

**КОНСТИТУЦИОННЫЕ КОНСТАНТЫ КАК БИОМАРКЕРЫ
СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ**

© 2024 г. **И. Ю. Ездакова**, доктор биологических наук,
О. В. Капустина, доктор ветеринарных наук, **А. Г. Григорьев**

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@yiv.ru

Корреляционные константы – это количественные показатели взаимосвязи структурных компонентов иммунной системы. Изменение их величины и направленности свидетельствует о нестабильности работы иммунной системы, приводящей к развитию заболевания. Цель исследования – определение конституционных констант иммунологических показателей (Нф/Лф и IgG/IgM) как биомаркеров иммуногенеза при экспериментальном заражении овец вирусом лейкоза крупного рогатого скота. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови овец определяли методом простой радиальной иммунодиффузии с поли- и моноклональными антителами к IgM и IgG, относительное количество нейтрофилов и лимфоцитов – по стандартной методике. Для оценки взаимосвязи между показателями использовали коэффициент корреляции Пирсона. Силу корреляции оценивали по шкале Чеддока. На всех этапах исследования сохранялась отрицательная корреляция между числом нейтрофилов и лимфоцитов, хотя ее значения имели нестабильный характер. Снижение силы корреляции между уровнями нейтрофилов и лимфоцитов отмечали только на 3-и сутки после заражения, затем к 7 месяцам иммуногенеза, что могло быть связано с увеличением числа нейтрофилов и развитием бактериальных осложнений. Конституционная константа IgG/IgM изменялась с 1-х суток развития иммунного ответа. Достоверное уменьшение силы корреляции произошло в период с 7-х до 14-х суток после иммунизации. Нестабильный характер динамики взаимосвязи между «ранними» и «поздними» иммуноглобулинами показывает, как патоген блокирует синтез вируснейтрализующих антител, что может привести к развитию иммунопатологии. Но при высокой отрицательной корреляции ($r = -0,9$) между показателями нейтрофилов и лимфоцитов сохраняются адаптивные возможности иммунной системы, так как именно эта корреляционная константа приоритетна при вирусных инфекциях. Проведенные исследования показали перспективность использования конституционных констант в качестве биомаркеров различных этапов иммуногенеза.

**CONSTITUTIONAL CONSTANTS AS BIOMARKERS
OF THE STATE IMMUNE SYSTEM OF ANIMAL**

I. Yu. Ezdakova, O. V. Kapustina, A. G. Grigoriev

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

Correlation constants are quantitative indicators of the relationship between the structural components of the immune system. A change in their magnitude and orientation is an indicator of the instability of the immune system, leading to the development of the disease. The purpose of this study was to determine the constitutional constants of immunological parameters during experimental BLV infection of sheep as biomarkers of immunogenesis. The level of immunoglobulins in blood serum was determined by simple radial immunodiffusion with poly- and monoclonal antibodies to IgM and Ig G. Determination of the relative number of neutrophils and lymphocytes in the blood of sheep was carried out according to standard methods. To assess the relationship between indicators, the Pearson correlation coefficient was used. The strength of correlation was assessed according to the Chaddock scale. At all stages of the study, a negative correlation between the number of neutrophils and lymphocytes remained, although its values were unstable. A decrease in the strength of the correlation between the parameters of neutrophils and lymphocytes was noted only on the 3rd day after infection, then on the 7th month of immunogenesis, which could be associated with an increase in the number of neutrophils and the development of bacterial complications. It was established that the constitutional constant of IgG/IgM changed from the 1st day of the immune response. A significant decrease in the strength of the correlation occurred in the period from 7 to 14 days of the immune response. The unstable of the dynamics of the relationship between “early” and “late” immunoglobulins shows how the pathogen blocks the synthesis of virus-neutralizing antibodies, which can lead to the development of immunopathology. But with a high negative correlation ($r = -0.7-0.9$) between the indicators of neutrophils and lymphocytes, the adaptive capabilities of the immune system are preserved, since it is this correlation constant that is a priority in viral infections. The conducted studies showed the promise of using constitutional constants as biomarkers of various stages of immunogenesis.

Ключевые слова: конституционные константы, биомаркеры, нейтрофилы, лимфоциты, иммуноглобулины.

Keywords: constitutional constants, biomarkers, neutrophils, lymphocytes, immunoglobulins.

Иммунная система представляет собой совокупность лимфоидных органов, иммунокомпетентных клеток и молекул, которые находятся в постоянном взаимодействии со всеми системами организма. Известно, что в иммунной системе существуют определенные корреляционные константы (стойкие прямые и обратные взаимосвязи

иммунологических показателей), которые характеризуют функциональное состояние иммунной системы в онто- и иммуногенезе [1]. Определение таких констант значительно расширяет диагностические, прогностические и лечебные возможности, что позволяет использовать их в качестве потенциальных биомаркеров состояния иммунной системы.

Следует отметить, что функциональные связи, определяемые как сильные устойчивые корреляции, играют важную роль в нормальном функционировании различных систем организма, поскольку они характеризуют сбалансированность работы компонентов таких систем [2, 3, 4]. В предыдущих исследованиях с целью повышения диагностической значимости иммунологических показателей были определены корреляционные константы (КК), которые можно использовать в качестве биомаркеров степени активации иммунной системы организма животных [5]. Это положительные устойчивые коэффициенты корреляции между показателями IgG/IgM и отрицательная корреляция между параметрами нейтрофилов и лимфоцитов [6]. На основании корреляционного анализа уровней основных изотипов иммуноглобулинов у клинически здоровых животных на различных этапах онтогенеза была показана устойчивая положительная корреляция между IgG и IgM у всех исследуемых групп животных. Корреляционная пара IgG/IgM может служить биомаркером здоровья животного и качества иммунопрофилактики, так как изменение силы и направленности взаимосвязи между IgM-антителами первичного и IgG-антителами вторичного иммунного ответа свидетельствует о нарушении иммунореактивности организма.

Иммунная система (ИС), постоянно испытывающая функциональную нагрузку, не может одновременно активировать врожденные и адаптивные механизмы иммунного ответа. Вначале включаются естественные неспецифические клетки, к числу которых относятся нейтрофилы, затем начинается процесс специфического отбора лимфоцитов. Этот процесс отражает отрицательная корреляция указанных структурных компонентов иммунной системы. Увеличение или уменьшение, смена направленности такой взаимосвязи характеризует напряженность иммунной системы, которая при хроническом процессе может привести к формированию иммунопатологии.

В то же время, несмотря на наличие многочисленных исследований по проблемам лейкоза крупного рогатого скота, на сегодняшний день трудно ответить на вопросы, связанные с иммунопатогенезом и существованием каких-либо маркеров хронической инфекции.

Цель исследования – определение взаимосвязи между количеством нейтрофилов и лимфоцитов (Нф/Лф) и концентрациями иммуноглобулинов (IgM/ IgG) на разных стадиях развития инфекционного процесса для изучения патогенеза лейкоза овец.

Методика. Для заражения овец ($n=10$) использовали кровь от BLV-положительной коровы (16×10^3 лейкоцитов/мкл). Образцы крови овец отбирали из яремной вены до заражения и после него на 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 и 20-е сутки. Затем на 7, 15, 18 и 21-й месяцы после экспериментального заражения. Для определения концентрации иммуноглобулинов классов М и G в сыворотке крови овец использовали метод простой радиальной иммунодиффузии с поли- и моноклональными антителами к Ig. Относительное количество нейтрофилов и лимфоцитов в крови овец определяли по стандартной методике. Для анализа взаимосвязей определяли коэффициенты корреляции, которые позволяют оценить степень линейной связи между двумя переменными. Так, коэффициент корреляции больше 0,8 показывает функциональную связь между двумя иммунологическими параметрами. Оценку взаимосвязи между показателями осуществляли на основе коэффициента корреляции Пирсона, статистически значимым считали $p < 0,05$. Силу корреляции оценивали по шкале Чеддока: отсутствие связи – 0; слабая – $r=0,1 \dots 0,3$; умеренная – $r=0,3 \dots 0,5$; заметная – $r=0,5 \dots 0,7$; высокая –

$r=0,7 \dots 0,9$; весьма высокая $r=0,9 \dots 1,0$. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel (Microsoft) и Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. Вирус лейкоза КРС (BLV) после этапа острой инфекции способен персистировать в организме в неинфекционной форме, в какой-то момент времени, например при иммуносупрессии, он может реактивироваться с образованием новых инфекционных вирусных частиц, что отражается в нестабильных параметрах иммунного ответа. Первые сутки острого инфекционного процесса характеризуются напряженностью иммунной системы и уменьшением конституционных констант Нф/Лф, а также отсутствием взаимосвязи между уровнями IgG и IgM ($r=0,02$). На всех этапах исследования сохранялась отрицательная корреляция между числом нейтрофилов и лимфоцитов, хотя ее значения имели нестабильный характер (рис. 1). Популяция нейтрофилов, их про- и противовоспалительное действие играет неоднозначную роль в развитии лейкоза. При хроническом течении заболевания рост числа нейтрофилов и уменьшение количества лимфоцитов может ассоциироваться с неблагоприятным прогнозом [7]. Взаимосвязь величин этих показателей может служить потенциальным биомаркером прогноза течения инфекционного процесса.

На 3-и сутки иммунного ответа установлено уменьшение корреляции между нейтрофилами и лимфоцитами ($r=-0,46$) по сравнению с фоновыми значениями ($r=-0,66$). Вероятно, в этот период клетки врожденной и адаптивной иммунной системы испытывают сильную функциональную нагрузку, характерную для формирования адекватного ответа на инфекцию. Затем в течение 20 суток сила корреляции повышается. Через 7 месяцев после экспериментального заражения животных установлено ее уменьшение, что могло быть связано с увеличением числа нейтрофилов и развитием бактериальных осложнений при хронизации вирусной инфекции.

В течение второго года наблюдений корреляционная константа Нф/Лф демонстрировала заметную и высокую обратную функциональную связь между количеством нейтрофилов и лимфоцитов, что свидетельствует о стабильном состоянии иммунной системы. Таким образом, во все сроки наблюдений за экспериментально инфицированными животными общее число нейтрофилов было связано обратной корреляцией с количеством лимфоцитов. Возможно, именно эта функциональная связь, которая не изменяла направленности в течение 21 месяца (срок наблюдений) хронической вирусной инфекции у овец, способствовала адекватному иммунному ответу.

Имуноглобулины выполняют различные функции, и их исключительная вариабельность обусловлена мно-

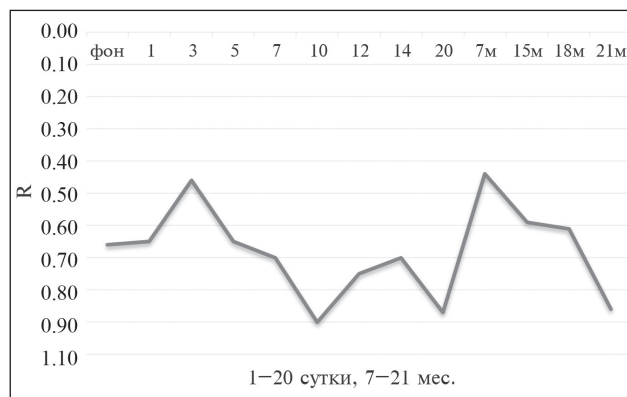


Рис. 1. Динамика конституционных констант Нф/Лф в процессе иммунного ответа.

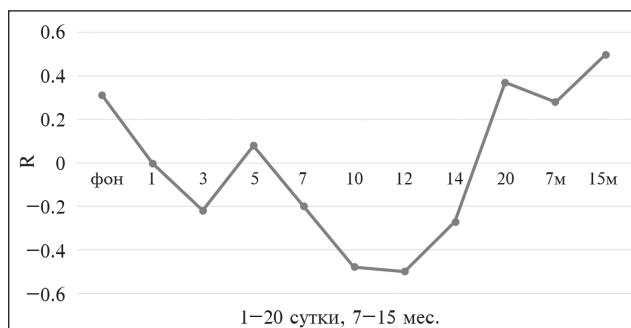


Рис. 2. Динамика конституционных констант IgG/IgM в процессе иммунного ответа: —●— IgG/IgM.

жественностью генов, соматическими рекомбинациями и мутациями. При первичном контакте с чужеродным антигеном в сыворотке крови повышается концентрация иммуноглобулинов класса М (IgM). В процессе иммунного ответа происходит переключение изотипов иммуноглобулинов и изменение преобладающих антител в сторону специфических Ig G. Рассматривая взаимосвязь данных классов антител в динамике, а не отдельные их показатели, мы получаем комплексную информацию о механизмах формирования иммунного ответа.

Сила корреляции IgG/IgM изменялась с 1-х суток иммунного ответа (рис. 2). При этом на 1–5-е сутки после экспериментального заражения BLV связь между Ig отсутствовала. Затем она изменила свою направленность, наиболее заметная обратная корреляция была зарегистрирована на 10–12-е сутки иммуногенеза. С 20-х суток иммунного ответа корреляция стала умеренно положительной ($r=0,37$), к 15-му месяцу — заметно положительной ($r=0,5$). Хотя при вирусных инфекциях приоритетным считается клеточный иммунитет, антитела играют значимую роль в ограничении распространения вируса.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что гуморальный иммунный ответ развивается вскоре после инфицирования животных к 1–8-й неделе иммунного ответа, а динамика показателей IgG и IgM в сыворотке крови крупного рогатого скота носит перемежающийся (волнообразный) характер [8]. Это согласуется с рассматриваемыми результатами исследований, проведенных на овцах. Отсутствие взаимосвязи и смена направленности корреляционной константы IgG/IgM показывают несогласованность синтеза «ранних» и «поздних» антител и риск развития иммунопатологического процесса. Но при сильной отрицательной корреляции между количеством нейтрофилов и лимфоцитов сохраняются адаптивные возможности иммунной системы, так как именно эта корреляционная константа приоритетна при вирусных инфекциях. Изменения в экспрессии генов вируса лейкоза крупного рогатого скота обуславливают его сложный цикл персистенции в клетках организма животных. Интенсивность вирусной репликации при хронической инфекции во многом зависит от состояния иммунной системы. В первые 20 дней иммунного ответа структурные компоненты ИС испытывают максимальную нагрузку, которая отражается на изменении силы и направленности конституционных констант. На 3-и сутки после экспериментального заражения BLV зарегистрировано синхронное уменьшение взаимосвязей Нф/Лф и IgG/IgM. На ранней стадии инфекции происходит распознавание вирусных антигенов дендритными клетками, макрофагами, а также нейтрофилами, находящимися в подкожных тканях, которые с помощью цитокинов активируют лимфоциты для индукции специфического иммунного

ответа. В процессе развития инфекции включаются компенсаторные реакции, что отражается на увеличении корреляционной связи между количеством нейтрофилов и лимфоцитов.

В предыдущих исследованиях была установлена стабильная функциональная связь между показателями количества нейтрофилов и лимфоцитов ($r=-0,89$; $r=-1,0$) в крови крупного рогатого скота и овец, которую можно назвать постоянной величиной (конституционной константой) адекватных реакций иммунной системы в норме [6]. Модуляция конституционной константы Нф/Лф указывает на бактериальную (увеличение числа нейтрофилов при уменьшении лимфоцитов) или вирусную (уменьшение нейтрофилов при увеличении лимфоцитов) инфекцию. Увеличение коэффициента корреляции ($r=-0,9$) к 21-му месяцу хронической вирусной инфекции показало восстановление функциональной связи между параметрами нейтрофилов и лимфоцитов. Похожий алгоритм иммунных реакций отражает конституционная константа IgG/IgM. Корреляционная связь между уровнем первичных антител IgM и специфических иммуноглобулинов класса G в процессе адекватного иммунного ответа должна быть положительной, хотя не такой сильной, как корреляция между показателями нейтрофилов и лимфоцитов [5]. При экспериментальном заражении BLV овец величина конституционной константы IgG/IgM имела нестабильный профиль, который характеризовался отсутствием ($r=0,02$) и сменой направленности ($r=-0,5$) корреляции между основными показателями гуморального звена иммунной системы. Это может быть обусловлено способностью вируса лейкоза крупного рогатого скота непрерывно реплицироваться в инфицированных лимфоцитах овец, вызывая тем самым индукцию иммунопатологического В-клеточного ответа. Увеличение силы положительной корреляции IgG/IgM к 15-му месяцу указывает на развитие компенсаторных реакций для стабилизации иммуногенеза при хронической вирусной инфекции.

Выводы. При экспериментальном заражении вирусом лейкоза крупного рогатого скота овец корреляционные связи между количеством нейтрофилов и лимфоцитов в крови животных стабильно отрицательные, а их сила изменяется в течение срока наблюдений.

Результаты анализа модуляции конституционной константы IgG/IgM позволяют сделать вывод о неблагоприятном влиянии BLV на механизмы формирования защитных антител.

Величины корреляционных констант последовательно отражают механизмы иммуногенеза и могут быть использованы в качестве биомаркеров состояния иммунной системы животных в онто- и иммуногенезе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

Порядок исследования был одобрен Комиссией по биоэтике ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 20.01.24 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература.

1. Михайленко А. А., Федотова Т. А. Роль корреляционных взаимосвязей в оценке функциональных возможностей иммунной системы // Иммунология. 2000. № 6. С. 59–61.

2. Экспрессия NKG2D цитотоксическими Т-лимфоцитами как возможный механизм иммуннопатогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом / М. Ф. Иванов, И. П. Балмасова, А. В. Жестков и др. // *Иммунология*. 2023. № 1. С. 93–102. doi: 10.33029/0206-4952-2023-44-1-93-102.
3. Correlation analysis of the peripheral blood lymphocyte count and occurrence of pneumonia after lung transplantation / X. He, Z. Luo, Yi. Han, et al. // *Transplant Immunology*. 2023. Vol. 78. 101822. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327423000394> (дата обращения: 08.06.2024). doi: 10.1016/j.trim.2023.101822.
4. Correlation of different cellular assays to analyze T cell-related cytokine profiles in vitamin D3-supplemented patients with multiple sclerosis / L. Rolf, J. Smolders, J. Quweland, et al. // *Molecular Immunology*. 2019. Vol. 105. P. 198–204. doi: 10.1016/j.molimm.2018.12.001.
5. Взаимосвязи между показателями естественных антител, общих иммуноглобулинов и иммунокомпетентных клеток крови овец в процессе поствакцинального иммунного ответа / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина, А. Г. Григорьев и др. // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2023. № 5. С. 69–72. doi: 10.31857/S2500262723050137.
6. Ezdakova I. Yu., Eremina M. A. Structure of correlative relationships between immunological parameters in cattle // *Russian Agricultural Sciences*. 2017. Vol. 43. No. 4. P. 322–325. doi: 10.3103/S1068367417040073.
7. Потапнев М. П., Гущина Л. М., Мороз Л. А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии // *Иммунология*. 2019. № 5. С. 84–96. doi: 10.24411/0206-4952-2019-15009.
8. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови / М. И. Гулюкин, О. В. Капустина, И. Ю. Ездакова и др. // *Вопросы вирусологии*. 2019. № 4. С. 173–177. doi: 10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177.

Поступила в редакцию 19.06.2024
После доработки 26.08.2024
Принята к публикации 20.11.2024