

ИММУННЫЙ РЕПЕРТУАР В-КЛЕТОК КРОВИ ОВЕЦ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ*

И.Ю. Ездакова, доктор биологических наук, **О.В. Капустина**, доктор ветеринарных наук,
С.В. Вальциферова, кандидат биологических наук, **А.Г. Григорьев**, аспирант

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук,
109428, Москва, Рязанский просп., 24/1
E-mail: ezdakova.i@viev.ru

Основные специфические функции В-клеток осуществляются с участием мембранных рецепторов. Связывание рецептора с его лигандом активирует каскад реакций, приводящий к образованию клеток памяти и протективных антител. Исследование проводили с целью анализа фенотипического профиля В-клеток крови овец в процессе поствакцинального иммунного ответа на инактивированную вакцину против возбудителей острых кишечных заболеваний животных. Овец романовской породы в возрасте 1,5 лет иммунизировали внутримышечно 2 раза с двухнедельным интервалом. Исследования проводили до вакцинации, на 7-е, 14-е и 21-е сутки иммунного ответа. Фенотип В-клеток определяли методом иммунопероксидазного окрашивания с использованием моноклональных антител к CD-рецепторам. Для оценки уровня IgG использовали реакцию простой радиальной иммунодиффузии. Иммунизация овец инактивированной вакциной вызвала увеличение уровня общей популяции лейкоцитов и субпопуляции В2-клеток ($p < 0,05$). Абсолютное количество лейкоцитов повышалось, по сравнению с исходными значениями, на 7-е и 14-е сутки первичного иммунного ответа и на 7-е сутки вторичного иммунного ответа. Число В2-лимфоцитов с фенотипом $CD5-sIgM^+$ увеличилось с $4,5 \cdot 10^6$ кл/мл до введения вакцины до $9,0 \cdot 10^6$ кл/мл на 7-е сутки первичного иммунного ответа и $11,2 \cdot 10^6$ кл/мл на 14-е сутки. Повышение уровня субпопуляции $CD5-CD19^+sIgM^+CD20^-$ -лимфоцитов отмечали в первые две недели иммунного ответа. Он был в 2,5 раза больше исходного значения. Отсутствие влияния вакцинации на уровень лимфоцитов с фенотипом $CD5^+CD19^+sIgM^+$ (В1-клетки), который не изменялся ни при первичном, ни при вторичном иммунном ответе, свидетельствует о независимости прайминга двух основных субпопуляций В-клеток. Структурные компоненты иммунной системы в процессе иммуногенеза активируются не одновременно, поэтому при оценке эффективности вакцинации особое значение приобретают функциональные взаимосвязи иммунологических показателей. Сильная положительная корреляция между показателями В2-клеток и уровнем общих иммуноглобулинов класса G ($r=0,9$) свидетельствовала о положительном эффекте вакцинации.

IMMUNE REPERTOIRE OF SHEEP BLOOD B-CELLS IN THE POST-VACCINATION IMMUNE RESPONSE

Ez dakova I.Yu., Kapustina O.V., Valsiferova S.V., Grigorev A.G.

Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after K.I. Scriabin
and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences,
109428, Moskva, Ryazanskii prosp., 24/1
E-mail: ezdakova.i@viev.ru

The main specific functions of B cells are carried out with the help of membrane receptors. Binding of the receptor to its ligand activates a cascade of reactions leading to the formation of memory cells and protective antibodies. The study was conducted to analyze the phenotypic profile of sheep blood B cells in the process of post-vaccination immune response to an inactivated vaccine against pathogens of acute intestinal diseases of animals. Romanov sheep at the age of 1.5 years were immunized twice with a two-week interval. Studies were conducted before vaccination and on the 7th, 14th and 21 days of the immune response. The phenotype of B cells was determined by immunoperoxidase staining using monoclonal antibodies to CD receptors. A simple radial immunodiffusion reaction was used to assess IgG levels. Vaccination of sheep with an inactivated vaccine caused an increase in the level of the general population of leukocytes and a subpopulation of B2 cells ($p < 0.05$). The absolute number of leukocytes increased on the 7th and 14th days of the primary immune response and on the 7th day of the secondary immune response compared to the initial values. The number of B2 lymphocytes with the $CD5-IgM^+$ phenotype increased and amounted to $9.0 \cdot 10^6$ cells/ml on day 7 and $11.2 \cdot 10^6$ cells/ml on day 14 of the primary immune response ($4.5 \cdot 10^6$ cells/ml before the introduction of the vaccine). An increase in the level of the $CD5-CD19^+sIgM^+CD20^-$ lymphocyte subpopulation was noted in the first two weeks of the immune response and was 2.5 times higher than the initial value. Data were obtained on the absence of the effect of vaccination on the level of lymphocytes with the $CD5^+CD19^+sIgM^+$ phenotype (B1 cells), which did not change during either the primary or secondary immune response, which indicates the independence of priming of the two main subpopulations of B cells. The structural components of the immune system in the process of immunogenesis are not activated simultaneously, and when evaluating the effectiveness of vaccination, functional interrelations of immunological indicators are of particular importance. A strong correlation between the indicators of B2 cells and the level of total immunoglobulins of class G ($r=0.9$) indicates a positive effect of vaccination.

Ключевые слова: В-клетки, поствакцинальный иммунный ответ, CD-маркеры, иммунопероксидазное окрашивание

Key words: B cells, post-vaccination immune response, CD markers, immunoperoxidase staining

Изучение активации В-клеток, непосредственно связанное с рецепторным профилем клеточных мембран, в процессе иммунного ответа крайне актуально не только для понимания физиологических основ иммунитета, но и для создания новых, а также испытанных существующих вакцинных препаратов. Экспери-

ментальные данные о мембранно-зависимых реакциях презентации антигенов – необходимая основа для разработки современных технологий изготовления вакцин. Их эффективность напрямую зависит от адекватности процессов пролиферации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов, которые можно опреде-

*Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № 0578-2014-0018).

лять по экспрессии CD-рецепторов. Их уровень может служить определенным маркером этапов формирования поствакцинального иммунного ответа.

Каждому этапу дифференцировки В-лимфоцита соответствует определенный иммунный репертуар CD-маркеров: проВ1-клетке – CD19; про В11 – CD19CD20; преВ1 – CD19CD20mPreBCR; преВ11 – cIgMCD19CD20CD21. Следующий этап – формирование антигенного рецептора В-клеток (BCR), во время которого на мембране появляется мономерная молекула sIgM^{lo}, соответствующая её цитоплазматической форме (cIgM). Зрелым наивным В-лимфоцитам характерен фенотип sIgM^{hi}IgDCD19CD20CD21.

Известны три субпопуляции В-лимфоцитов у рогатого скота – В1а CD5⁺, В1b CD5⁺ и В2, обладающие различными функциональными свойствами. Мембранный рецептор CD5 позволяет различать субпопуляции: CD19⁺ CD5⁺ В1-клетки и CD19⁺ CD5⁻ В2-клетки [1]. В1аCD5⁺-лимфоциты предназначены для быстрого реагирования на наиболее распространенные антигены клеточных стенок бактерий в приборьерных полостях. Естественные антитела, секретируемые В1а-лимфоцитами (IgM и IgA), преимущественно специфичны к тимуснезависимым антигенам. Уровень CD5⁺ В-клеток может повышаться при аутоиммунных заболеваниях. Также известно, что лимфоциты, экспрессирующие молекулу CD5⁺, служат мишенью для вируса лейкоза крупного рогатого скота [2].

Маркерный белок CD19 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Многие из этих белков представляют собой различные полимеры, в которых гомологичные Ig-структуры разных цепей взаимодействуют между собой. Каждую такую структуру кодирует отдельный экзон. Рецептор CD19 В-клеток играет важную роль в трансдукции позитивного сигнала как при Т-зависимом, так и при Т-независимом иммунных ответах. CD19 служит маркерным белком В-клеток с самого раннего этапа их дифференцировки. Еще один маркерный рецептор В-лимфоцитов – молекула CD20, которая экспрессируется, начиная с проВ-клеток, но на плазматических клетках отсутствует. Известна функция CD20 в образовании Ca²⁺-каналов и в регуляции активности В-клеток, в том числе в антителогенезе. Молекула CD20 перемещаясь в липидные рафты, координирует работу рецепторных белков [3]. Для созревания В-клеткам необходимы не только молекулы CD19 и CD20, но и регулятор активации комплемента CD21. На поверхности лимфоцитов он появляется только на стадии пре В-клетки. Активация происходит при связывании CD21 с опсонинами С3bi (инактивированная форма компонента комплемента С3b) на поверхности клетки, что сопровождается фосфорилированием мембранного белка CD19. Одновременно с экспрессией CD21 в цитоплазме преВ-клетки появляется μ -цепь IgM. После завершения геной перестройки В-клетка на своей поверхности экспрессирует полные молекулы иммуноглобулина, которые служат основой В-клеточного рецептора (BCR). Функция BCR заключается в связывании антигена и проведении сигнала внутрь клетки для дальнейшей дифференцировки и пролиферации лимфоцита. Цитоплазматическая часть мембранного sIgM состоит из трех аминокислотных остатков, которых недостаточно для формирования структурных мотивов, поэтому сигнал передается через ассоциированные с ним гликопротеиды Ig α и Ig β , которые подвергаются фосфорилированию. Мембранные мономеры 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 [4].

Наиболее многочисленную популяцию составляют В2-лимфоциты, которые дифференцируются в плазматические клетки и продуцируют все известные изотипы иммуноглобулинов с огромным разнообразием антигенных детерминант. Под действием антигена В2-лимфоциты начинают интенсивно делиться и на поверхности клеток появляются иммуноглобулины класса IgG, реже – IgA и IgE, вместо IgM и IgD, свойственных наивным В-клеткам, повышается частота мутаций [5]. Это вызывает формирование многочисленных новых вариантов рецепторов субклонов В-лимфоцитов. Если мутации приводят к ослаблению сродства рецептора к антигену и В-клетки не получают поддерживающих сигналов со стороны дендритных клеток, фиксирующих антиген, они подвергаются апоптозу. В случае повышения сродства рецептора к антигену клетки выживают и покидают фолликул, мигрируют в лимфатические узлы, селезенку, а также (особенно при вторичном ответе) в костный мозг, где дифференцируются в плазматические клетки и секретируют антитела. Антителами к различным антигенным детерминантам служат растворимые формы мембранных иммуноглобулинов В-клеток, а именно, гомологи антигенсвязывающих участков sIgM-рецептора В-клеток [6].

На сегодняшний день уже понятно, что в крови присутствует множество фенотипически различных популяций клеток. С использованием методов иммуноцитохимии возможен поиск в периферической крови наиболее характерных маркерных фенотипов клеток для определенного этапа иммуногенеза, что, с нашей точки зрения, целесообразно использовать для оценки эффективности вакцин. Но, несмотря на развитие современных технологий и методологий, как показывает ситуация с пандемией коронавируса, многие проблемы все еще остаются нерешенными. Поэтому детальное изучение клеточных реакций организма на различные типы патогенов имеет первостепенное значение для развития инфекционной иммунологии.

Цель исследований – определение фенотипического профиля В-клеток в периферической крови овец в процессе поствакцинального иммунного ответа на ассоциированную инактивированную вакцину.

Методика. Исследования проводили до введения вакцины, затем на 7-е, 14-е и 21-е сутки поствакцинального иммунного ответа. Ассоциированную, инактивированную вакцину против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции (Вакцина ОКЗ, ООО «Агровет») вводили здоровым овцам романовской породы в возрасте 1,5 лет (5 гол.) двукратно согласно инструкции производителя. Животных содержали в соответствии с ГОСТ 33215-2014. 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...0,5x10⁶ кл/мл. Количество В-клеток в крови определяли методом непрямого иммунопероксидазного окрашивания (ИПО) [7]. 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 (рН 7,2) при 1100 об/мин. по 5 мин. Взвесь клеток фиксировали этанолом на предметном стекле. Блокаду пероксидазы проводили 0,3 %-ным раствором переки-

си водорода в течение 10 мин. В качестве блокирующего раствора использовали 1 % ВСА (рН 7,2...7,4). Инкубировали 60 мин. при комнатной температуре и тщательно отмывали клетки. Затем к фиксированным клеткам добавляли моноклональные антитела к sIgM рогатого скота и к CD5,19,20,21-маркерам В-клеток человека (ООО «Сорбент»). Инкубировали в течение 60 мин. при комнатной температуре во влажной камере. В качестве вторичных антител использовали пероксидазный конъюгат IgG козы к Ig мыши. Для визуализации пероксидазы использовали набор для окрашивания с 3-амино-9-этилкарбазолом (АЕС Staining Kit «Sigma»). АЕС-позитивные клетки идентифицировали по красно-коричневому окрашиванию при просмотре препаратов под микроскопом (x1000). Общие иммуноглобулины класса G в сыворотке крови овец определяли методом простой радиальной иммунодиффузии.

Результаты и обсуждение. Эффективность иммунного ответа на вакцину напрямую зависит от химических реакций, происходящих с участием поверхностных рецепторов лимфоцита. Один из главных механизмов поствакцинального иммунного ответа – антителогенез, этапы которого можно определить по CD-профилю В-клеток.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что количество лейкоцитов достоверно повышается, по сравнению с фоновыми значениями, на 7-е и 14-е сутки первичного иммунного ответа и снижается на 7-е сутки вторичного иммунного ответа (см. табл.).

На 7-е сутки после введения инактивированных микробных клеток вакцинных штаммов *E.coli* 09:K99; *E.coli* 0138:K88; *S.dublin*; *S.enteritidis*; *S.typhimurium*; *Kl.pneumoniae*; *Pr. vulgaris*; *Pr. mirabilis*, в крови вакцинированных животных преобладали В-клетки с фенотипом CD19⁺sIgM⁺. Повышение количества CD5⁺CD19⁺sIgM⁺CD20⁺-лимфоцитов отмечали с 7-х суток и к 14-м суткам иммуногенеза их число было в 2,5 раза больше, чем до введения вакцины. Число лимфоцитов с фенотипом CD5⁺CD19⁺sIgM⁺(В1-клетки) в процессе поствакцинального иммунного ответа не изменялось.

Экспрессия CD21 характерна для незрелых и наивных В-клеток и снижается после клеточной активации.

CD-репертуар В-лимфоцитов крови овец в процессе иммунного ответа (M±m)

Показатель	Исходное значение	Сутки поствакцинального иммунного ответа		
		7-е	14-е	21-е
Лейкоциты тыс/мкл	7,0±1,2	16,8±3,6*	20,0±4,3*	10,0±1,5
CD5 ⁺ : % ¹	39,0±8,4	12,0±9,0	14,0±6,7	32,5±3,1
10 ⁶ /мл	2,73±0,5	2,4±1,3	2,8±1,0	3,2±2,1
CD19 ⁺ : %	48,4±11,3	51,6±16,4	33,7±8,9	55,0±15,0
10 ⁶ /мл	3,4±1,0	8,8±4,9*	6,6±2,9*	5,5±0,5
CD20 ⁺ : %	52,5±7,7	34,0±8,9	47,5±12,5	50,0±9,0
10 ⁶ /мл	3,7±1,3	5,8±1,8	9,6±1,8*	5,0±1,3
CD21 ⁺ : %	60,0±3,2	нет данных	37,4±2,0	40,0±6,4
10 ⁶ /мл	4,2±0,7		7,4±1,9	4,0±0,5
sIgM ⁺ : %	64,0±5,1	53,4±12,1	56,3±9,4	60,0±3,7
10 ⁶ /мл	4,5±0,9	9,0±3,9*	11,2±3,2*	6,0±1,0

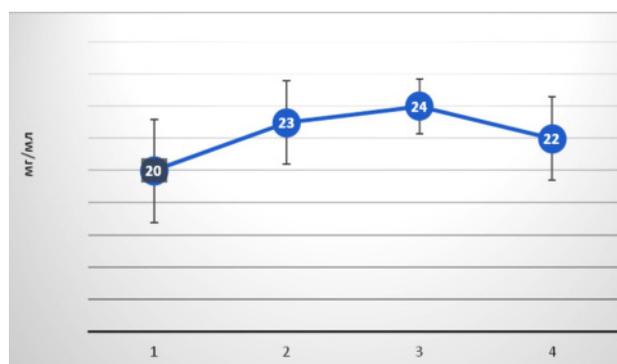
¹% – от лимфоцитов крови овец; 10⁶/мл – абсолютное количество клеток в 10⁶/мл;
*различия с исходным значением достоверны при p < 0,05.

ции. Так, на 7-е сутки вторичного иммунного ответа относительное количество CD21⁺ В-лимфоцитов уменьшилось в 1,5 раза.

В первые сутки поствакцинального иммунного ответа число CD5⁺CD19⁺sIgM⁺-клеток, которые затем посредством мутаций генов иммуноглобулинов и переключения изотипа трансформируются в плазматические клетки и В-клетки памяти, имеющие решающее значение для долгосрочного защитного эффекта вакцин, возросло с 1,8•10⁶ до 6,6•10⁶ кл/мл (p < 0,05). Дифференцировка В-лимфоцитов в клетки, секретирующие IgG-антитела, сопровождается интенсивным мутагенезом, в основном, в темных зонах зародышевых центров на стадии центробластов [8]. Реакция в зародышевом центре селезенки продолжается около 20 суток до появления клонов с более высоким сродством к антигену, чем у исходных клеток. Морфологически клетки памяти не отличаются от наивных В-лимфоцитов, но CD-репертуар меняется.

Известно, что В-клетки памяти отличаются низким и высоким сродством к антигену. Недостаточная аффинность BCR к антигену обеспечивает в первые сутки иммунного ответа поддержание полиреактивности В-клеток памяти, определяющей более широкий спектр взаимодействий с различными патогенами [9]. Попадание определённого антигена в организм вызывает образование клеток памяти не только к этому антигену, но и к другим патогенам. Субпопуляция В-клеток памяти с фенотипом CD19⁺sIgM⁺ аналогично наивным В-лимфоцитам может распознавать множество антигенов, но с более быстрым ответом на них. Повышение уровня В-клеток с фенотипом CD5⁺CD19⁺sIgM⁺CD20⁺CD21⁻ на 14-е сутки после вакцинации в 2,5 раза (p < 0,05) может косвенно свидетельствовать о присутствии в крови В-клеток памяти с низким сродством. Следует отметить, что в течение исследуемого периода поствакцинального иммунного ответа плотность экспрессии рецепторов на клеточной мембране В-лимфоцитов была низкой (CD^{lo}).

При изучении гуморального иммунитета выявлена тенденция к увеличению концентрации полиспецифических иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови вакцинированных овец с 20,0 мг/мл (исходное значение) до 23,0 мг/мл на 7-е сутки и 24,0 мг/мл на 14-е сутки иммунного ответа (см. рисунок). Переключение лимфоцитов с продукции IgM на синтез иммуноглобулинов других изотипов происходит в результате комбинации повторяющихся участков переключения и делеции промежуточных S_H-генов.



Уровень IgG в сыворотке крови овец в процессе иммунного ответа: 1 – до вакцинации, 2 – 7-е; 3 – 14-е; 4 – 21-е сутки поствакцинального иммунного ответа.

Повышение уровня общих сывороточных IgG в процессе поствакцинального иммунного ответа коррелирует с нарастанием числа CD19⁺ ($r=0,8$), CD20⁺ ($r=0,89$), sIgM⁺-клеток ($r=0,95$). Такие ассоциации указывают на включение субпопуляции В2-лимфоцитов в процесс дифференцировки с образованием плазматических клеток, синтезирующих специфические антитела класса G. В свою очередь, низкие коэффициенты корреляции ($r=-0,1$) между показателями CD5⁺-клеток и содержанием IgG подтверждают независимость прайминга субпопуляций В-клеток.

Таким образом, современные данные о роли различных В-клеточных субпопуляций в поствакцинальном иммунном ответе свидетельствуют об актуальности этого направления исследований. Понимание того, как различные патогены индуцируют иммунорезистентные и модулируют их эффекты, имеет важное значение для разработки вакцинных препаратов. Фенотипическое разнообразие В-лимфоцитов дает возможность исследовать механизмы их пролиферации и дифференцировки для поиска маркерных показателей эффективного иммунного ответа. В результате проведенных исследований была установлена функциональная связь между показателями В2-клеток и уровнем общих иммуноглобулинов класса G. В процессе первичного и вторичного поствакцинального иммунного ответа показано повышение экспрессии В-клеточных рецепторов CD19, CD20 и sIgM на фоне их низкой плотности на клеточной мембране. Число В1-клеток после вакцинации не изменялось и было сравнимо с исходным значением. Следует отметить, что показатели полиспецифических IgG и CD-репертуара праймированных В-клеток в процессе первичного иммунного ответа были выше, чем те же параметры после введения бустерной дозы вакцины. В целом результаты исследований свидетельствуют о положительном влиянии вакцинации на антителогенез и согласуются с современными знаниями механизмов формирования иммунного ответа.

Литература.

1. *Naive B cells with high-avidity germline-encoded antigen receptors produce persistent IgM(+) and transient IgG(+) memory B cells* / K.A. Pape, R.W. Maul, T. Dileepan, et al. // *Immunity*. 2018. Vol. 48. No. 6. P. 1135–1143. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.019.
2. *Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза* / И.Ю. Ездакова, О.В. Капустина, М.И. Гулюкин и др. // *Вопросы вирусологии*. 2020. №1. С. 35–40. doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40.
3. *Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. Immunity*. 2016. Vol. 45. P. 471–482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001.
4. *Ездакова И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных*. М.: Компания Спутник+, 2008. 88 с.
5. *Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire* / Weller S., Braun M.C., Tan B.K., et al. // *Blood*. 2004. Vol. 104. P. 3647–3654. doi: 10.1182/blood-2004-01-0346.
6. *Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen* / Kruetzmann S., Rosado M.M., Weber H., et al. // *J Exp Med*. 2003. Vol. 197. P. 939–945. <https://doi.org/10.1084/jem.20022020>.
7. *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.
8. *Сидорова Е. В. Что нам известно сегодня о В-клетках* // *Успехи совр. биол.* 2006. №3. С.227–241.
9. *Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19(+) or CD19(-)* / S.F. Brynjolfsson, M. Mohaddes, J. Karrholm, et al. // *Blood Adv*. 2017. Vol. 1. P. 835–838. doi: 10.1182/bloodadvances.2017004481.

Поступила в редакцию 07.09.2021

После доработки 30.09.2021

Принята к публикации 08.10.2021