

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В10-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Зиганшина М.М.¹, Хайдуков С.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Актуальным трендом в исследованиях В-клеточного звена иммунной системы является изучение малых субпопуляций. Установлено, что минорная субпопуляция IL-10 продуцирующих В-клеток (В10-reg клетки) обладает свойствами ограничивать избыточные реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Показан их регуляторный и патогенетический эффект при различных физиологических и патофизиологических состояниях, в частности при патологии беременности.

Вследствие низкого содержания В10-reg клеток в крови (до 1%) и сложностей визуализации данных проточной цитометрии, разработанный ранее метод, основанный на продолжительной стимуляции клеток периферической крови коктейлем факторов ((CD40L + CpG) и PMA), вызывающих активацию, пролиферацию и созревание клеток, позволяет визуализировать обогащенную фракцию В10-reg клеток (В10-клетки + про-В10-клетки), содержание которой превышает 5%. Целью данного исследования явилось получение стимулированной *ex vivo* популяции В10-клеток + про-В10-клеток из периферической крови пациенток с физиологической беременностью и разработка оптимальной стратегии гейтирования В10-reg клеток для их визуализации.

У пациенток с физиологической беременностью в III триместре осуществляли забор периферической крови. Проводилась стимуляция клеток по двум протоколам. Первый протокол: короткая (5 часов) стимуляция клеток цельной крови в стерильных условиях коктейлем PMA + иономицин + брефельдин А. Второй протокол: продолжительная (48 часов) стимуляция выделенной мононуклеарной фракции в стерильных условиях коктейлем (CD40L + CpG) с добавлением в последние 5 часов PMA + иономицин + брефельдин А. Проводилось окрашивание клеток на поверхностные маркеры (CD45, CD19, CD24, CD27, CD38) и внутриклеточное содержание IL-10. Анализ образцов выполняли на проточном цитометре Navios™.

Проведен пятицветный цитометрический анализ и разработана стратегия последовательного гейтирования, основанная на выделении гейта по лимфоцитам (маркер CD45); ограничении В-лимфоцитов (маркер CD19); выделении субпопуляции В-клеток, экспрессирующих маркер CD24; ограничении двух искомым субпопуляций В10-reg клеток по CD27 и CD38: CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺

Адрес для переписки:

Зиганшина Марина Михайловна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Акад. Опарина, 4.
Тел.: 8 (903) 105-97-46.
E-mail: mmz@mail.ru

Address for correspondence:

Ziganshina Marina M.
V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (903) 105-97-46.
E-mail: mmz@mail.ru

Образец цитирования:

М.М. Зиганшина, С.В. Хайдуков «Визуализация В10-регуляторных клеток в периферической крови при физиологической беременности» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 269-274.
doi: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

© Зиганшина М.М., Хайдуков С.В., 2021

For citation:

M.M. Ziganshina, S.V. Khaidukov "Visualization of B10 regulatory cells in peripheral blood in physiological pregnancy", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 269-274.
doi: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

DOI: 10.46235/1028-7221-1004-VOB

и CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺. Стимуляция клеток по первому протоколу позволяет визуализировать до 1% обеих субпопуляций, по второму около – 10%. Метод открывает перспективы фундаментальных исследований B10-reg клеток при беременности. Детектируемые количества обогащенной популяции B10-reg клеток могут иметь диагностическое и прогностическое значение в клинике при идиопатических акушерских осложнениях.

Ключевые слова: B10-клетки, B-регуляторные клетки, стратегия гейтирования, проточная цитометрия, беременность

VISUALIZATION OF B10 REGULATORY CELLS IN PERIPHERAL BLOOD IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY

Ziganshina M.M.^a, Khaidukov S.V.^{a, b}

^a V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

^b M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Assessment of minor subpopulations is an actual trend in the studies of B cells. Minor subpopulations of IL-10 producing B-cells (B10-regs) is able to limit excessive reactions of innate and adaptive immune response. Their regulatory and pathogenetic effect is shown in different physiological and pathophysiological conditions, e.g., in pregnancy disorders.

Due to low contents of B-10 regs in peripheral blood (up to 1%) and difficulties of flow cytometric visualization, the previously developed technique based on continuous stimulation of blood cells with a cocktail of (CD40L + CpG) and PMA, causes activation, proliferation and maturation of the cells, thus allowing visualization of enriched B10-reg fraction (B10-cells + pro-B10-cells), which exceeds 5% of total. The aim of this study was to obtain the *ex vivo* stimulated (B10 + pro-B10) cells from peripheral blood of the patients with physiological pregnancy, and development of optimal B10 cell gating strategy for better visualization.

Peripheral blood was drawn in the patients with physiological pregnancy in the III trimester. The cells were stimulated by 2 protocols, as follows: (1) short (5 hours) cell stimulation of the whole blood cells under sterile conditions with (PMA + ionomycin + brefeldin A) cocktail; (2) continuous (48 hours) stimulation of isolated mononuclear fraction under sterile conditions with (CD40L+CpG) cocktail followed by supplementation with (PMA + ionomycin + brefeldin A) cocktail. Immunostaining of the cells was performed for surface markers (CD45, CD19, CD24, CD27, CD38) and intracellular IL-10 contents. Analysis of the samples was carried out at the Navios™ flow cytometer.

Five-colour cytometric analysis was performed, and a strategy of sequential gating was developed based on discrimination of the lymphocytic (CD45⁺) gate; limitation of B lymphocytes (CD19⁺); discrimination of CD24-expressing B-cell subpopulation; delimitation of two targeted B10-reg subpopulations for CD27 and CD38, i.e., CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ и CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺. Stimulation of the cells by first protocol allows to visualize up to 1% of the both subpopulations, by the second protocol, about 10%. This technique opens prospective for fundamental studies of B10-reg cells in pregnancy. Detectable amounts of enriched B10-reg cells may be of diagnostic and prognostic significance in idiopathic obstetric complications.

Keywords: B10-cells, B regulatory cells, gating strategy, flow cytometry, pregnancy

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 116082210002.

Введение

Благодаря успешно развивающейся технологии производства моноклональных антител и возможностям проточной цитометрии в настоящее время визуализируются и определяются В-клетки различных стадий дифференцировки.

Традиционно наибольший интерес представляют субпопуляции В1, В2-клеток и В-клеток памяти. В последние годы, среди малых субпопуляций В-лимфоцитов особое внимание уделяется субпопуляции В-клеток участвующих в иммуномодуляции и супрессии иммунного ответа, которые, по аналогии с широко исследованными IL-10 продуцирующими В-клетками мыши, были названы «B10-регуляторные клетки» (B10-

reg клетки) [6]. В течение почти двух десятилетий их исследования, было описано множество фенотипов В10-reg клеток, которые различаются экспрессией различных маркеров [1, 11, 13], показана их ключевая регулирующая роль в подавлении реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа, воспаления, аутоиммунных реакций и обосновано их участие в патогенезе при различных заболеваниях [9, 10, 12]. В частности, установлено значимое повышение числа В10-reg клетки при нормальной беременности; показана важная роль в развитии толерантности к плоду; выявлено их снижение при акушерской патологии [5, 7, 8].

Установлено, что основные места локализации В10-reg клеток – селезенка и лимфоидные ткани, ассоциированные с кишечником (лимфатические узлы брыжейки и брюшной полости). В периферической крови их содержание минимально по сравнению с другими тканями и биологическими жидкостями и составляет в среднем $0,8 \pm 0,1\%$ ($1,9 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ клеток/мл) [2], что создает сложности в их визуализации и использовании в клинической диагностике.

Описанный ранее метод, основанный на последовательной стимуляции В-клеток периферической крови коктейлем (CD40L + CpG) и РМА позволяет визуализировать дополнительно субпопуляцию прогениторных В-клеток (про-В-клетки), которые активируются, пролиферируют и «дозревают» в присутствии вышеуказанных факторов и становятся функционально компетентными В10-reg клетками [3]. Метод позволяет визуализировать от 5% (В10-клеток + про-В10-клеток), что значительно превышает количество исходно присутствующих в крови В10-reg клеток (до 1%) и может использоваться в отдельных случаях для диагностических целей.

Вследствие методологических сложностей в визуализации и оценке минорной субпопуляции В10-reg клеток в периферической крови целью данного исследования явилось получение стимулированной *ex vivo* популяции В10-клеток + про-В10-клеток из периферической крови пациенток с физиологической беременностью и разработка стратегии гейтирования В10-reg клеток для их визуализации.

Материалы и методы

У пациенток с физиологической беременностью ($n = 3$) был произведен забор периферической крови по стандартной процедуре. Проводилась стимуляция клеток двумя способами в соответствии с [3]. Первый способ включал стимуляцию клеток цельной крови в стерильных условиях при 37°C в лунках 24-луночного планшета (Nunc, Дания) с использованием Cell

Stimulation Cocktail (eBioscience, США), содержащий РМА и иономицин, а также брефельдин А (Sigma, США). Во втором способе было предусмотрено выделение из крови мононуклеарной фракции в стерильных условиях с использованием Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии со стандартной методикой. Мононуклеарная фракция в среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки, 2 ммоль/л глутамина и 80 мкг/мл гентамицина, помещалась в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2×10^6 клеток/лунку, и проводилась стимуляция клеток коктейлем CD40L (R&D Systems, США) + CpG (Invivogen, США) в течение 48 часов при 37°C . За 5 часов до окончания инкубации в лунку добавляли Cell Stimulation Cocktail (eBioscience, США), содержащий РМА и иономицин, а также брефельдин А (Sigma, США) в соответствии с методикой, описанной в [3] и инструкцией используемых реагентов. По окончании времени инкубации клетки, стимулированные способом 1 и способом 2 отмывались окрашивающим буфером (BD Pharmingen, США) и добавлялись конъюгированные мышиные моноклональные антитела ((мкАТ), BD Pharmingen, США) к кластерам дифференцировки человека в сочетаниях: а) анти-CD45-ЕCD мкАТ + анти-CD19-FITC мкАТ + анти-CD24-PerCP-Cy5.5 мкАТ + анти-CD27-APC мкАТ (вариант А); б) анти-CD45-ЕCD мкАТ + анти-CD19-FITC мкАТ + анти-CD24-PerCP-Cy5.5 мкАТ + анти-CD38-APC мкАТ (вариант Б) и проводилась инкубация ($+4^\circ\text{C}$, 30 мин). По истечении времени инкубации клетки отмывались дважды и проводилась фиксация и пермеабилзация клеток с использованием Fixation and Permeabilization Solution Kit (BD Pharmingen, США) и дальнейшим окрашиванием на внутриклеточное содержание IL-10 с использованием анти-IL-10-PE мкАТ (BioLegend, США), в соответствии с инструкцией используемых реагентов. Исследование В10-reg клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США).

Результаты и обсуждение

С помощью цитометрического анализа были визуализированы две субпопуляции функционально активных В10-reg клеток, которые по данным литературы выявляются и имеют патогенетическое значение у пациентов с акушерскими и репродуктивными проблемами $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}27^+\text{IL}-10^+$ и $\text{CD}19^+\text{CD}24^{\text{hi}}\text{CD}38^{\text{hi}}\text{IL}-10^+$ [5, 7, 8]. Проводился пятицветный анализ, стратегия гейтирования представлена на рисунке 1.

Сначала выделялся лейкоцитарный гейт по экспрессии CD45, который присутствует на всех лейкоцитах, с максимальной экспрессией на лим-

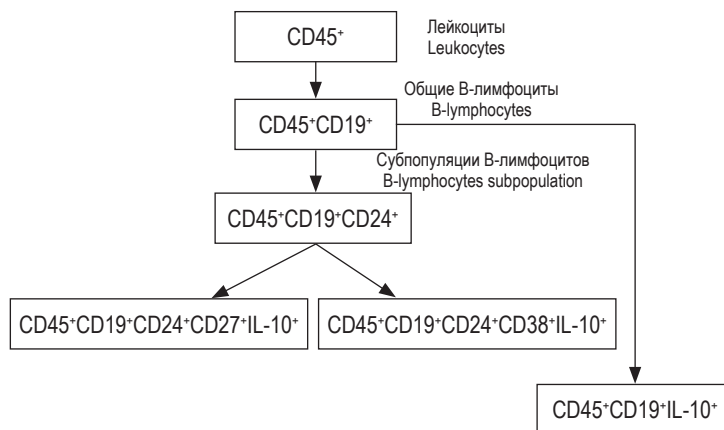


Рисунок 1. Стратегия последовательного гейтирования при многоцветном анализе с использованием CD45⁺, CD19⁺, CD24⁺, CD27⁺, CD38⁺, IL-10⁺ (5 цветов) для локализации субпопуляции В-клеток

Figure 1. Sequential gating strategy in multicolor assay using CD45⁺, CD19⁺, CD24⁺, CD27⁺, CD38⁺, IL-10⁺ (5 colors) to localize B cell subpopulation

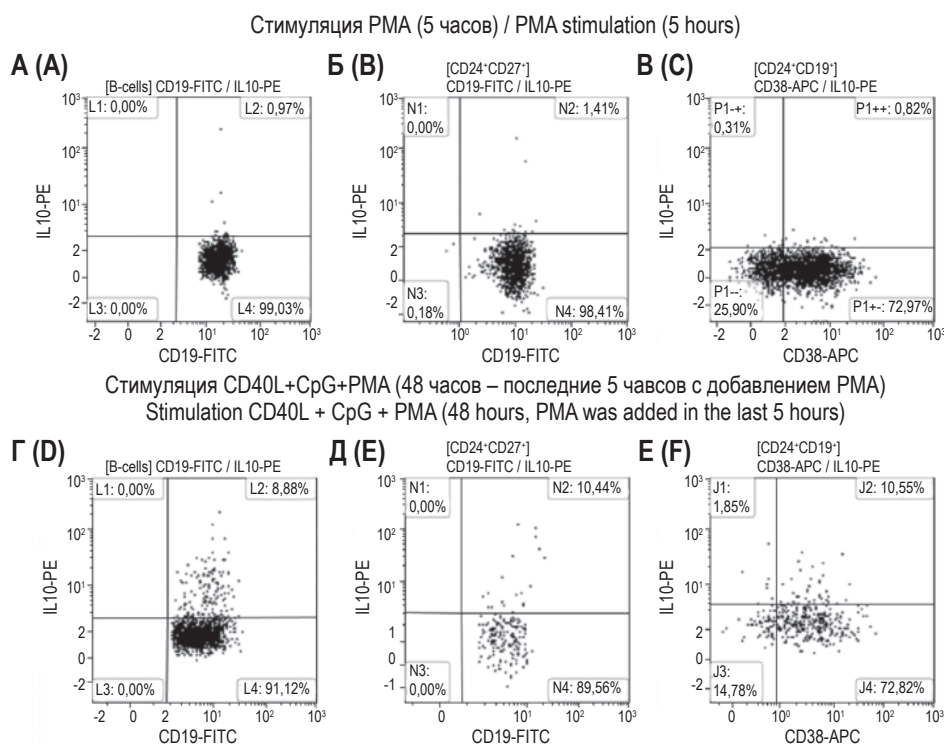


Рисунок 2. Гистограммы распределения фенотипических маркеров на В-лимфоцитах периферической крови после стимуляции цельной крови с PMA в течение 5 часов (А, Б, В) и стимуляции мононуклеарной фракции клеток с CD40L + CpG + PMA в течение 48 часов (Г, Д, Е)

Примечание. А – общее количество В-клеток, продуцирующих IL-10 в цельной крови (квадрант L2). Б – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ в цельной крови (квадрант N2). В – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ в цельной крови (квадрант P++). Г – общее количество В-клеток, продуцирующих IL-10 в мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант L2). Д – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ в мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант N2). Е – количество В10-reg клеток фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ мононуклеарной фракции клеток крови (квадрант J2).

Figure 2. Histograms of the distribution of peripheral blood B lymphocytes phenotypic markers after stimulation of whole blood with PMA for 5 hours (A, B, C) and stimulation of the mononuclear fraction of cells with CD40L + CpG + PMA for 48 hours (D, E, F)

Note. A, the total number of IL-10 producing B cells in whole blood (L2 quadrant). B, number of whole blood B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ phenotype (quadrant N2). C, number of whole blood B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ phenotype (P++ quadrant). D, total number of B cells producing IL-10 in the mononuclear cell fraction (L2 quadrant). E, number of mononuclear cell fraction B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺ phenotype (quadrant N2). F, number of mononuclear cell fraction B10-reg cells with CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ phenotype (quadrant J2).

фоцитах. Далее визуализировались В-лимфоциты, что обеспечивалось выделением клеток, экспрессирующих маркер линейной принадлежности В-клеток CD19. Затем ограничивали В-клетки, экспрессирующие дифференцировочный антиген CD24, который преимущественно экспрессируется дифференцирующимися клетками-предшественниками, метаболически активными клетками и значим для адаптивного иммунного ответа. Далее в популяции В-клеток, экспрессирующих маркер CD24, были визуализированы клетки, в первом случае экспрессирующие поверхностный маркер CD27 и внутриклеточный IL-10 (первая субпопуляция В10-reg клеток) и, во втором случае, экспрессирующие поверхностный CD38 и внутриклеточный IL-10 (вторая субпопуляция В10-reg клеток). Также дополнительно можно рассматривать общую фракцию В-лимфоцитов, продуцирующих цитокин IL-10.

Как свидетельствуют гистограммы, представленные на рисунке 2, описанная стратегия гейтирования позволяет визуализировать до 1% В-клеток, продуцирующих IL-10 после стимуляции с РМА (рис. 2А). Второй вариант стимуляции позволяет выявить общую популяцию IL-10 продуцирующих В-клеток, включающую про-В10 клетки, которая в сумме достигает 9% (рис. 2Г).

Вышеописанной стратегией гейтирования визуализируются истинные В10-reg клетки фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺IL-10⁺, которые являются эквивалентом широко изученных В10-клеток мыши (рисунок 2 Б соответствует клеткам цельной крови, стимулированной РМА, что позволяет визуализировать 1,4% В10-reg клеток и рисунок 2Д, демонстрирующий 10,4% искомой субпопуляции после длительной стимуляции коктейлем активирующих факторов). Также в субпопуляции транзитных клеток и плазмбластов визуализируются В10-reg клетки фенотипа CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL-10⁺ продуцирующие IL-10. Их количество составляет около 1% (рис. 2В) и 10,5% (рис. 2Е) при первом и втором типе стимуляции соответственно.

Полученные результаты подтверждают как данные Ивата Ю. и соавт., согласно которым у некоторых пациентов, в частности страдающих аутоиммунными заболеваниями, количество общей фракции В10-клеток + про-В10-клеток после аналогичной стимуляции увеличивается до 20% [3], так и данные немногочисленных исследований, свидетельствующих о значительной представленности субпопуляции В10-reg клеток при нормальной беременности [5, 7, 8].

На сегодняшний день основные данные о функции В10-reg клеток при беременности получены на мышиных моделях, согласно которым, при нормальной беременности происходит селективная экспансия IL-10 продуцирующих В-reg клеток, осуществляющих регуляцию иммунного ответа на фетальные антигены и супрессию провоспалительного ответа [4]. Известно, что у мышей с угрожающим выкидышем, наблюдается снижение В10-reg клеток, что предотвращается их селективным трансфером [4]. Подробное изучение функций В10-reg клеток при беременности у человека может открыть новые перспективы для диагностики, прогноза и персонализированной терапии идиопатических случаев акушерской патологии.

Выводы

Стимуляция *ex vivo* клеток мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с физиологической беременностью позволяет визуализировать около 10% популяции В10-клеток+про-В10-клеток с использованием последовательного гейтирования при пятицветном цитометрическом анализе. Метод требует значительных временных и экономических затрат, но открывает перспективы фундаментальных исследований В10-reg клеток при беременности и детектируемые количества В10-reg клеток могут иметь диагностическое и прогностическое значение в клинике при идиопатических акушерских осложнениях.

Список литературы / References

1. Alhabbab R.Y., Nova-Lamperti E., Aravena O., Burton H.M., Lechler R.I., Dorling A., Lombardi G. Regulatory B cells: Development, phenotypes, functions, and role in transplantation. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 292, no. 1, pp. 164-179.
2. Candando K.M., Lykken J.M., Tedder T.F. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 259-272.
3. Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., Hall R.P., St Clair E.W., Tedder T.F. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 530-541.
4. Jensen F., Muzzio D., Soldati R., Fest S., Zenclussen A.C. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 89, no. 4, 90. doi: 10.1095/biolreprod.113.110791.
5. Lima J., Martins C., Leandro M.J., Nunes G., Sousa M.J., Branco J.C., Borrego L.M. Characterization of B cells in healthy pregnant women from late pregnancy to post-partum: a prospective observational study. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2016, Vol. 16, no. 1, 139. doi: 10.1186/s12884-016-0927-7.

6. Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R.S., Bhan A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 2, pp. 219-230.
7. Muzzio D., Zenclussen A.C., Jensen F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *Am. J. Reprod Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 408-412.
8. Rolle L., Memarzadeh Tehran M., Morell-García A., Raeva Y., Schumacher A., Hartig R., Costa S.D., Jensen F., Zenclussen A.C. Cutting edge: IL-10-producing regulatory B cells in early human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 70, no. 6, pp. 448-453.
9. Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 4, pp. 1395-1401.
10. Wang L., Fu Y., Chu Y. Regulatory B Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2020, Vol. 1254, pp. 87-103.
11. Wortel C.M., Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl. Immunol.*, 2017, Vol. 41, pp. 1-9.
12. Wu H., Su Z., Barnie P.A. The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 78, 106111. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106111.
13. Zhao H., Feng R., Peng A., Li G., Zhou L. The expanding family of noncanonical regulatory cell subsets. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 2, pp. 369-383.

Авторы:

Зиганшина М.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., советник директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Ziganshina M.M., PhD (Biology), Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Director's Advisor, V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology; Senior Research Associate, Laboratory of Carbohydrates, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 17.05.2021
Accepted 17.06.2021