

## ИЗМЕНЕНИЯ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ «ПОЛЯРИЗОВАННЫХ» Т-ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

© 2019 г. И. В. Кудрявцев<sup>1,2\*</sup>, А. Г. Ильвес<sup>3</sup>, А. В. Ильченко<sup>1</sup>,  
И. И. Кробинец<sup>4</sup>, О. М. Новоселова<sup>3</sup>, К. С. Рубаник<sup>3</sup>,  
М. К. Серебрякова<sup>1</sup>, Л. Н. Прахова<sup>3</sup>

\*E-mail: igorek1981@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова»,  
Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА  
России», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

Рассеянный склероз (РС) относится к иммунологически опосредованным заболеваниям нервной системы, характеризующимся формированием очагов демиелинизации, в составе которых накапливаются лимфоциты. Целью исследования был анализ субпопуляционного состава «поляризованных» Т-хелперов (Th) периферической крови у пациентов с РС (n=38) с низкой длительностью заболевания – 1 год (8 мес; 1,5 года) и низким уровнем инвалидизации (EDSS – 1,0 (1,0; 1,5) баллов). В группу сравнения были включены 48 условно здоровых доноров, которые достоверно не отличались от больных РС по своему половому и возрастному составу. Было показано, что в рамках CD45RA<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> при РС достоверно снижается доля Th1 лимфоцитов, тогда как уровни циркулирующих Th17 и фолликулярных Th достоверно превосходят значения контроля. Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> Th у больных РС выявил достоверное снижение доли Th1 клеток и увеличение содержания Tfh клеток. Также нами были выявлены существенные изменения субпопуляционного состава «поляризованных» CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Th клеток при РС, связанные со снижением уровня Th1 и увеличением долей Th17 и фолликулярных Th. По-видимому, Th17 в составе нервной ткани отвечают за инфильтрацию нейтрофилами последней, тогда как Tfh могут принимать активное участие в формировании ответа, опосредованного В-лимфоцитами, в непосредственной близости от очага поражения, что может сопровождаться синтезом аутоантител и усилением активности нейтрофилов.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, проточная цитометрия, хемокиновые рецепторы, фолликулярные Т-хелперы, Т-хелперы 17

DOI: 10.31857/S102872210007251-1

**Адрес:** 197376, Санкт-Петербург, ул.акад. Павлова, 12, отдел иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Кудрявцеву И. В. Тел.: +7 812 234-16-69.

**E-mail:** igorek1981@yandex.ru

**Авторы:**

**Кудрявцев И. В.**, к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; с.н.с. отдела онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова», Санкт-Петербург, Россия;

**Ильвес А. Г.**, к.м.н., с.н.с. лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Ильченко А. В.**, лаборант-исследователь, отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

**Кробинец И. И.**, к.б.н., с.н.с., лаборатория изосерологии, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия;

**Новоселова О. М.**, м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Рубаник К. С.**, м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

**Серебрякова М. К.**, н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, России;

**Прахова Л. Н.**, д.м.н., заведующая лабораторией нейрореабилитации ФГБНУ Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) относится к иммунологически опосредованным заболеваниям нервной системы с гетерогенным патогенезом, включающим развивающиеся в определенной степени независимо друг от друга аутоиммунные воспалительные реакции и нейродегенеративные процессы [1]. Одним из признаков РС является разрушение миелина в белом веществе отдельных участков головного и спинного мозга. В очагах демиелинизации обычно обнаруживается высокое содержанием лимфоидных клеток, проникших через гемато-энцефалический барьер [2]. Следует отметить, что к направленной миграции в воспаленные ткани способны антиген-специфические Т-клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, прошедшие антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах и утратившие молекулы «хоуминга» в лимфоидную ткань, но обладающие выраженными эффекторными свойствами [3]. Однако столь же важны Т-хелперы центральной памяти (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), так как именно они формируют пул клеток, способных формировать и поддерживать на определенном уровне клон эффекторных клеток при повторном контакте с антигеном [4].

Среди различных субпопуляций Т-хелперов ведущую роль в патогенезе РС отводилась Т-хелперам 1 типа (Th1), способным с продукции IFN $\gamma$  [5], однако в последние годы появляется все больше работ, посвященных исследованию другой субпопуляции Т-клеток – Т-хелперов 17 (Th17), рассматриваемых в качестве одних из самых перспективных мишеней для терапии РС [6]. С другой стороны, в составе плазмы крови и (СМЖ) больных РС отмечается резкое увеличение уровня IL-21, а также содержания циркулирующих фолликулярных Т-хелперов (Tfh) периферической крови [7], роль которых при данной патологии остается мало изученной. При изучении очагов повреждения нервной ткани при помощи гибридизации *in situ* и методов иммуногистохимии были обнаружены скопления CD3-позитивных лимфоцитов, способных к экспрессии гена IL-17 и синтезу данного цитокина [8]. Несколько позднее также было обнаружено, что белое вещество в очагах поражения содержит еще и CD4-позитивные лимфоциты, секретирующие IL-21 – ключевой цитокин фолликулярных Т-хелперов [9]. Поэтому **целью** данного исследования стал анализ относительного содержания различных субпо-

пуляций Т-хелперов у больных на самых ранних стадиях развития РС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

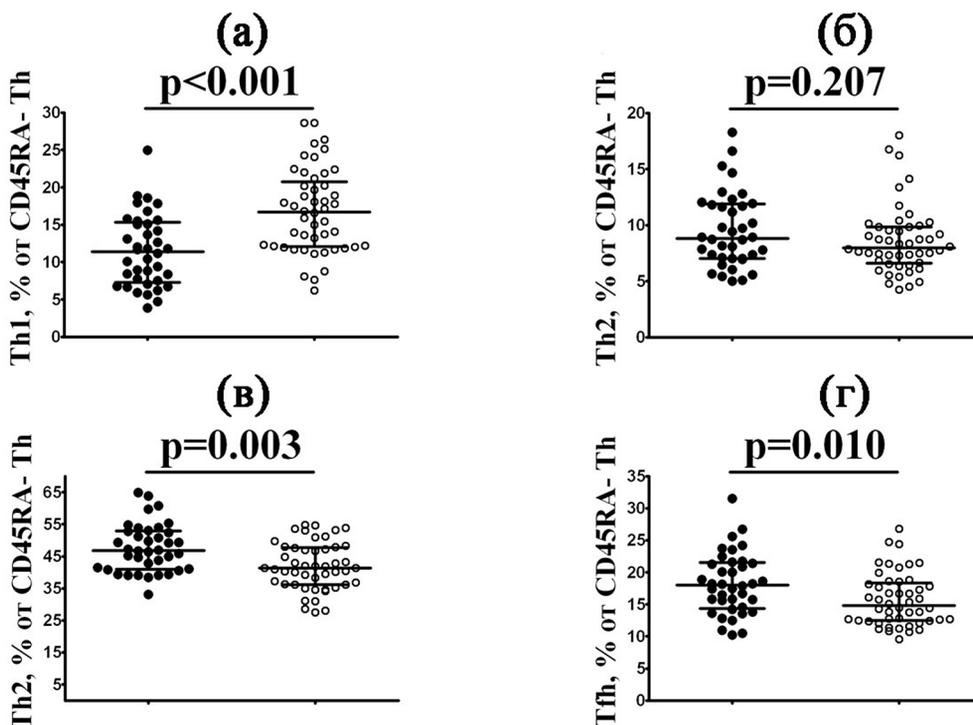
В исследование были включены 38 больных (16 мужчин и 22 женщины) с рецидивирующей формой РС. Диагноз РС устанавливался согласно критериям МакДональда [10]. В исследование вошли пациенты, никогда не получавшие препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС) и системных кортикостероидов в течение последних 90 дней. Всем пациентам проводился стандартный неврологический осмотр с последующей балльной оценкой степени поражения функциональных систем: зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга. Также подсчитывался балл по интегративной шкале EDSS – расширенная шкала инвалидизации [11]. Длительность заболевания РС составляла 1 год (8 мес; 1,5 года), тогда как уровень инвалидизации, выраженная в баллах шкалы EDSS, составляла 1,0 (1,0; 1,5). В группу сравнения были включены 48 условно здоровых доноров, которые достоверно не отличались от больных РС по своему половому и возрастному составу. Исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева» РАН 23 октября 2014 года.

Объектом исследования служила венозная кровь больных РС и условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K<sub>3</sub>ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Хайдуковым С. В. и соавторами [12]. Для выявления основных популяций Т-хелперов периферической крови с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> применялся следующий набор моноклональных антител (все антитела производства Beckman Coulter Inc., USA): CD3-FHC-AF750 (клон UCNT1) и CD4-PacBlue (клон 13B8.2), CD45RA-FITC

(клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L-PE (клон DREG56). В дальнейшем в рамках общего пула Т-хелперов памяти (CD45RA<sup>-</sup>), а также Th клеток центральной (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>) и эффекторной (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) памяти оценивали ко-экспрессию хемокиновых рецепторов при помощи следующего набора антител (все антитела производства Biolegend Inc., USA) – CCR4-BV510 (CD194, клон L291H4), CCR6-PC7 (CD196, клон G034E3), CXCR3-APC (CD183, клон G025H7) и CXCR5-PerCP/Cy5.5 (CD185, клон J252D4). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 минут, после чего надосадок удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов прово-

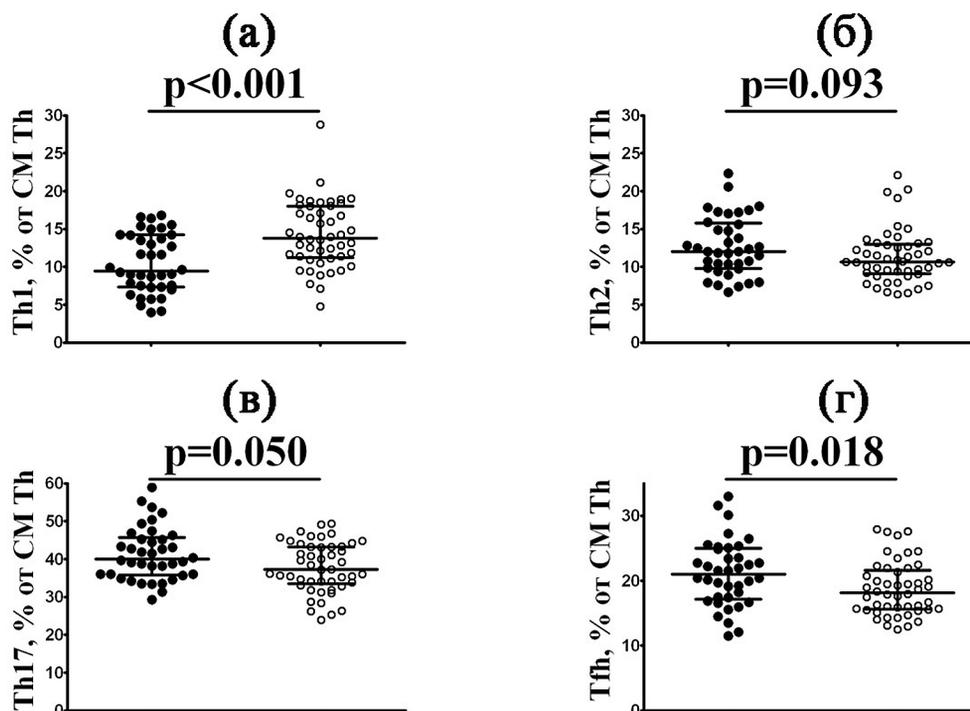
дили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.5a (Beckman Coulter, США). Анализ коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 проводили с применением тактики «гейтирования», основанной на иерархических дендрограммах для общего пула CD45RA-негативных Th памяти, а также CM и EM Th, описанной ранее [13]. Th1 клеток определяли как CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>-</sup>, Th2 лимфоциты обладали фенотипом CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>, тогда как фенотип Th17 и Tfh описывали как CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> и CXCR5<sup>+</sup>, соответственно.

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, USA) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., USA). Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>).



**Рисунок 1.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Tfh) среди CD45RA-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови больных РС.

**Примечание:** Здесь и далее на рисунках 2 и 3: черным обозначены результаты, полученные для больных РС (n=38), белым – результаты группы контроля (n=48). Результаты приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q<sub>25</sub> и Q<sub>75</sub>). Достоверные различия указаны согласно непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.



**Рисунок 2.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Тfh) среди Т-хелперов центральной памяти (CD45RA-CD62L<sup>+</sup>) лимфоцитов периферической крови больных РС.

Сравнение уровней основных субпопуляций Th у больных РС и группы контроля проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни.

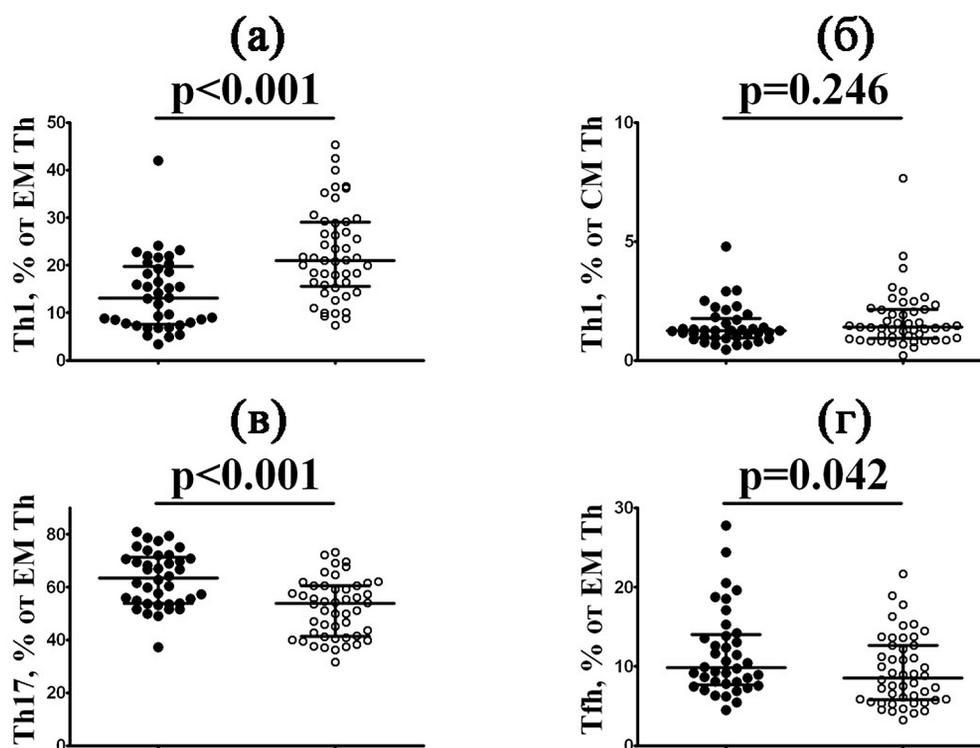
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ относительного и абсолютного содержания общего числа Т-лимфоцитов периферической крови с фенотипом CD3<sup>+</sup> не выявил достоверных различий между больными РС и группой сравнения (76,83% (71,93; 80,26) против 78,29% (72,92; 83,46) при  $p=0,372$ , а также 1472 кл/1 мкл (1092; 1770) против 1324 кл/1 мкл (1136; 1615) при  $p=0,492$ , соответственно). Нами также не было обнаружено различий между сравниваемыми группами по относительному и абсолютному содержанию Th клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (48,73% (41,73; 52,20) против 49,14% (42,69; 53,05) при  $p=0,629$  и 909 кл/1 мкл (702; 1112) против 808 кл/1 мкл (685; 1041) при  $p=0,548$ , соответственно).

Было показано, что относительное содержание CD45RA-CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток у больных РС в рамках общего пула лимфоцитов периферической крови снижается относительно группы контроля (28,72% (26,44; 33,09) и 32,59% (28,84; 37,18) при  $p=0,027$ ), тогда как по абсолютному

содержанию клеток данного фенотипа различий отмечено не было (561 кл/1 мкл (403; 684) и 557 кл/1 мкл (462; 730),  $p=0,465$ ). Результаты анализа распределения общего пула Th памяти по основным субпопуляциям «поляризованных» Th клеток приведены на **Рис. 1**. Показано, что при РС достоверно снижается доля Th1 лимфоцитов (с 16,69% (12,09; 20,72) до 11,41% (7,50; 15,12) при  $p<0,001$ ), тогда как уровни циркулирующих Th17 и фолликулярных Th достоверно превосходят значения, полученные для группы контроля (46,81% (41,09; 52,74) против 41,35% (36,21; 47,69) при  $p=0,003$  и 18,01% (14,54; 21,41) против 14,79% (12,46; 18,34) при  $p=0,010$ , соответственно).

В ходе дальнейших исследований общий пул циркулирующих в периферической крови Th памяти был разделен на две субпопуляции – Т-хелперы центральной памяти (СМ) с фенотипом CD45RA-CD62L<sup>+</sup>, «патрулирующие» периферические лимфоидные органы в поисках повторного контакта со специфическим антигеном, и Т-хелперы эффекторной памяти (ЕМ) с фенотипом CD45RA-CD62L<sup>-</sup>, которые способны покидать кровотоки и направленно мигрировать в очаг воспаления для выполнения там



**Рисунок 3.** Относительное содержание Th1, Th2, Th17 и фолликулярных Т-хелперов (Tfh) среди Т-хелперов эффекторной памяти ( $CD45RA^-CD62L^-$ ) лимфоцитов периферической крови больных РС.

эффекторных функций. Так, не было отмечено достоверных различий ( $p=0,244$  и  $p=0,370$ , соответственно) по относительному и абсолютному содержанию СМ клеток –  $CD45RA^-CD62L^+$  Th у больных РС составляли 21,19% (18,72; 24,78) от общего пула Th при концентрации в 401 кл/1 мкл (284; 511), тогда как в группе контроля эти значения составили 19,84% (17,12; 23,25) и 338 кл/1 мкл (279; 497), соответственно. Анализ ко-экспрессии хемокиновых рецепторов СМ Th у больных РС выявил достоверное снижение доли Th1 клеток (с 13,80% (11,24; 18,03) до 9,46% (7,35; 14,19) при  $p<0,001$ ) и увеличение содержания Tfh клеток (с 18,16% (15,60; 21,63) до 20,98% (17,39; 24,89) при  $p=0,018$ ), тогда как по содержанию Th2 и Th17 сравниваемые группы достоверно не различались (Рис. 2).

При сравнении относительного и абсолютного содержания EM Th с фенотипом  $CD45RA^-CD62L^-$  больных РС с группой контроля было отмечено достоверное снижение клеток данного типа (8,08% (6,69; 10,63) против 11,83% (9,95; 14,34) при  $p<0,001$ , а также 140 кл/1 мкл (108; 256) против 210 кл/1 мкл (177; 256) при  $p=0,002$ ). Также нами были выявлены существенные из-

менения субпопуляционного состава «поляризованных» Th клеток при РС, связанные со снижением уровня Th1 (с 21,01% (15,54; 29,01) до 13,08% (7,76; 19,27) при  $p<0,001$ ) и увеличением долей Th17 (с 53,77% (41,39; 60,54) до 63,43% (53,77; 70,78) при  $p<0,001$ ) и фолликулярных Th (с 8,56% (5,81; 12,65) до 9,84% (7,78; 13,86) при  $p=0,042$ ), тогда как уровень Th2 достоверно не различался между группами (Рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты указывают на тот факт, что уже на самых ранних этапах развития РС в периферической крови больных наблюдается увеличение крови Th17 и Tfh клеток, тогда как относительное содержание Th1 лимфоцитов достоверно снижается.

В рамках проведенного исследования нами отмечалось увеличение уровней  $CXCR5^+$  Tfh клеток как в пределах общего пула клеток памяти, так и среди СМ и EM Т-хелперов периферической крови. Следует отметить, что результаты по динамике данной популяции Th весьма противоречивы. Так, у больных с рецидивирующим РС в стадии клинической ремиссии наблюда-

лось увеличение уровня ICOS<sup>+</sup> Tfh клеток периферической крови и прирост экспрессии мРНК IL-21R и ICOS [14]. Более того, при прогрессировании РС экспрессия ICOS повышалась и в клеточной фракции СМЖ, что косвенно указывает на активацию Tfh не только на периферии, но и в пределах ЦНС. Эти данные согласуются с результатами гистологических исследований, показавших присутствие IL-21R<sup>+</sup> и IL-21<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток как в активных, так и в хронических очагах поражения нервной ткани [9]. В рамках другого исследования в периферической крови пациентов с рецидивирующим РС по сравнению с группой контроля было обнаружено увеличенное содержание CCR7<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> Tfh клеток памяти, которое коррелировало с показателями шкалы EDSS, уровнями IL-21 в плазме крови, а также титрами антител против MBP и MOG [7]. Эти результаты косвенно подтверждают собственные данные о приросте доли Tfh среди EM Th, которые способны покидать кровотоки и мигрировать в периферические ткани, включая очаги воспаления в пределах нервной системы, где эти клетки могут принимать участие в формировании третичной лимфоидной ткани и регулировать функции В-лимфоцитов и плазматических клеток. Однако, некоторыми исследователями у больных РС без проведения терапии достоверных различий с контрольной группой отмечено не было как по относительному содержанию CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh, так и CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> Tfh клеток памяти [15].

Вместе с тем, нами также отмечалось увеличение уровня Th17, которое, в первую очередь, было связано с приростом процентного содержания этих клеток в пределах пула EM Th, обладающих выраженными эффекторными свойствами. Как уже отмечалось ранее, активация аутореактивных клонов Th17 рассматриваются в качестве одной из основных причин поражения нервной ткани при РС. Вместе с тем, формирования пула этих клеток тесно связано с процессами, протекающими в периферических лимфоидных тканях, в которых происходит формирования оптимального для дифференцировки Th17 цитокинового микроокружения. Так, было показано, что уровень экспрессии генов таких провоспалительных цитокинов как IL-1 $\beta$  и IL-6 (рассматриваемых в качестве одного из факторов для дифференцировки Th0 в сторону Th17), равно как и их содержание в сыворотке крови и СМЖ больных РС тесно связаны с тяжестью заболевания и его прогрессией [16].

Во-вторых, столь же существенную роль в формировании пула эффекторных Th17, как уже отмечалось ранее, играет IL-23, сывороточные концентрации данного цитокина у больных рассеянным склерозом существенно превосходят таковые условно здоровых доноров [17]. В третьих, эффекторными цитокинами лимфоцитов данной популяции являются IL-17A, IL-17F и IL-22, роль которых в патогенезе РС (в силу их высокой концентрации у больных) в настоящее время активно обсуждается в литературе [18]. Именно под действием IL-17 и IL-22, рецепторы для которых представлены на эндотелиальных клетках, входящих в состав гемато-энцефалического барьера, нарушается структура плотных контактов как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* [19]. Более того, результаты анализа образцов биопсии тканей головного мозга больных РС показали, что ген, кодирующий IL-17A, экспрессируется в них на очень высоком уровне [6], причем в очагах повреждения нервной ткани за это отвечали именно CD3<sup>+</sup> клетки с морфологией лимфоцитов [8]. По-видимому, Th17 в составе нервной ткани отвечают за инфильтрацию нейтрофилами последней, тогда как Tfh могут принимать активное участие в формировании ответа, опосредованного В-лимфоцитами, в непосредственной близости от очага поражения, что может сопровождаться синтезом аутоантител и усилением активности нейтрофилов. Таким образом, анализ Th даст возможность с новых позиций подойти к причинам развития РС, а детальное исследование их отдельных субпопуляций в перспективе позволит обнаружить новые клеточные маркеры для анализа прогрессирования заболевания, предсказания тяжести его развития и течения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kamm C. P., Uitdehaag B. M., Polman C. H. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol* 2014, 72, 132–141.
2. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005, 23, 683–747.
3. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014, 8, 4 (17), 947–964. [Kudryavtsev I. V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian Journal of Immunology*. 2014, 8, 4 (17), 947–964.]
4. Сохоневич Н. А., Хазиахматова О. Г., Юрова К. А., Шуплетова В. В., Литвинова Л. С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. *Цитология* 2015, 57 (5), 311–318. [Sokhonevich N. A., Khaziakhmatova O. G., Yurova K. A., Shupletova V. V., Litvinova L. S.]

- va O. G., Yurova K. A., Shupletsova V. V., Litvinova L. S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologia* 2015, 57 (5), 311–318].
5. Fletcher J. M., Lalor S. J., Sweeney C. M., Tubridy N., Mills K. H. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010, 162, 1–11.
  6. Volpe E., Battistini L., Borsellino G. Advances in T helper 17 cell biology: pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2015, 2015, 475158.
  7. Fan X., Jin T., Zhao S., Liu C., Han J., Jiang X., Jiang Y. Circulating CCR7+ICOS+ memory T follicular helper cells in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2015, 10 (7), e0134523.
  8. Tzartos J. S., Friese M. A., Craner M. J., Palace J., Newcombe J., Esiri M. M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008, 172 (1), 146–155.
  9. Tzartos J. S., Craner M. J., Friese M. A., Jakobsen K. B., Newcombe J., Esiri M. M., Fugger L. IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol* 2011, 178 (2), 794–802.
  10. Polman C. H., Reingold S. C., Banwell B., Clanet M., Cohen J. A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F. D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A. J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J. S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011, 69 (2), 292–302.
  11. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983, 33 (11), 1444–1452, Kappos L. Slightly modified, version 09/08.
  12. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тотолян А. А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология* 2012, 14 (3), 255–268. [Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolyan A. *Medical Immunology (Russia)* 2012, 14 (3), 255–268].
  13. Кудрявцев И. В., Борисов А. Г., Кробинец И. И., Савченко А. А., Серебрякова М. К., Тотолян А. А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции. *Медицинская иммунология* 2016, 18 (3), 239–250. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Krobinec I. I., Savchenko A. A., Serebriakova M. K., Totolian A. A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Medical Immunology (Russia)* 2016, 18 (3), 239–250.].
  14. Romme Christensen J., Börnsen L., Ratzer R., Piehl F., Khademi M., Olsson T., Sørensen P. S., Sellebjerg F. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PLoS One* 2013, 8 (3), e57820.
  15. Cunill V., Massot M., Clemente A., Calles C., Andreu V., Núñez V., López-Gómez A., Díaz R. M., Jiménez M. L. R., Pons J., Vives-Bauzá C., Ferrer J. M. Relapsing-remitting multiple sclerosis is characterized by a T follicular cell pro-inflammatory shift, reverted by dimethyl fumarate treatment. *Front Immunol* 2018, 9, 1097.
  16. Rovaris M., Barnes D., Woodrofe N., du Boulay G. H., Thorpe J. W., Thompson A. J., McDonald W. I., Miller D. H. Patterns of disease activity in multiple sclerosis patients: a study with quantitative gadolinium-enhanced brain MRI and cytokine measurement in different clinical subgroups. *J Neurol* 1996, 243, 536–542.
  17. Shajarian M., Alsahebhosoul F., Etemadifar M., Sedaghat N., Shahbazi M., Firouzabadi F. P., Dezhshibi H. M. IL-23 plasma level measurement in relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients compared to healthy subjects. *Immunol Invest* 2015, 44, 36–44.
  18. Babaloo Z., Aliparasti M. R., Babaiea F., Almasi S., Baradaran B., Farhoudi M. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett* 2015, 164, 76–80.
  19. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007, 13 (10), 1173–1175.

## IMBALANCE IN PERIPHERAL BLOOD “POLARIZED” T-HELPER SUBSETS DURING MULTIPLE SCLEROSIS

© 2019 I. V. Kudryavtsev<sup>1,2\*</sup>, A. G. Ilves<sup>3</sup>, A. V. Il'chenko<sup>1</sup>,  
I. I. Krobinets<sup>4</sup>, O. M. Novoselova<sup>3</sup>, K. S. Rubanik<sup>3</sup>,  
M. K. Serebryakova<sup>1</sup>, L. N. Prakhova<sup>3</sup>

\*E-mail: igorek1981@yandex.ru

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine (FSBSI “IEM”), St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences (IHB RAS), St. Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 27.06.2019

Multiple sclerosis (MS) is the inflammatory disease of the central nervous system characterized by multifocal areas of demyelination and immune cell infiltration. In the current study, we analysed the frequencies and the phenotypes of “polarized” Th cell subsets in peripheral blood of multiple sclerosis patients (n=38, with low disease duration – 1 year (8 month; 1,5 years) and low EDSS – 1,0 (1,0; 1,5)) and healthy control group (n=48). We show that within CD45RA<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subset the frequencies of Th17 and follicular Th (Tfh) cells were significantly higher in patients while the levels of Th1 cells were significantly lower in comparison to control group. Similarly, in central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> Th the relative number of Th1 cells was reduced while frequencies of Tfh subset were increased in MS patients if compared to control. Finally, MS patients showed increased frequency of Th17 and Tfh cells in CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Th subset compared to control while Th1 were lower in patients group. It seems that Th17 cells infiltrating the nervous tissue could be responsible for neutrophil infiltration, while Tfh cells could take part in B-cell-mediated immune response nearby to site of inflammation and may be accompanied by production of self-reactive antibodies as well as augmented neutrophilic activity.

*Key words:* multiple sclerosis, flow cytometry, chemokine receptors, follicular Th cells, Th17

**Authors:**

**Kudryavtsev I. V.**, PhD, senior researcher, department of immunology, “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia; senior researcher, department of oncoimmunology, N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russia;

197376, St. Petersburg, Russia, acad. Pavlov str., 12, dept. of immunology, “Institute of Experimental Medicine”.

Phone.: +7 812 234-1669, **E-mail:** igorek1981@yandex.ru;

**Ilves A. G.**, PhD, senior researcher, laboratory of neuroimmunology, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russia;

**Il'chenko A. V.**, research assistant, department of immunology, “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia;

**Krobinets I. I.**, PhD, Senior Research Associate, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia;

**Novoselova O. M.**, junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

**Rubanik K. S.**, junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

**Serebriakova M. K.**, researcher, department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia;

**Prakhova L. N.**, MD, Head of the laboratory of neurorehabilitation, N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia.