

ЗМІНИ ВМІСТУ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ТА ЦИРКУЛЮЮЧИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ КРОЛІВ-РЕЦИПІЄНТІВ ЗА АЛОГЕННОЇ ТРАНСФУЗІЇ ЦІЛЬНОЇ КРОВІ

О. В. ЄГОРОВ¹, аспірант та асистент кафедри хірургії і патофізіології ім.

І.О. Поваженка

М. О. МАЛЮК¹, доктор ветеринарних наук, доцент, завідувач кафедри хірургії і патофізіології ім. І.О. Поваженка

М. В. САВЧУК², кандидат сільськогосподарських наук, старший викладач кафедри екології та безпеки життєдіяльності

¹Національний Університет біоресурсів та природокористування України

²Державний університет інфраструктури та технологій

E-mail: o.yehorov@it.nubip.edu.ua, nikolai_malyuk@ukr.net,

savchuk_mv@gsuite.duit.edu.ua

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2022.05.010>

Анотація. У роботі представлено результати дослідження щодо зміни вмісту імуноглобулінів та ЦК у сироватці крові кролів-реципієнтів за алогенної трансфузії цільної крові. Актуальність роботи визначається важливістю контролю стану імуноглобулінів та ЦК, оскільки саме ці показники інформують про успішність процедури переливання крові і сприйняття матеріалу іммуною системою реципієнта. Отже мета роботи полягала у вивченні змін вмісту імуноглобулінів та ЦК у сироватці крові кролів-реципієнтів. Матеріалом для досліджень були зразки сироватки крові, що отримані від 5 кролів на 3, 8 та 23 доби після трансфузії. У дослідях використовувались клінічно здорові тварини, яким переливали цільну кров. Раціон годівлі дослідних тварин відповідав потребі в поживних і біологічно активних речовинах, тварини мали вільний доступ до води. Кров у тварин-донорів відбирали з яремної вени напівзакритим методом. Зразки донорської крові кролів були заготовлені в полімерні контейнери з антикоагулянтом ЦФДА. Утримання тварин, трансфузію, маніпуляції та виконання досліджень проводили на базі та в умовах НВЦ «Ведмедсервіс», ННЛ «Банк крові тварин» та кафедри хірургії і патофізіології ім. акад. І.О.Поваженка НУБіП України. Дослідження вмісту імуноглобулінів у сироватці крові кролів проводили згідно методу Манчіні, визначення ЦК проводили методом, що ґрунтується на вибірковій преципітації високомолекулярних імунних комплексів, що містяться у сироватці крові, поліетиленгліколем із молекулярною масою 6000 Да із подальшим визначенням оптичної щільності через спектрофотометрування за $\lambda = 450$ нм. За результатами проведених досліджень встановлено, що за алогенної трансфузії цільної крові кролям-реципієнтам відбувається достовірне підвищення вмісту імуноглобулінів класу М у сироватці крові на 3 добу експерименту та зниження їх вмісту на 23 добу експерименту. Показано, що за алогенної трансфузії цільної крові кролям-реципієнтам

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

відбувається зниження вмісту імуноглобулінів класу G та A у сироватці крові впродовж 23 діб експерименту. Алогенна трансфузія цільної крові в організмі кролів-реципієнтів активує утворення в сироватці крові тварин циркулюючих імунних комплексів, які можуть відкладатися у периваскулярному просторі і кірковому шарі нирок, спричиняючи активацію комплементу та запальні процеси.

Ключові слова: гемотрансфузія, імуноглобуліни, імунні комплекси, імунна відповідь, реципієнт

Актуальність роботи.

Гемотрансфузійна терапія на даний час займає важливе місце в сучасній медицині, завдяки маніпуляції переливання донорської крові, людство отримало незамінний матеріал для альтернативної заміни під час лікування тяжких крововтрат та багатьох інших гострих та хронічних захворювань. Використання донорських компонентів і препаратів крові в лікувальній практиці досягло величезних масштабів (М. М. Рубанець, 2005р.). Велика кількість трансплантацій виконуються щорічно у всьому світі. Достатньо сказати, що Європейська асоціація по трансплантації крові та кісткового мозку (ЄВМТ) повідомила про здійснення упродовж 2007 року 19341 трансплантацій, з яких було 6456 алогенних і 12885 аутологічних процедур (С. А. Dendrou, 2015).

Успішність процедури алогенної трансплантації крові залежить від того, на скільки вдається забезпечити дотримання принципів трансплантаційної імунологічної сумісності крові донора реципієнта (М. М. Рубанець, 2005р.).

Згідно з літературними джерелами (Т. В. Глазанова, 2015;

Е. Delaflor-Weiss, 2002; Р. Cano, 2013; J. Gorham, 2006; J. Waters, 2008; М. Raghavan, 2005) у відповідь на здійснення трансфузії в організмі реципієнта спрацьовує імунологічна система. Важливими показниками якої є IgM - антитіла гострого періоду імунної відповіді, що синтезуються плазматичними клітинами за першого контакту з певним патогеном. IgM має одразу 10 центрів зв'язування антигенів, що особливо актуально саме в гострий період інфекції, коли є необхідність у швидкому розпізнаванні й знищенні великої кількості патогену. Згідно опрацьованої літератури (Waters, 2008) IgM здатні активувати комплемент, що забезпечує реалізацію комплементзалежної цитотоксичності. У середньому високі концентрації специфічних IgM реєструються із 6–7-го дня після інфікування, пізніше рівень IgM знижується на фоні підвищення вмісту IgG, тобто відбувається переключення з синтезу IgM на IgG.

IgG — антитіла пізньої фази імунної відповіді, що починають синтезуватись після періоду переважання IgM. У властивостях IgG враховані умови періодів регресу

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

клінічних проявів і реконвалесценції запального процесу, протягом яких кількість патогену зменшується і першочерговим для виліковування є якість розпізнавання антигену. Для успішної ерадикації патогену необхідне забезпечення надійного контролю периферичних тканин з боку імуноглобулінів на предмет наявності патогену. IgG, що мають лише 2 центри зв'язування антигену й меншу молекулярну масу, мають кращу здатність проникати до периферичних тканин. Високі рівні специфічних IgG реєструються в періоди регресу клінічних проявів і реконвалесценції при гострому процесі. Специфічні IgG можуть продукуватися й циркулювати в сироватці крові протягом тривалого терміну після виліковування, оскільки саме цей клас антитіл продукують клітини імунної пам'яті(Т.В. Глазанова, 2015; Е. Delaflor-Weiss , 2002).

IgA — це імуноглобуліни слизових оболонок і шкіри. Розрізняють сироваткову і секреторну форми (sIgA). Дефіцит sIgA може бути пов'язаний як зі зниженням концентрації сироваткової форми, яка є попередницею секреторної, так і з порушенням діяльності епітелію, де для IgA синтезується секреторний компонент, що захищає молекулу імуноглобуліну від розщеплення травними ферментами(Т.В. Глазанова, 2015 J. Waters, 2008; М. Raghavan, 2005).

Одним із важливих показників, що характеризує стан гуморальної ланки імунної системи організму, є рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). ЦІК – комплекси, які складаються з антигенів, антитіл і пов'язаних з ними компонентів комплементу C3, C4, C1q. У нормі імунні комплекси, що утворилися в кровотоці, фагоцитуються і руйнуються, а при збільшенні їх розміру (при надлишку антигенів і присутності в їх структурі IgM, компонента комплементу C1q) комплекси можуть відкладатися в периваскулярному просторі і корковому шарі нирок, викликаючи активацію комплементу і запальні процеси. Патологічні реакції на імунні комплекси можуть бути обумовлені підвищенням швидкості їх утворення над швидкістю елімінації, дефіцитом одного або декількох компонентів комплементу або функціональними дефектами фагоцитарної системи (N. Stepura, 2020).

Таким чином **мета** роботи полягала у вивченні змін вмісту імуноглобулінів та циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові кролів-реципієнтів за алогенної трансфузії цільної крові.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для досліджень були зразки сироватки крові, що отримані від 5 кролів на 3, 8 та 23 доби після трансфузії. Кролям переливали цільну кров.

У дослідях використовувалися клінічно здорові тварини (кролі). Раціон годівлі дослідних тварин відповідав потребі в поживних і біологічно активних речовинах. Тварини мали вільний доступ до води.

Експерименти на тваринах проведені з дотриманням вимог «Загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна) та положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010).

Кров у тварин-донорів відбирали з яремної вени напівзакритим методом, попередньо обробивши ділянку шкіри 70 % етиловим спиртом. Зразки донорської крові кролів були заготовлені в полімерні контейнери з антикоагулянтom ЦФДА.

Утримання тварин, трансфузію, маніпуляції та виконання досліджень проводили на базі та в умовах НВЦ «Ведмедсервіс», ННЛ «Банк крові тварин» та кафедри хірургії і патофізіології ім. акад. І.О. Поваженка НУБіП України.

Дослідження вмісту імуноглобулінів у сироватці крові кролів. В основу цього дослідження

покладено метод Манчіні, котрий заснований на вимірюванні діаметра кільця преципітації, що утворюється при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в товщі агара в якому попередньо деспиригована моноспецифічна сироватка та застосовується для оцінки функціонального стану В-ланки імунної системи. Діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації досліджуваного імуноглобуліна (И.А. Кондратьева, 2004).

Нормальні показники імуноглобулінів у дорослих кролів становлять:

IgA - 1,25 – 2,5 г/л

IgG - 7,5 – 15,45 г/л

IgM - 1,25 – 2,5 г/л

Визначення циркулюючих імунних комплексів проводили методом, що ґрунтується на вибірковій преципітації високомолекулярних імунних комплексів, що містяться у сироватці крові, поліетиленгліколем з молекулярною масою 6000 Да із подальшим визначенням оптичної щільності через спектрофотометрування за $\lambda = 450$ нм (Ю.А. Гриневич, 1981).

Результати дослідження та їх обговорення. Згідно проведених досліджень встановлено, що при здійсненні трансфузії цільної крові у сироватці крові кролів-реципієнтів спостерігали тенденцію до зменшення імуноглобулінів класу G на 3 добу та достовірне зниження вмісту

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

імуноглобуліну класу G на 7 та 23 доби експерименту. Такі зміни очевидно свідчать про те, що імуноглобуліни цього класу зв'язуються із трансплантованими антигенами донорської крові (білки сироватки, корпускулярні антигени) активують білки системи комплементу, утворюючи велику кількість циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові тварини реципієнта. Варто відмітити також що цей клас імуноглобулінів досить легко проникає в екстравакулярний простір

здійснюючи захисну функцію на відміну від Ig M.

Під час дослідження в сироватці крові імуноглобулінів класу A ми спостерігали тенденцію до зниження їх вмісту в сироватці крові на 3, 8 і 23 доби експерименту. Тенденцію до зниження Ig A можна пояснити взаємодією цих Ат із CD-рецепторами трансплантованих клітин крові (еритроцити, різні види лейкоцитів, тромбоцити) та гуморальними антигенами.

1. Динаміка змін вмісту імуноглобулінів у сироватці крові кролів за алогенної трансфузії цільної крові ($M \pm m$, $n=5$)

№ п/п	Досліджувані імуноглобуліни	Вихідний стан	3 доба	8 доба	23 доба
1	Ig M, г/л	1,41±0,04	2,1±0,08***	1,45±0,3	1,1±0,11*
2	Ig G, г/л	8,67±0,06	8,66±0,12	7,69±0,13***	7,88±0,16**
3	Ig A, г/л	1,27±0,06	0,57±0,064	0,72±0,02	0,48±0,04

Примітка * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Імуноглобулін класу M є найбільшим за молекулярною масою імуноглобуліном та основним фігурантом ранньої специфічної імунної відповіді. Нами встановлено (рисунок 1) що, вміст імуноглобуліну класу M у сироватці крові кролів-реципієнтів на 3 добу експерименту достовірно збільшився відносно вихідного стану на 49 %. Варто відмітити, що у тварин вміст Ig M мав тенденцію до зниження щодо 3 доби

експерименту. На 23 добу експерименту було зафіксовано зниження вмісту імуноглобуліну на рівні та нижче вихідного стану (табл.1.). Це пояснюється утворенням антитіл гострого періоду імунної відповіді, що синтезуються плазматичними клітинами при першому контакті з певним патогеном, після 8 доби зафіксовано зниження, оскільки почався синтез імуноглобулінів Ig G.

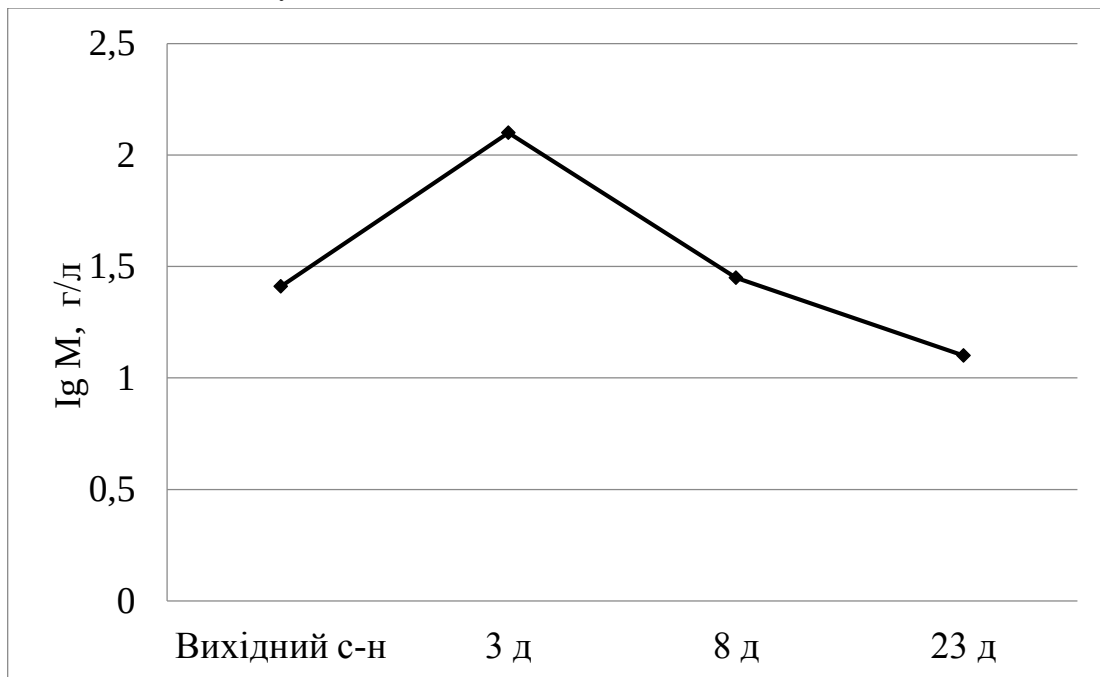


Рис. 1. Зміни вмісту імуноглобулінів класу М у сироватці крові тварин за переливання цільної крові

У роботі здійснено аналіз вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові, оскільки даний показник має важливе значення при оцінці ефективності проведеного лікування. Згідно з даним у таблиці 2. видно, що ЦІК на 3, 8 та 23 доби після здійснення трансфузії зростає відповідно на 80,8, 73,1 та 15,4 %. Варто відмітити, що в нормі в організмі ссавців імунні комплекси утворюються у крові, руйнуються як

фагоцитами так і клітинами печінки. Достовірне збільшення циркулюючих імунних комплексів в організмі кролів-реципієнтів на 3 і 8 доби експерименту, очевидно, відбувається за рахунок надлишку гуморальних (білків плазми крові) і клітинних антигенів (еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів) та активації системи комплементу за алогенної трансфузії в організмі тварин-реципієнтів.

2. Динаміка змін цитотоксичної активності лімфоцитів та циркулюючих імунних комплексів у крові кролів першої групи за алогенної трансфузії цільної крові ($M \pm m$, $n=5$)

№ п/п	Досліджуваний показник	Вихідний стан	3 доба	8 доба	23 доба
1	ЦІК, ум.од/л	$2,6 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,45^{**}$	$4,5 \pm 0,6^*$	$3,0 \pm 0,7$

Примітка * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Отже підвищення ЦІК активує їх до взаємодії з системою комплементу, калікреїн-кініновою системою

згортання крові та іншими регуляторними системами організму, спричиняють розвиток реакції

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

запалення й пошкодження тканин організму. З іншої сторони, даний показник вказує на спроможність імунної системи зв'язувати антигени в організмі тварин-реципієнтів та виводити їх з організму.

Висновки. Встановлено, що за алогенної трансфузії цільної крові кролям-реципієнтам відбувається достовірне підвищення вмісту імуноглобулінів класу М у сироватці крові на 3 добу експерименту та зниження їх вмісту на 23 добу експерименту.

Показано, що за алогенної трансфузії цільної крові кролям-реципієнтам відбувається зниження вмісту імуноглобулінів класу G та A в

Список використаних джерел

1. Dendrou C., Fugger L., Friesen M. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015. №15. P.545–558.
2. Степура Н., Замотаєва Г., Терехова Г., Волинець І. Вміст циркулюючих імунних комплексів у хворих на дифузний токсичний зоб, ускладнений автоімунною офтальмопатією. *Ендокринологія.* 2020. Том.25. №4. С. 305-309. <https://doi.org/10.31793/1680-1466.2020.25-4.305>
3. Глазанова Т.В. и др. Выработка аллогенных антител к антигенам лейкоцитов и тромбоцитов (анти-HLA и анти-НРА) у больных с заболеваниями системы крови на фоне трансфузий компонентов крови. *Гематология и трансфузиология.* 2015. т. 60, № 4. С 26-29.
4. Delaflor-Weiss E., Mintz P.D. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus. Med. Rev.* 2002. № 14(2). P. 180–96.
5. Cano P., Patel H., Cao K. Anti-HLA-class-I antibodies and platelet transfusion refractoriness. *Human Immunol.* 2013. № 74. P. 169–170.

сироватці крові впродовж 23 діб експерименту.

Алогенна трансфузія цільної крові в організмі кролів-реципієнтів активує утворення в сироватці крові тварин циркулюючих імунних комплексів, які можуть відкладатися в периваскулярному просторі й кірковому шарі нирок, викликаючи активацію комплемента та запальні процеси.

Перспективи подальших досліджень. Провести дослідження щодо реакції клітинної ланки імунітету в організмі тварин-реципієнтів за алогенної трансфузії цільної крові.

6. Gorham J. Transfusion tickles T cells through cross-priming. *Blood.* 2006. Vol. 107. N1. P. 6–7.
7. Waters J. Trauma surgery and transfusion options. *International Trauma Care.* 2008. Vol. 18, N1. P. 66–69.
8. Raghavan M., Marik P. Anemia, allogenic blood transfusion, immunomodulation in the critically ill. *Chest.* 2005. Vol.127. P. 295–307.
9. Рубанець М.М., Потапов О.О. Основні принципи і методики переливання компонентів, препаратів крові та кровозамінників: навч.-мед. посіб. для студентів лікарів-інтернів та лікарів. Суми: СУМДУ, 2005. 69 с.
10. Кондратьева И.А. Практикум по иммунологии: практикум. Москва, 2004. 27 с.
11. Гриневич Ю.А., Алферов, А. Н. Определение циркулирующих иммунных комплексов в крови онкологических. *Лаб. дело.* 1981. №8. С.493–495.

References

1. Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friesen, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558.

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

2. Stepura, N. N., Zamotayeva, G. A., Terekhova, G. N., & Volynets, I. P. (2020). The content of circulating immune complexes in patients with diffuse toxic goiter complicated by autoimmune ophthalmopathy. *Endocrinology*, 25(4), 305-309. <https://doi.org/10.31793/1680-1466.2020.25-4.305>

3. Glazanova, T. V., Hrytsaev, S. V., Shilova, E. R., Pavlova, I. E., Chubukina, Zh. V., Rozanova, O. E., ... & Bubnova, L. N. (2015). Production of allogeneic antibodies to antigens of leukocytes and platelets (anti-HLA and anti-HPA) in patients with diseases of the blood system against the background of transfusions of blood components. *Hematology and Transfusiology*, 60(4), 26-29.

4. Delaflor-Weiss, E., & Mintz, P. D. (2000). The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfusion medicine reviews*, 14(2), 180-196.

5. Cano, P., Patel, H., & Cao, K. (2013). Anti-HLA-class-I antibodies and platelet

transfusion refractoriness. *Human Immunology*, 74, 169.

6. Gorham, J. D. (2006). Transfusion tickles T cells through cross-priming. *Blood*, 107(1), 6-7.

7. Waters, J. (2008). Trauma surgery and transfusion options. *Int Trauma Care*, 18, 66-70.

8. Raghavan, M., & Marik, P. E. (2005). Anemia, allogenic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill. *Chest*, 127(1), 295-307.

9. Rubanets M.M., & Potapov O.O. (2005). *Basic principles and methods of transfusion of components, blood preparations and blood substitutes*. Sumi: SUMDU.

10. Kondratieva I.A. (2004). Workshop on immunology. Moscow.

11. Hrynevych, Yu. A., & Alferov, A. N. (1981). Determination of immune complexes in the blood of cancer patients. *Lab. Case*, 8, 493-496.

CHANGES IN THE CONTENT OF IMMUNOGLOBULINS AND CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN THE BLOOD SERUM OF RABBIT RECIPIENTS DURING ALLOGENEOUS WHOLE BLOOD TRANSFUSION

O. V. Egorov, M. O. Malyuk, M. V. Savchuk

Abstract. The paper presents the results of research on changes in the content of immunoglobulins and circulating immune complexes in the blood serum of recipient rabbits after allogeneic whole blood transfusion. The relevance of the work is determined by the importance of monitoring the state of immunoglobulins and CIC, since these indicators inform about the success of the blood transfusion procedure and the removal of the material by the recipient's immune system. Thus, the aim of the work was to study changes in the content of immunoglobulins and CIC in the blood serum of recipient rabbits. The material for research was blood serum samples obtained from 5 rabbits on 3, 8 and 23 days after transfusion. In the experiments, clinically healthy animals were used, which were transfused with whole blood. The feeding diet of the experimental animals met the need for nutrients and biologically active substances, the animals had free access to water. Blood from donor animals was collected from the jugular vein using a semi-closed method. Donor blood samples of rabbits were prepared in polymer containers with the anticoagulant Tsfda. Keeping animals, transfusions, manipulations and conducting research were carried out on the basis and in the conditions of Vedmedservis NSC, Animal Blood Bank>NNL and the Department of Surgery and Pathophysiology named after Acad. I.O. Povazhenka, NULES of Ukraine. The study of the content of immunoglobulins in the blood serum of rabbits

Сторов О. В., Малюк М. О., Савчук М. В.

was carried out according to the Mancini method, the CIC was determined by the method based on the selective precipitation of high molecular weight immune complexes contained in the blood serum with polyethylene glycol with a molecular weight of 6000 Da, followed by the determination of the optical density by spectrophotometry at $\lambda = 450$ nm. Based on the results of the research, it was established that with allogeneic transfusion of whole blood to recipient rabbits, there is a significant increase in the content of immunoglobulins of class M in blood serum on the 3rd day of the experiment and a decrease in their content on the 23rd day of the experiment. It was shown that with allogeneic transfusion of whole blood to recipient rabbits, the content of immunoglobulins of class G and A in blood serum decreases during the 23 days of the experiment. Allogeneic transfusion of whole blood in the body of recipient rabbits activates the formation of circulating immune complexes in the blood serum of animals, which can be deposited in the perivascular space and cortical layer of the kidneys, causing complement activation and inflammatory processes.

Keywords: hemotransfusion, immunoglobulins, immune complexes, immune response, recipient