

Zmienność immunofenotypu leukocytów w przebiegu infekcji BLV u bydła

IWONA OTROCKA-DOMAGAŁA, SEBASTIAN SŁODKI, TADEUSZ ROTKIEWICZ

Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Otrocka-Domagala I., Słodki S., Rotkiewicz T.

Immunophenotypic variability of leukocytes in cattle infected with BLV

Summary

The article presents the results of research done to date on the variability of expression of superficial markers on leukocytes in cattle infected with bovine leukemia virus (BLV). Studies carried out so far show that these changes mainly concern B lymphocytes, and, to a lesser degree monocytes, macrophages and T lymphocytes. The article also describes the role of flow cytometry as a quick and precise method for assessing immunophenotype cells in the process of leukemia in cattle.

Keywords: BLV, antigen markers, flow cytometry, leukocytes

Enzootyczna białaczka bydła (EBL) jest chorobą wywołaną przez wirus białaczki – BLV (Bovine Leukemia Virus) należący do rodziny onkogennych retrowirusów. Retrowirusy wnikają do genomu komórek, przyczyniają się do transformacji nowotworowej limfocytów i neoplazji tkanki limfatycznej (5, 26). Po zakażeniu wirus atakuje przede wszystkim limfocyty typu B, które stają się miejscem replikacji wirusa. Prowirusowy DNA jest wykrywany również w monocytach, makrofagach, granulocytach i limfocytach T (6, 27, 32, 35, 36). Infekcja BLV może przyjmować postać bezobjawowej białaczki aleukemicznej, przewlekłej limfocytozy spowodowanej poliklonalnym nienowotworowym namnażaniem się limfocytów typu B, limfoproliferacji nowotworowej oraz chłoniakomięsaków (15, 22, 32, 39). Zakażenie wirusem białaczki prowadzi więc do zmian w populacjach komórek układu białokrwinkowego, które można stwierdzić, badając ekspresję antygenów powierzchniowych komórek prawidłowych i nowotworowych.

Każda komórka organizmu posiada charakterystyczny garnitur antygenów zwanych cząsteczkami różnicowania CD (Cluster of Differentiation). Mianem CD u zwierząt określane są tylko te markery, które są homologiczne z ludzkimi. Stwierdza się także dużą liczbę markerów zwierzęcych, odmiennych od ludzkich, które oznacza się symbolem WC (Workshop Cluster). Rozwój nowych metod badawczych pozwala śledzić zmiany immunofenotypu poszczególnych grup komórek w przebiegu zarówno procesów fizjologicznych, jak i patologicznych, toczących się w organizmie zwierząt. Istnieją markery, które występują na powierzchni wielu typów komórek, ale są i takie, które występują na ściśle określonej populacji, a nawet subpopulacji komórek. Do oznaczania zachodzących zmian coraz częściej wykonuje się badania z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, komplementarnych dla ściśle określonego epitopu anty-

geny. Właściwości te wykorzystano, między innymi, w badaniach przy użyciu cytometru przepływowego. Metoda ta umożliwia szybkie i dokładne oznaczenie różnych antygenów powierzchniowych, w tym markerów charakterystycznych dla poszczególnych populacji i subpopulacji krwinek białych. Umożliwia ona wykrywanie pojawiających się antygenów w różnych etapach dojrzewania i różnicowania się komórek, a także brak antygenów powierzchniowych w komórkach typowych dla warunków fizjologicznych. Zaburzenia te są często spotykane w przebiegu chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, a zwłaszcza białaczek i chłoniaków, dlatego badania zmienności w występowaniu antygenów powierzchniowych w tych zachorowaniach mają bardzo duże znaczenie diagnostyczne i prognostyczne.

W diagnostyce infekcji wirusem BLV najczęściej stosuje się testy ELISA, immunodyfuzji w żelu agarowym (ID) oraz bardziej czułą i dokładną metodę PCR (23-25). Być może, dzięki swoim właściwościom, metoda cytometrii przepływowej znajdzie również szerokie zastosowanie w diagnostyce oraz w badaniu procesu białaczkowego u bydła.

Właściwości immunofenotypowe limfocytów typu B w przebiegu enzootycznej białaczki bydła (EBL)

W przebiegu EBL u bydła zmiany hematologiczne i fenotypowe dotyczą głównie komórek linii B. Charakterystycznymi markerami tych komórek są przede wszystkim przeciwciała klasy IgM, które są obecne na ich powierzchni. Mniej liczne są przeciwciała klasy IgG1, IgG2 oraz IgA. Stwierdzono także obecność cząsteczek typu WC3 (CD21-like), WC4 (zbliżonej do ludzkiej CD19), WC6 i WC10 (37, 38). Markerami limfocytów B są również antygeny powierzchniowe typu CD5 i CD11b, które mają duże znaczenie w diagnozowaniu białaczek u bydła.

Cząsteczka CD5 jest glikoproteina, która składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 67 kDa. Jest ona obecna na błonach komórkowych niektórych subpopulacji komórek linii B, występujących we krwi obwodowej i śledzionie zdrowego bydła, oraz na wszystkich dojrzałych limfocytach typu T (20, 39). Okazuje się, że w ok. 30% przypadków białaczek, przebiegających z przewlekłą limfocytózą (PL – Persistent Lymphocytosis), ma miejsce proliferacja limfocytów B CD5⁺, w większości których ukrywa się prowirus BLV (6, 18).

W przebiegu infekcji wirusem BLV dochodzi do ekspresji białek wirusowych na powierzchni zakażonych komórek. Wykazano, że limfocyty B prezentujące białka wirusa zatrzymują się w fazie G₀/G₁ cyklu komórkowego, co zapobiega ich obumieraniu drogą apoptozy. W komórkach tych ma miejsce produkcja białek wirusowych i tym samym stają się one trwałym rezerwuarem wirusa w organizmie. Dowiedziono, że limfocyty B prezentujące antygeny wirusowe stymulują proliferację tych subpopulacji limfocytów typu B, które nie biorą udziału w ekspresji cząsteczek wirusowych. Komórki proliferujące nie posiadające na swojej powierzchni antygenów wirusowych są podatne na apoptozę, jednak nie wiadomo, czy nie zawierają one prowirusowego DNA w swoim genomie. W ten sposób dochodzi do spontanicznego namnażania się przede wszystkim tych limfocytów B, które nie prezentują wirusa, co ma miejsce w przypadku białaczki przebiegającej z przewlekłą limfocytózą (31). Zwiększona ekspresja białek wirusowych stymuluje również limfocyty T CD4⁺. Ekspresja mRNA kodującego interferon γ (IFN- γ), IL-2 i IL-4 jest niższa w PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) pobranych od krów BLV⁺PL⁺ w porównaniu z komórkami pobranymi od krów BLV⁻, co świadczy, że progresja infekcji BLV w kierunku PL⁺ jest związana z redukcją klasycznych cytokin wydzielanych przez limfocyty pomocnicze Th1 i Th2 (1, 31).

Najczęściej wykorzystywanym przeciwciałem w diagnozowaniu białaczek bydła jest przeciwciało anti-gp51 BLV. Antygen BLV gp51 jest glikoproteina otoczki wirusa, odpowiedzialną za jego podstawowe właściwości biologiczne, jak: infekcyjność, zdolność stymulacji przeciwciał neutralizujących i cytotoxicznych oraz wywołania efektu syncytialnego (24). Jego ekspresja na komórkach APC (Antigen Presenting Cells) uruchamia mechanizmy interakcji międzykomórkowych, które mobilizują siły obronne ustroju (16). Na podstawie całkowitej liczby zainfekowanych komórek (BLV gp51⁺) u seropozytywnych zwierząt, ale nie wykazujących zmian hematologicznych, można zaobserwować różną szybkość i zasięg rozprzestrzenienia się wirusa w organizmie. Może to być związane ze swoistą, genetycznie uwarunkowaną reakcją gospodarza na zakażenie wirusem BLV (18).

Oprócz antygeny BLV gp51 w diagnozowaniu białaczek bydła duże znaczenie mają: glikoproteina otoczki BLV gp30 oraz polipeptyd kapsydowy p24 (1, 3, 22, 23).

W badaniach przeprowadzonych przez Meiom i wsp. (17) przy użyciu trójbarwnej cytometrii przepływowej zwrócono uwagę na różnice immunofenotypowe krwi-

nek białych u bydła zdrowego i EBL z przewlekłą limfocytózą. Badano występowanie antygeny wirusowego BLV gp51, markerów komórkowych IgM i CD5 na powierzchni komórek PBMC. Stwierdzono, że występowanie tych markerów u bydła z przewlekłą limfocytózą jest zróżnicowane. Większość komórek PBMC posiadała jednocześnie wszystkie trzy antygeny, a pozostałe w zmiennych ilościach wykazywały obecność dwóch antygenów: BLV gp51 i IgM; BLV gp51 i CD5; IgM i CD5.

Wu i wsp. (39) przeprowadzili badania ekspresji antygenów powierzchniowych na komórkach PBMC i komórkach pobranych z guzów białaczkowych w tkankach bydła, u którego klinicznie, hematologicznie i anatomicznie stwierdzono enzoptyczną białaczkę. Analizę immunofenotypu komórek PBMC i komórek z nacieków nowotworowych w tkankach wykonali metodami immunohistochemicznymi i cytometrii przepływową. W przypadku bydła z EBL antygen CD5 na swojej powierzchni posiadało ok. 43,1% komórek PBMC i ok. 23,59% komórek guzów nowotworowych. U osobników zdrowych marker ten prezentowało około 77% komórek PBMC. Tylko u jednej z chorych krów stwierdzono wysoki poziom ekspresji IgM, tj. 63,6% na komórkach PBMC i 21,6% na komórkach z guzów nowotworowych. U pozostałych zainfekowanych zwierząt średnia liczba komórek PBMC IgM⁺ wynosiła tylko 23,41%, natomiast najmniejszą liczbę komórek IgM⁺, tj. 3,78% stwierdzono w guzach nowotworowych. Zbadali oni także ekspresję innych markerów powierzchniowych, w tym B-B2, CD11b, CD3, CD4, CD8, WC1-N2, MHC II wykazując, że komórki pochodzące z guzów nowotworowych prezentują znacznie niższy poziom wszystkich badanych antygenów niż komórki PBMC. Wyniki te znacznie różnią się od otrzymanych przez Meiom i wsp. (17), co świadczy o dużej zmienności immunofenotypu komórkowego u bydła w przebiegu białaczek. Wu i wsp. (39) na podstawie otrzymanych wyników podzielili limfocyty B na trzy linie komórkowe: limfocyty B1a – prezentujące antygen CD11b i CD5; B1b – prezentujące CD11b przy braku CD5 i limfocyty B konwencjonalne, nie prezentujące ani antygenów CD11b, ani CD5. W rozwoju białaczki u bydła mogą brać udział różne linie komórek typu B, to znaczy zarówno B1a, B1b, jak i limfocyty B konwencjonalne, co powoduje złożony i często bardzo odmienny obraz immunofenotypowy komórek. Jednakże limfocyty B1 są bardziej podatne na transformację nowotworową niż konwencjonalne i to właśnie one odpowiadają za powstawanie guzowatej formy białaczki, poprzedzonej limfoproliferacją nowotworową (15, 19, 39).

Prowirusowy DNA jest wykrywany zarówno w CD5⁺, jak i CD5⁻ limfocytach B krwi obwodowej bydła zainfekowanego BLV, jednak tylko limfocyty B CD5⁺ mogą być punktem wyjścia chłoniaka. Natomiast u owiec chłoniaki mogą wywodzić się z obu linii komórkowych B, tj. CD5⁺ i CD5⁻ (39). Także wczesne zmiany immunofenotypu komórek nie dają podstawy do stwierdzenia, czy rozwinie się przewlekła limfocytosis, czy też nie w przebiegu infekcji BLV. Dopiero w późniejszym okresie zmiany immunofenotypu komórek, objawiające się m.in.

pojawieniem się markerów z wczesnego okresu dojrzewania, mogą wskazywać na niepoohamowany, klonalny rozplam komórek różnych subpopulacji limfocytów typu B.

Klintevall i wsp. (12) zauważyli natomiast, że ostra limfocytoza pojawia się równolegle z rozwojem odpowiedzi serologicznej na infekcję BLV, tzn. po około czterech do pięciu tygodni po infekcji. Wykazali oni, że od tego momentu wzrasta liczba limfocytów typu B z ok. 19,1% do 37,9% oraz spada liczba wszystkich limfocytów T z ok. 36,7% do 22,7%. Stwierdzili ponadto, że wzrost liczby limfocytów B u krów BLV⁺ jest proporcjonalny do całkowitej liczby komórek CD5⁺, co wskazywałoby, że komórki te są dominującą populacją limfocytów B u bydła białaczkowego. Dalsze badania wykazały, że spadek liczby komórek T był spowodowany zmniejszeniem się liczby limfocytów T – zarówno CD4⁺, jak i T CD8⁺.

Analizę immunofenotypu komórek w przebiegu infekcji BLV przeprowadzili również Mirsky i wsp. (18). Stwierdzili oni, że u bydła BLV⁺ bez przewlekłej limfocytozy komórki CD5⁺ stanowią około 9,2%, a komórki CD5⁻ 0,1% liczby limfocytów typu B. Natomiast u bydła BLV⁺ z przewlekłą limfocytozą komórki CD5⁺ stanowią około 66%, zaś komórki CD5⁻ 13,9% całkowitej liczby limfocytów typu B, co świadczy, że również w przebiegu przewlekłej limfocytozy następuje przede wszystkim znaczny wzrost liczby komórek CD5⁺.

Z dotychczasowych badań wynika, że infekcja BLV nie zawsze prowadzi do wystąpienia przewlekłej limfocytozy, jednak w każdym przypadku powoduje silną reakcję ze strony układu immunologicznego w postaci wzrostu liczby aktywowanych limfocytów B i T. Zwiększona ekspresja białek wirusowych stymuluje limfocyty T CD4⁺. Do prześledzenia mechanizmów tego procesu Isaacson i wsp. (10) posłużyli się dwukolorową cytometrią przepływową i przeanalizowali stopień ekspresji MHC klasy II i receptora CD25 dla łańcucha α IL2 na komórkach PBMC bydła BLV⁺. Białka MHC i receptor CD25 należą do tak zwanych markerów aktywacji i występują zarówno na limfocytach typu B, jak i T, podlegając ciągłym zmianom. Główną funkcją cząsteczek MHC jest wiązanie i prezentacja antygenów limfocytom T przez komórki prezentujące antygen (APC) (16). W badaniach wykazano wzrost ekspresji białek MHC II na świeżo izolowanych jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej bydła nie wykazującego przewlekłej limfocytozy, oraz wzrost liczby komórek prezentujących antygen CD25 (10). Wzrost ekspresji MHC II świadczy o nasilonej prezentacji antygeny, w tym przypadku białek wirusa BLV, co wzmacnia odpowiedź układu immunologicznego. Obniżona proliferacja komórek, a tym samym brak przewlekłej limfocytozy w przebiegu infekcji BLV, może mieć związek z występowaniem pewnych typów MHC u bydła, oraz obecnością na ich powierzchni aminokwasów Glu-Arg w regionie wiązania domnianego antygeny (13, 14).

Immunomodulująca działalność wirusa BLV objawia się również wzrostem ekspresji i produkcji różnego rodzaju cytokin, wpływających bezpośrednio i pośrednio

na funkcję i wzajemne oddziaływanie komórek układu immunologicznego. Badania przeprowadzone przez Stone i wsp. (30) u bydła BLV⁺ po stymulacji hodowli komórkowych IL-2 wykazały znaczne różnice w ekspresji markerów aktywności komórkowej u bydła zdrowego i białaczkowego oraz różną reakcją komórek na pobudzenie. IL-2 spowodowała wzrost ekspresji receptora CD25 na limfocytach B u bydła z przewlekłą limfocytozą, nie stwierdzono natomiast reakcji ze strony limfocytów typu B u bydła zdrowego. Tylko w nieznacznym stopniu nastąpił wzrost ekspresji markerów aktywności komórkowej na limfocytach typu T po stymulacji IL-2 (29, 30). IL-2 jest cytokiną produkowaną przez pobudzone limfocyty głównie typu Th w wyniku oddziaływania na nie IL-1 i IL-6, wydzielanych przede wszystkim przez makrofagi. Stymuluje ona proliferację limfocytów T i B, oraz aktywuje komórki NK i makrofagi do odpowiedzi immunologicznej. Upośledzenie jej sekrecji powoduje zachwianie równowagi immunologicznej i znaczny spadek sił obronnych organizmu (9, 11, 15). Ponadto, zaburzenia odpowiedzi immunologicznej gospodarza w przebiegu infekcji BLV są związane ze zmianą ekspresji L-selektyny (8). Dusinsky i wsp. (8) przeprowadzili badania nad ekspresją L-selektyny na powierzchni komórek PBMC pochodzących z krwi bydła zdrowego, zainfekowanego BLV⁺PL⁻ oraz BLV⁺PL⁺. Wykazali, że liczba komórek linii B prezentujących L-selektynę była najwyższa u bydła zdrowego i wynosiła ok. 60,2%. U bydła zainfekowanego nastąpił spadek ekspresji L-selektyny do poziomu ok. 43,8% u sztuk PL⁻ i 22,5% u sztuk PL⁺. L-selektyna (leukocyarna) pośredniczy zarówno w krążeniu limfocytów, jak i w przechodzeniu neutrofilów przez ścianę naczyń krwionośnych, co jest czynnikiem determinującym sprawną odpowiedź immunologiczną. Dlatego tak znaczny spadek ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach immunokompetentnych, w tym przypadku limfocytach typu B, upośledza ich funkcję (11).

Do powstania przewlekłej limfocytozy w przebiegu infekcji BLV może prawdopodobnie przyczyniać się wzrost ekspresji receptorów dla czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) na powierzchni limfocytów typu B (19). GM-CSF jest hematopoetycznym hormonem, który stymuluje proliferację, dojrzewanie i różnicowanie prekursorów granulocytów i monocytów, wczesnych komórek macierzystych dla erytrocytów, a także megakariocytów. Działa też aktywująco na dojrzałe granulocyty i monocyty. Wydzielany jest przez limfocyty T, komórki śród-błonka, fibroblasty i makrofagi (11, 19). Murakami i wsp. (19) analizą cytometryczną potwierdzili podwyższony poziom receptorów dla GM-CSF na limfocytach B1a w przebiegu przewlekłej limfocytozy, co wskazywałoby, że zwiększona proliferacja limfocytów B może być indukowana przez ten czynnik. Autorzy zauważyli, że proliferacja komórek chłoniaków i komórek guzów nowotworowych również przebiega ze wzrostem ekspresji receptorów dla GM-CSF. Stwierdzono także różną wrażliwość badanych komórek na pobudzenie GM-CSF. Okazało się, że zależność między stopniem proliferacji

a ekspresją receptora dla GM-CSF jest w pełni skorelowana tylko w przypadku komórek guza. Różnica ta wynika najprawdopodobniej z różnego stopnia integracji komórek z genomem wirusa. Na podstawie otrzymanych wyników badań Murakami i wsp. (19) stwierdzili, że zaburzona regulacja genów dla hematopoetycznych czynników wzrostu (m.in. GM-CSF) i ich receptorów może być jednym z decydujących mechanizmów prowadzących do leukemogenezy.

Immunofenotyp makrofagów i monocytów w przebiegu infekcji BLV

Wirus BLV może powodować zmiany w immunofenotypie makrofagów i monocytów, zainfekowanych prowirusowym DNA, chociaż rola tych komórek w przebiegu EBL nie została do końca poznana. Ocenę wybranych antygenów powierzchniowych, tj.: CD14, DH59B, CD11, CD32 i MHCII, na izolowanych monocytach z krwi obwodowej i wywodzących się z nich makrofagach przeprowadzili Werling i wsp. (35). Stwierdzili oni, że liczba monocytów CD14⁺ w próbie od bydła BLV⁺ była podobna jak w próbie pochodzącej od bydła BLV⁻. Monocyty CD14⁺ bydła BLV⁺ wykazywały niższy poziom ekspresji markerów CD32 posiadających receptory Fc γ RII dla fragmentu Fc przeciwciał IgG w porównaniu z monocytami bydła BLV⁻ (35). Receptor CD14 jest specyficznym powierzchniowym markerem monocytów i makrofagów u przeżuwaczy (2, 28). Receptor ten łączy się z obcymi antygenami, a powstałe kompleksy prowadzą do aktywacji procesów fagocytarnych i zniszczenia patogenu (9, 11). Pomimo większej liczby komórek posiadających receptory CD32 (Fc γ RII), intensywność ich ekspresji na monocytach była obniżona u bydła zainfekowanego BLV (35). Receptor Fc γ RII jest fizjologicznie obecny na większości krwinek białych i na wszystkich komórkach mających Fc γ R, z wyjątkiem komórek NK. Jego rola polega na wiązaniu fragmentu Fc przeciwciał IgG połączonych z antygenem, co poprzedza ich fagocytozę przez komórki żerne. Fc γ RII występujący na limfocytach B przekazuje sygnał supresyjny limfocytom B, co zwrótnie hamuje odpowiedź humoralną przez przeciwciała zawarte w wolnych kompleksach antygen-przeciwciało. Receptory te uczestniczą również w usuwaniu kompleksów immunologicznych, dzięki czemu nie jest nadmiernie indukowana reakcja zapalna (9, 11). Werling i wsp. (35) zaobserwowali również wzrost liczby komórek prezentujących na swojej powierzchni antygen CD11, izolowanych ze świeżo pobranej krwi, jednak intensywność tej ekspresji była zmniejszona, podobnie jak w przypadku receptora CD32. Antygen CD11 odgrywa bardzo ważną rolę jako składnik receptora C3 dopełniacza oraz w śródkankowej migracji monocytów. Dlatego u bydła zainfekowanego BLV może dojść do znacznego upośledzenia tej funkcji. Ekspresja CD11 jest zależna od działania TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), co wykazali *in vitro* Werling i wsp. (35). Nasuwa się pytanie, czy podwyższony poziom TNF- α u bydła BLV⁺ przyczynia się do zmiany ekspresji CD11. Pytanie to pozostaje nadal bez odpowiedzi.

Infekcja BLV przyczynia się także do spadku ekspresji MHC II na powierzchni monocytów i makrofagów, co zmniejsza ich zdolność do prezentacji antygeny limfocytom T CD4⁺ i prowadzi do zwiększonej wrażliwości na wtórne infekcje wirusem BLV. Czy niższa ekspresja MHC II u bydła jest związana ze wzrostem produkcji IL-10 przez monocyty u bydła BLV⁺, czy z hamującym działaniem IL-10 na ekspresję MHC II, pozostaje nadal do wyjaśnienia (7, 21, 35). Przedstawione powyżej wyniki badań, mimo że są nieliczne, potwierdzają duży wpływ infekcji BLV na zamianę ekspresji wybranych markerów powierzchniowych na monocytach, co prowadzi do upośledzenia zdolności fagocytarnych monocytów i wywodzących się z nich makrofagów w przebiegu EBL.

Zmiany immunofenotypu limfocytów T w przebiegu infekcji BLV

Doniesienia na temat możliwości wnikania BLV do limfocytów typu T są sprzeczne. Niektóre badania dowodzą, że oprócz limfocytów typu B, także limfocyty T CD4⁺ (pomocnicze) i CD8⁺ (cytotoksyczne/supresorowe), mogą niekiedy być komórkami docelowymi wirusa BLV (15, 27, 32, 34). Tymczasem badania Mirsky'ego i wsp. (18) nie dostarczyły przekonujących dowodów na to, że limfocyty typu T są także infekowane przez BLV i zawierają prowirusowy DNA. Autorzy ci uznali, że limfocyty typu B są jedynymi komórkami mononuklearnymi krwi obwodowej, które są infekowane przez wirus BLV.

Głównymi markerami dojrzałych limfocytów T u przeżuwaczy są antygeny CD4, CD8 i WC1. W przebiegu infekcji wirusem BLV w odpowiedzi na ekspresję białka p24 kapsydu wirusa i glikoproteiny otoczkowej gp51 ma miejsce silna proliferacja limfocytów T, a głównie subpopulacji CD4⁺ (1, 31). Limfocyty CD4⁺ stanowią od 25% do 35% limfocytów krwi obwodowej bydła, a ich zadaniem jest rozpoznawanie swoistych antygenów w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II (38). Cząsteczka WC1 jest markerem jednej z głównych subpopulacji limfocytów T, które są CD4⁺CD8⁻, ale TCR $\gamma\delta$ ⁺ (38). Okazuje się, że limfocyty T $\gamma\delta$ prawdopodobnie biorą udział w pierwszej linii obrony układu immunologicznego w przebiegu infekcji wirusowych (33, 34). Łańcuchy $\gamma\delta$ tworzą receptor TCR1 na powierzchni komórki T, który pełni funkcję miejsca rozpoznania antygeny. Oprócz receptora TCR1, który jest obecny na ponad 50% limfocytach u bydła, występuje również receptor TCR2 zbudowany z łańcuchów $\alpha\beta$ (38). Fizjologicznie receptor TCR1 pojawia się jako pierwszy w czasie rozwoju embrionalnego (4).

Ungar-Waron i wsp. (33) zbadali dwie grupy komórek WC1 i WC2 należących do populacji komórek $\gamma\delta$ TCR (33). Dowiedziono, że WC1 $\gamma\delta$ TCR⁺ komórki są głównie infekowane przez BLV, co oznacza, że toczący się proces chorobowy powoduje wzrost produkcji tych komórek u dorosłego bydła, podczas gdy u bydła zdrowego liczba tych komórek znacznie spada z wiekiem. Wirus BLV rzadziej atakuje komórki WC2 $\gamma\delta$ TCR (33). Dusinsky i wsp. (8) obserwowali natomiast ekspresję

L-selektyny na powierzchni limfocytów T. Stwierdzili, że chociaż liczba komórek prezentujących L-selektyne jest porównywalna u bydła zdrowego i zainfekowanego wirusem BLV, to nastąpił około 50% spadek intensywności ekspresji L-selektyny na powierzchni limfocytów T. Ma to duże znaczenie, gdyż L-selektyna jest czynnikiem umożliwiającym limfocytom T zasiedlanie obwodowych narządów limfatycznych i warunkującym ich prawidłowe funkcjonowanie. Przedstawione wyniki badań dowodzą, że reakcja ze strony limfocytów T na zakażenie BLV jest skomplikowana i nadal mało poznana, ale nie mniej ważna niż rola limfocytów typu B czy innych komórek układu immunologicznego.

Podsumowanie

Omówione wyniki badań nad zachowaniem się antygenów powierzchniowych ukazują różnorodność i zmienność układu immunologicznego po zakażeniu wirusem BLV. Pomimo przeprowadzenia wielu szczegółowych analiz immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej nie udało się nakreślić uniwersalnego schematu zmian liczby i rodzaju antygenów powierzchniowych, który pozwoliłby dokonać szybkiego rozpoznania procesu białaczkowego. Niemniej jednak, badania przy użyciu monoklonalnych przeciwciał pozwalają na bardzo dokładną i szybką identyfikację licznych antygenów powierzchniowych komórek, co w niedalekiej przyszłości może stać się cenną metodą diagnostyczną i poznać wielu chorób, w tym nowotworowych. Cyto-metria przepływowa pozwala na szybką i niezwykle dokładną ocenę immunofenotypu tysięcy komórek z rozdziałem na populacje i subpopulacje, ponadto umożliwia precyzyjne rozpoznanie i śledzenie przebiegu choroby, oraz monitorowanie efektów podjętej terapii.

Piśmiennictwo

- Amills M., Ramiya V., Norimine J., Olmstead C. A., Lewin H. A.: Reduced IL-2 and IL-4 mRNA Expression in CD4⁺ T Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected Cows with Persistent Lymphocytosis. *J. Virol.* 2002, 304, 1-9.
- Berthon P., Hopkins J.: Ruminant cluster CD14. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 52, 245-248.
- Bicka L., Kozaczyńska B., Kuźniak J.: Zastosowanie metody western blot i rekombinowanego białka p24 wirusa białaczki bydła w diagnostyce serologicznej. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 586-590.
- Buczek J., Deptuła W., Gliński Z., Jarosz J., Stosik M., Wernicki A.: Immunologia porównawcza i rozwoju zwierząt. Wyd. Nauk. PWN S.A., Warszawa-Poznań 1999.
- Ciminale V., Pavlakis G. N., Derse D., Cunningham C. P., Felber B. K.: Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type 1. *J. Virol.* 1992, 66, 1737-1745.
- Depelchin A., Letesson J. J., Lostric-Trussart N., Mammerickx M., Portetelle D., Burny A.: Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker. *Immunol. Lett.* 1989, 20, 69-76.
- de Waal L., Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarlo M. G., de Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J. E.: Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 1991, 174, 915-924.
- Dusinsky R., Bardotti M., Ponti W.: Decreased expression of L-selectin (CD62L) on lymphocytes in enzootic bovine leukaemia. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2000, 47, 127-132.
- Goląb J., Jakóbsiak M., Lasek W.: Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- Isaacson J. A., Flaming K. P., Roth J. A.: Increased MHC Class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 64, 235-248.
- Jakóbsiak M.: Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1996.
- Klintevall L., Fuxler L., Fossum C.: Bovine leukemia virus: early reflections in blood after experimental infection of calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1997, 20, 119-30.
- Lewin H. A., Bernoco D.: Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Animal Genetics* 1986, 17,197-207.
- Lewin H. A., Wu M. C., Stewart J. A., Nolan T. J.: Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics* 1988, 27, 338-344.
- Madej J. A.: Etiologia i patogenezę nowotworów. α -Medica Press 1996.
- Madej J. A.: Podstawy cytopatologii. Wyd. Med. Urban&Partner, Wrocław 2003.
- Meirom R., Moss S., Brenner J.: Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers of infected lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1997, 59, 113-119.
- Mirsky M. L., Olmstead C. A., Da Y., Lewin H. A.: The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J. Virol.* 1996, 70, 2178-2183.
- Murakami K., Inumaru S., Yokoyama T., Okada K., Sentsui H.: Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on B-1a cell from persistent lymphocytosis (PL) cows and lymphoma cell induced by bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 68, 49-59.
- Naessens J., Williams D. J. L.: Characterization and measurement of CD5⁺ B cells in normal and Trypanosoma congolense-infected cattle. *Eur. J. Immunol.* 1992, 22, 1713-1718.
- Pyee D., O'Reilly K. L., Splitter G.: Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukaemia virus. *J. Virol.* 1996, 70, 5706-5710.
- Reichert M., Winnicka A., Willems L., Kettmann R., Cantor G. H.: Role of the Proline-Rich Motif of Bovine Leukemia Virus Transmembrane Protein gp30 in Viral Load and Pathogenicity in Sheep. *J. Virol.* 2001, 75, 8082-8089.
- Reichert M.: Importance of single point mutation of the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein in the serological detection of BLV infection. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002, 46, 17-26.
- Rulka J., Lis M., Buzala E.: Ocena polskiego zestawu ELISA w serologicznej diagnostyce bydła zakażonego wirusem białaczki (BLV). *Medycyna Wet.* 2000, 56, 660-664.
- Rulka J., Kubis P., Dereń W., Buzala E.: Evaluation of the nested-PCR method for the diagnostic of the bovine leukaemia virus (BLV) infection. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2001, 45, 11-19.
- Sagata N., Tsuzuku-Kawamura J., Nagavoshi-Aida M., Shimizu F., Imagawa K., Ikawa Y.: Identification and some biochemical properties of the major XBL gene product of bovine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 7879-7883.
- Schwartz I., Bensaid A., Polack B., Perrin B., Berthelemy M., Levy D.: In vivo leukocyte tropism of bovine leukaemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* 1994, 68, 4589-4596.
- Sopp P., Kwong L. S., Howart C. J.: Identification of bovine CD14. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 52, 323-328.
- Stone D. M., Hof A. J., Davis W. C.: Up-regulation of IL-2 receptor α and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995, 48, 65-76.
- Stone D. M., McElhain T. F., Davis W. C.: Enhanced B-lymphocyte expression of IL-2Ra associated with T lymphocytosis in BLV-infected persistently lymphocytotic cows. *Leukemia* 1994, 8, 1057-1061.
- Stone D. M., Norton L. K., Davis W. C.: Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G₀/G₁ of the cell cycle and are spared from apoptosis. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 971-981.
- Stott M. L., Thurmond M. C., Dunn S. J., Stott J. L.: Integrated bovine leucosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 1991, 72, 307-315.
- Ungar-Waron H., Brenner J., Paz R., Moalem U., Trainin Z.: $\gamma\delta$ T-lymphocytes and anti-heat shock protein reactivity in bovine leukemia virus infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 51, 79-87.
- Ungar-Waron H., Paz R., Brenner J., Yakobson B., Partosh N., Trainin Z.: Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of retroviral infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 67, 195-201.
- Werling D., Howard C. J., Niederer E., Straub O. C., Saalmüller A., Langhans W.: Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 62, 185-195.
- Williams D. L., Barta O., Amborski G. F.: Molecular studies of T lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1988, 19, 307-323.
- Winnicka A.: Częstoteczki różnicowania na powierzchni limfocytów przeżuwaczy. *Postępy Biologii Komórki* 2000, 27, 229-246.
- Winnicka A.: Immunofenotypowanie limfocytów bydła, owiec i kóz metodą cytometrii przepływowej. Wyd. SGGW, Warszawa 2001.
- Wu D., Takahashi K., Murakami K., Iani K., Koguchi A., Asahina M., Goryo M., Aida Y., Okada K.: B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leucosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996, 55, 63-72.