмивають забуференим фосфатами фізіологічним розчином (PBS) по 5 хв. при 500д. Відмиті клітини відмивають і ресуспензують в 400 мл 1 % - розчину формальдегіду. Зчитування результатів проводять на проточному цитометрі FACS can не пізніше 24 год. після зафарбування.

Результати дослідження. Перші симптоми захворювань телят у вигляді діареї з'явились вже на другу добу життя. Середній вік встановлення діагнозу КІД - 14 днів (3-18 днів).

При дослідженні імуноглобулінів всіх трьох класів у сироватці крові було вияснено, що найбільш вираженого зниження зазнавали IgG у хворих телят на КІД 1,8±0,05 г/л, при нормальному рівні 2,9±0,1 г/л. Рівень IgA був в межах норми тільки у одного хворого теляти, всі інші дослідні тварини мали нижчий вміст цього секреторного імуноглобуліну у сироватці крові, у п'яти із дванадцяти телят він був менше 0,2 г/л. Нормальний вміст IgM (більше 0,4 г/л) спостерігали у семи обстежених телят дослідної групи.

За кількістю В-лімфоцитів у крові телята з вираженою діареєю поступалися тваринам контрольної групи, їх відносне число наближалося до нижньої межі нормального рівня, характерного для клінічно здорових тварин (10,9±0,8% проти 12,3±1,1%).

Щодо абсолютного числа В-лімфоцитів у крові, то воно також було меншим у хворих телят, відповідно 246±21 мм^3 проти 318±24 мм^3 ($P<0,01$).

Циркулююча в крові кількість В-лімфоцитів в одному дослідженні представлена двома різними субпопуляціями й розподіл цих субпопуляцій відображає антиген-залежну та антиген-незалежну диференціацію В-клітин у первинних і вторинних лімфоїдних органах. Дослідження експозиції молекул СД 27 та IgD дозволяє відрізнити первинні «незаймані» СД 27^- та IgD^+ В-лімфоцити від СД 27^+IgD^+ активних В-лімфоцитів маргінальної зони селезінки та СД 27^+ IgD^- В-лімфоцитів з переключеним синтезом імуноглобулінів ізотипів IgG та IgA (табл. 2).

Таблиця 2

Субпопуляції В-лімфоцитів у крові телят із КІД

№ тварини	СД 19^+, %	Лімфоцити, $мм^3$	СД 27^+	$IgД^+27^-$, % В-клітин	$IgД^+27^+$, % В-клітин	$IgД^-27^+$, % В-клітин
72	11,2	1094	3,8	83,4	1,4	2,8
136	12,3	1310	5,4	79,6	2,3	2,2
76	10,7	1784	5,7	87,2	3,1	5,1
112	14,3	2310	6,7	84,4	2,6	1,2
64	13,8	1968	1,2	81,7	1,1	1,1
69	14,5	2943	2,7	89,6	2,7	0,6
70	17,8	1762	3,4	74,4	2,3	0,7
73	8,4	2752	3,9	90,5	2,6	2,1
80	10,7	3105	2,5	89,6	7,1	1,4
117	11,5	1925	5,7	73,1	2,9	0,9
78	9,4	2112	11,4	76,7	3,3	1,5
81	9,5	1877	10,5	68,8	2,6	1,7

Як видно із таблиці 2, у хворих телят з КІД були знижені рівні всіх субпопуляцій В-лімфоцитів циркулюючої крові.

Аналіз експресії молекули СД 27 на СД 19^+ В-лімфоцитах крові телят показав, що кількість В-клітин, фенотипу СД 19^+ СД 27^+ знижена у хворих тварин порівняно з контрольною групою ($P<0,05$). Кількість В-клітин пам'яті СД 27^+ була меншою у восьми із дванадцяти тварин в середньому на 13,6±0,9% ($P<0,05$). Подібне зниження В-клітин пам'яті у дітей з наявністю загального варіабельного імунодефіциту вказують також роботи інших авторів [10, 21].

Результати досліджень показали, що майже у всіх телят КІД (9 із 12 - 78,8%) спостерігалось зниження рівня СД $27^+IgД^-$ В-лімфоцитів з переключеним синтезом імуноглобулінів (8,6±0,3%) від загальної кількості В-лімфоцитів, загальне число 8±0,1 $мм^3$ порівняно з телятами групи контролю - 9,2±0,1 $мм^3$ ($P<0,05$) – табл. 3.

Із таблиці 3 видно, що достовірне зниження В- клітин телят дослідної групи супроводжується значним (майже у два рази) зменшенням рівня всіх субпопуляцій В-лімфоцитів пам'яті. Існують дані, що кількість СД 27^+ $IgД^+$ В-клітин з переключеним синтезом імуноглобулінів відображає функцію центрів розмноження лімфоїдних органів, порушення якої спостерігається майже у всіх хворих на КІД [16, 20, 21].

Аналіз Т-лімфоцитів показав нормальну кількість СД 3^+ Т-клітин, хоча відносне їх число було достовірно вище у телят із КІД порівняно з тваринами контрольної групи (77,5±1,9 та 68,2±2,1 відповідно). Кількість СД 4^+ Т-гелперів (750±2,3 $мм^3$, 35,6±2,2%), але число СД 8^+ Т-клітин було достовірно вищим у телят із КІД (780±63 $мм^3$, 24,1±1,2) ($P<0,01$). Підвищення активності СД 8^+ Т-

супресорів у телят із КІД також підтверджують праці інших авторів в дослідах на дрібних лабораторних тваринах [22].

Таблиця 3

Субпопуляції В-лімфоцитів у крові хворих і здорових телят (M±m)

Показники	Дослідна група (КІД)	Контрольна група (здорові)
Вік телят, дні	2-30	2-30
Лімфоцити, мм^3	2600±320	2170±230
СД 19$^+$, % лімфоцитів	11,20±1,2	15,75±1,1*
СД 27$^+$, % В-клітин	7,8±0,4	13,6±1,1**
СД 27$^-$ IgД$^+$ "незаймані" лімфоцити, % В-клітин	73,4±3,6	72,6±3,1
СД 27$^+$ IgД $^+$ В-лімфоцити, % В-клітин	3,6±0,2	6,7±0,3*
СД 27+ IgД$^-$ В-лімфоцити пам'яті, % В-клітин	4,3±0,2	7,9±0,4**

На даний час завершується дослідження “EUROclass” з удосконаленням класифікації КІД з урахуванням патогенетичних і клінічних аспектів імунодефіциту. На думку багатьох вчених цей вид імунодефіциту слід представити як загальний варіабельний імунодефіцит (ЗВІД).

Основним класифікаційним параметром залишаються В-клітини пам'яті з переключеним синтезом імуноглобулінів, оскільки вони відображають порушення функції центрів розмноження, що характерно для більшості тварин і людей з гіпоімуноглобулінеміями.

Таким чином, можна прийти до висновку, що у більшості хворих з наявністю КІД виявлено суттєве зниження рівня всіх субпопуляцій В-лімфоцитів пам'яті. Виявлено кореляцію клінічних проявів дефіцитів зі зниженням числа В-клітин пам'яті.

Дослідження В-клітин пам'яті може свідчити про ступень порушення гуморальної ланки імунної системи у хворих на КІД. Кількість Т-лімфоцитів пам’яті має прогнозуюче значення для перебігу імунодефіциту і вказує на необхідність посиленого моніторингу у тварин з низькими показниками імунологічної пам'яті.

Література

1. Кравців Р.Й. Імунологічна пам’ять – основа специфічного імунітету / Р.Й. Кравців, Р.П. Маслянко // Наук. вісник ЛАВМ - 2005 - Т.7 (26) - С.80-86.

2. Кравців Ю.Р. Т- і В-лімфоцити різних субпопуляцій у крові корів і їх телят / Ю.Р. Кравців // Зб. наук. статей до 100-річчя ЛАВМ - 1997 - С. 337-339.

3. Кравців Р.Й. Т- і В-лімфоцити і їх регуляторні функції / Р.Й. Кравців, Р.П. Маслянко // Наук. вісник ЛНАВМ - 2007 - Т.9(44) – С. 67-72.

4. МаслянкоР.П. Взаємодія клітин з процесі імуногенезу / Р.П. Маслянко, Ю.Р. Кравців // Біологія тварин - 2001 - Т. 3 (1) - С. І8-23.

5. Маслянко Р.П. Специфічний набутий імунітет у телят різного віку: дозрівання імунокомпетентних лімфоцитів / Р.П. Маслянко, Т.С. Матвіїшин // Наук. вісник ЛНУВМ - 2004 - Т.6 (3) - С.64-68.

6. Маслянко Р.П. Формування імунної відповіді організмі телят / Р.П. Маслянко, Т.С. Матвіїшин // Вет. біотехнологія. - 2005 - №7. - С. 121-128.

7. . Agamatsu K., Futatatni T., Hakibara S. et al. Absence of memory B-cells memory compartment in common variable immunodeficiency // Clin. Immunol. - 2002 - v. 103. - P.34-42.

8. Alaehkar H., Taubenhaeim N., Haeney M. et al. Memory switched B-cells percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency // Clin. Immunol - 2006. - v. 120 - P. 310-318.

9. Carsetti R. The loss of IgM memory B-cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency / R. Carsetti, M. Rosado // J. Allergy Clin. Immunol. - 2005 - v. l 15 (2) - P. 412-417.

10. Casola S. Control of peripheral B-cell development / S. Casola // Curr Opin. Immunol. – 2007. – v. 19. – P. 143-150.

12Conley M.E. Molecular basis of immunodeficiency / M.E. Conley // Immunol. Rev. 2005. - v. 203. - P. 5-9.

12.Conley M.E. Getic analysis of patients with defects in early B-cell development / M.E. Conley, A. Broider // Immunol. Rev. - 2005 - v.203. - P.216-234.

13. Detkova D. Association between memory B-cells and lung diseases / D. Detkova // Chest. – 2007 – v. 19. – P. 137-143.

14. Ferry B.L. Measurement of peripheral B-cells subpopulations in common variable immunodeficiency using a whole blood method / B.L. Ferry., J. Jones, B.A. Bateman, et al // Clin. Exp. Immunol. - 2005 - v. 140. - P.532-539.

15. Fuxa M. Transcriptional regulation in early B-cell development / M. Fuxa, J.A. Skok // Curr. Opin. Immunol. - 2007 - v. 19. - P. 137-143.

16. Ko J. Immune competence and switched memory B-cells in common variable immunodeficiency / J. Ko., L. Radigan // Clin. Immunol. - 2005 - v. 116. - P. 37-41.

17. Kapper D. Regulation of B- and T-lymphoid cell development / D. Kapper // Curr. Opin. Immunol. - 2007 - v. 19. - P.113-116.

18. Nagumo H. The different process of class switching and somatic hypermutatlon: a novel analysis by CD27(-) naïve B-cells / H. Nagumo, K. Agematsu, W. Kabayashi, et al. // Blood. - 2002 - v.99. - P.567-575.

19. Notatrangelo L., Casanova PL., Conley M.E. et ah Primary immunodeficiency diseases: an update from the international Union of immunological Societies Primary immunodeficiency diseases Classification

Committee Meeting in Budapest. - 2005 / L. Notatrangelo , P.L. Casanova, M.E. Conley et al. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. - v. 117. - P. 883-896.

20. Piqueras B. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B-cells memory differentiation correlates with clinical aspen / B. Piqueras // J. Clin. Immunol. - 2003 - v. 23. - P. 385-400.

21. Tanque S.G. Human IgM^+CD27^+ B-celIs: memory B-cells or "memory" B-cells / S.G. Tanque, K.L. Good // J. Immunol. - 2006 - v. 177. - P. 3728-373.

22. Vascotto F. Antigen presentation by B-cells: how receptor signaling direct membrane trafficking / F. Vascotto, D.L. Roux // Curr. Opin. Immunol - 2007 - v. 19.- P.93-99.

23. Vodjgani M. Analysis of class-switched memory B-cells in patients witn common variable immunodeficiency and its clinical implications / M. Vodjgani // J. Invest. Allerg. Clin. Immunol. - 2007 - v. 17. - P. 321-328.

24. Weller S. Human blood IgM "memory" cells are circulating splenic marginal zone B-cells harboring a prediverified immunoglobulin repertoire / S. Weller, N.C. Braun, B.K. Tan et al. // Blood. - 2004 - v. 104. - P. 3647-3654.

25. Wehr C. The EURO class trial: subgroups in common variable immunodeficiency / C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt et al. // Blood. - 2008 – v. 111. – P. 77-85.

26. Williams M.A., Bevan M.J. Effector and memory CTL differentiation / M.A. Williams, M.J. Bevan // Annu Rev. Immunol. - 2007 - v. 25. - P. 171-193.

Summary

Masllanko R.P., Oleksjuk I.I., Bozhyk L.Ja.

Lviv national university of veterinary medicine and biotechnology named of S.Z. Gzickyj

THE ROLE OF B-LYMPHOCYTES WITH IMMUNODEFICIENCY

The article analysis data of investigation of B-lymphocytes subpopulations in patients with common variable immunodeficiency (CV1D). The number of memory B-cells was markedly decreased of CVIB patients, the patients have decreased switched memory B-cells ($CD27^+IgD^-$), as well as B-cells of marginal zone of spleen. Patients with decreased percentages of memory B-cells have lower levels of IgG/IgA and higher frequency of autoimmune and other.

Стаття надійшла до редакції 21.09.2010