

- parative antibacterial characteristics of the drug «cellgel» in experiment Sukhovey J.G., Kostolomova E. G., Tsyryateva S. B., Argunova G. A., Unger I. G., Goltsov S. V.//Russian Journal of immunology, 2015, 9(18), № 2(1). с 44-46.]
5. Костоломова Е. Г., Суховой Ю. Г., Гольцов С. В., Унгер И. Г., Акунеева Т. В. Некоторые иммунофизиологические механизмы регенерации ран

в условиях применения ранозаживляющего средства «Cellgel» //Российский Иммунологический Журнал, 2016, том 10 (19), № 3. с2 89-291. [Certain immunophysiological mechanisms of wound repair in condition of wound healing madical means «Cellgel» application Kostolomova E. G., Sukhovey J. G., Goltsov S. V., Unger I. G., Akuneeva T. V.//Russian Journal of immunology, 2016, 10(19),№ 3.с 289-291]

## THE INTERACTION OF IMMUNE CELLS OF THE SKIN IN THE PROCESS OF REPARATIVE REGENERATION IN THE WOUND

Kostolomova E. G.<sup>1</sup>, Sukhovey Y.G.<sup>1</sup>, Unger I. G.<sup>1</sup>, Akuneeva T.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology; <sup>2</sup>FSBEEHE Tyumen State University, Tyumen, Russia

An experiment is conducted on 20 adult rabbits in order to clarify the role of immune cells in the reparative regeneration of skin in conditions of purulent-infected wounds. Understanding the role of immune cells in the regeneration processes in the wound and the formation of scar tissue may contribute to search for new approaches to therapy-related effects on the immune mechanisms for the prevention of scarring.

*Key words:* regeneration in the wound repair mechanisms, immune cells, skin, immunohistochemistry

## ИЗМЕНЕНИЯ В СУБПОПУЛЯЦИОННОМ СОСТАВЕ В-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Кудрявцев И. В.<sup>1,2</sup>, Ильвес А. Г.<sup>3</sup>, Кробинец И. И.<sup>4</sup>, Минеев К. К.<sup>3</sup>,  
Серебрякова М. К.<sup>1</sup>, Петров А. М.<sup>3</sup>, Столяров И. Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; <sup>2</sup>ФГБУ «НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России; <sup>3</sup>ФГБУН Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН; <sup>4</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Механизмы демиелинизации нервных волокон при рассеянном склерозе (РС) могут быть связаны с продуцирующими аутореактивные антитела В-клетками, созревающими в специализированных лимфоидных фолликулах, локализованных в пределах центральной нервной системе. С применением многоцветной проточной цитометрии было показано, что относительное содержание В-клеток с фенотипом CD19<sup>+</sup> в периферической крови больных РС (n=25) было достоверно выше (p=0,005) при сравнении с результатами, полученными для условно здоровых добровольцев (n=27, 17,88% (12,88; 25,15) и 11,77% (9,52; 15,26), соответственно). Для выявления отдельных субпопуляций В-лимфоцитов исследовали коэкспрессию IgD и CD38, IgD и CD27, а также CD5 и CD27. Показано, что при РС наблюдается достоверное снижение относительного содержания как «наивных» IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>low</sup>, так и клеток памяти за счет увеличение доли активированных IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>dim</sup> лимфоцитов. У больных РС достоверно (p<0,001) повышено относительное содержание В-клеток с фенотипом IgD<sup>dim</sup>CD27<sup>low</sup>, тогда как процент остальных субпопуляций более зрелых фенотипов значимо снижен. Детальное исследование роли как В-клеток, так и фолликулярных Т-хелперов, оказывающих непосредственное влияние на процессы созревания и дифференцировки В-лимфоцитов, может оказать существенное влияние на современное понимание причин возникновения и патогенез рассеянного склероза, а также разработать новые подходы к терапии данного заболевания.

*Ключевые слова:* рассеянный склероз, проточная цитометрия, В-лимфоциты, IgD и CD38

**Введение.** В-лимфоциты периферической крови являются гетерогенной по своему составу популяцией клеток, способных выполнять как эффекторные (за счет дифференцировки в плазматические клетки и синтеза антител), так и регуляторные (презентация антигенов и синтез широкого спектра цитокинов) функции в рамках реализации реакций специфического иммунного ответа. Данная группа клеток играет ведущую роль в развитии различных аутоиммунных процессов, к числу которых можно отнести и рассеянный склероз (РС). Механизмы демиелинизации нервных волокон при РС могут быть тесно связаны с продуцирующими аутореактивные антитела В-клетками, созревающими и проходящими стадию антиген-зависимой дифференцировки в специализированных лимфоидных фолликулах, локализованных в менингеальных и вирховских пространствах центральной нервной системы [1]. Следует также отметить, что применение антител, направленных на удаление из организма больных В-лимфоцитов, также обладает выраженным терапевтическим эффектом, как это было показано, например, при использовании анти-CD20 антител [2]. Все это позволяет рассматривать В-лимфоциты в качестве потенциально значимой субпопуляции клеток периферической крови для поиска новых биологических маркеров наличия и тяжести течения РС. Однако, в настоящее время не существует единой общепринятой классификации В-лимфоцитов, а в клинических иммунологических исследованиях для выявления различных субпопуляций CD19-позитивных клеток применяется несколько алгоритмов, основанных на применении антител против IgD, CD5, CD27 и CD38.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров (n=27) и больных РС (n=25), полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием КЗЭДТА. Группы больных РС и условно здоровых доноров достоверно не различались по половому и возрастному составу. Диагноз РС устанавливался согласно критериям МакДональда. Тяжесть заболевания оценивалась с помощью расширенной шкалы инвалидизации (EDSS). Для данной группы критериями исключения являлись EDSS менее 1,5 и более 3,5 баллов. У всех больных была диагностирована рецидивирующая

форма РС. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 и CD19, конъюгированными с Krome Orange и APC-AlexaFluor700, соответственно. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD, CD5, CD38 и CD27, конъюгированными с FITC, Pacific Blue, PE и PC7, соответственно. В работе использовали антитела производства Beckman Coulter (США). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.5 (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10000 одиночных В-лимфоцитов. Удаление слипшихся клеток из зоны анализа производили на основании оценки соотношения пикового и интегрального сигналов по параметрам прямого и бокового светорассеяния для каждой из клеток. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде% позитивных клеток от искомой популяции, приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (25%; 75%). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение.** Было показано, что относительное содержание В-клеток с фенотипом CD19<sup>+</sup> в периферической крови больных РС было достоверно выше (p=0,005) при сравнении с результатами, полученными для условно здоровых добровольцев (17,88%

(12,88; 25,15) и 11,77% (9,52; 15,26), соответственно). Для более детального исследования субпопуляционного состава В-лимфоцитов были использованы три независимых алгоритма анализа, основанные на изучении ко-экспрессии поверхностного IgD и CD38, поверхностного IgD и CD27, а также CD5 и CD27.

В рамках первого подхода в периферической крови можно выявить шесть основных субпопуляций В-лимфоцитов [3]. Красный костный мозг покидают клетки с фенотипом IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>low</sup>, которые обычно обозначаются как Vm1 (“virgin naïve”) В-клетка. После активации антигеном инициируется антиген-зависимая стадия развития В-клеток, для прохождения которой В-лимфоциту необходимо оказаться в В-зависимых зонах периферических лимфоидных органов. Эти клетки получили обозначение Vm2 или “активированные «наивные» клетки” (фенотип IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>dim</sup>). Они покидают кровотоки и перемещаются вглубь фолликула, превращаясь в Vm2<sup>+</sup>-клетки или клетки-предшественники герминативного (зародышевого) центра (фенотип IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>hi</sup>). В дальнейшем имеет место их дифференцировка в клетки зародышевого центра – Vm3-центробласты, которые, подвергаясь соматическим гипермутациям в Ig-вариабельных участках генов, трансформируются в Vm4-центроциты, экспрессирующие высокоаффинные антитела (обе популяции обладают фенотипом IgD<sup>low</sup>CD38<sup>hi</sup> и в периферической крови обнаруживаются в очень малом количестве). Часть клеток последней из упомянутых популяций способна к формированию В-клеток памяти, тогда как другая часть популяции Vm4 превращается в плазмобласты. В рамках использованной классификации популяции «ранних» Vm5 и Vm5 соответствуют активированным и покоящимся В-клеткам памяти. Как показано в таблице, у больных РС отмечается достоверное снижение относительного содержания как «наивных» Vm1, так и клеток памяти за счет увеличения доли активированных Vm2 лимфоцитов.

Сходные результаты были получены при использовании алгоритма выявления субпопуляций В-клеток на основании ко-экспрессии IgD и CD27, последний из которых рассматривается в качестве одного из основных маркеров В-клеток памяти [4]. Ее применение позволяет выявить следующие популяции В-лим-

фоцитов: «наивные» клетки (IgD<sup>dim</sup>CD27<sup>low</sup>), и клетки памяти, которые еще не переключили (“unswitched” IgD<sup>dim</sup>CD27<sup>dim</sup>) или уже переключили (“switched” IgD<sup>low</sup>CD27<sup>dim</sup>) класс синтезируемых антител, а также «дважды негативные» клетки, в настоящее время рассматриваемые в качестве одной из покоящихся субпопуляций В-клеток памяти, и клетки-предшественники плазматических клеток IgD<sup>low</sup>CD27<sup>bright</sup>. Показано, что у больных РС достоверно ( $p < 0,001$ ) повышено относительное содержание В-клеток с фенотипом IgD<sup>dim</sup>CD27<sup>low</sup>, тогда как процент остальных субпопуляций более зрелых фенотипов значительно снижен.

При анализе ко-экспрессии CD27 и CD5 все В-лимфоциты периферической крови были разделены на четыре субпопуляции. Отсутствие обоих поверхностных антигенов свидетельствует о том, что В-клетки являются «наивными» В2-лимфоцитами [5]. Появление CD27 указывает на прохождение антиген-зависимой стадии дифференцировки и превращение В-клетки в клетку памяти. Наличие же на поверхности CD5 традиционно рассматривается в качестве одного из признаков В1-лимфоцитов, способных к продукции низкоаффинных аутореактивных антител (преимущественно IgM), но в рамках данной субпопуляции также содержится некоторое количество регуляторных В-лимфоцитов. Применение описанного алгоритма анализа выявило увеличение относительного содержания «наивных» дважды негативных В-лимфоцитов периферической крови за счет снижения клеток более зрелых форм при стабильном содержании клеток с фенотипом CD27<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>.

Все результаты, полученные с использованием трех независимых подходов к анализу субпопуляционного состава В-лимфоцитов, свидетельствуют об увеличении в циркулирующей крови больных РС «наивных» активированных клеток. Особенно следует подчеркнуть, что клетки этих популяций (IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>dim</sup> и IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>hi</sup>) способны к выходу из кровотока в периферические ткани и дальнейшей дифференцировке, продукции как регуляторных цитокинов, так и антиген-специфических антител. Более того, именно активированные В-клетки могут оказывать существенное влияние на местный воспалительный ответ, опосредованный как Т-лимфоцитами различных субпопуляций, так и миелоидными клетками.

Таблица. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) периферической крови у больных рассеянным склерозом.

Исследуемые популяции В-лимфоцитов	Больные РС, n=25, Med (Q25; Q75)	Условно здоровые, n=27, Med (Q25; Q75)	p
Анализ ко-экспрессии поверхностного IgD и CD38:			
Bm1	5,92 (2,79; 8,45)	11,17 (8,99; 18,23)	<0,001
Bm2	72,15 (61,86; 79,95)	56,00 (46,67; 64,80)	<0,001
Bm2'	7,99 (6,14; 11,45)	6,33 (3,45; 8,38)	0,007
Bm3+Bm4	0,89 (0,48; 1,28)	0,72 (0,49; 1,12)	0,527
«ранние» Bm5	6,10 (3,42; 7,74)	13,31 (9,99; 16,65)	<0,001
Bm5	4,82 (3,10; 6,04)	8,57 (7,12; 12,66)	<0,001
Анализ ко-экспрессии CD27 и CD38:			
«Предшественники» плазмобластов	0,28 (0,16; 0,36)	0,40 (0,29; 0,60)	0,011
«Наивные» клетки	84,69 (78,79; 88,63)	60,61 (52,29; 72,42)	<0,001
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> клетки памяти	5,16 (2,88; 7,62)	13,17 (10,20; 20,03)	<0,001
CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> клетки памяти	7,94 (4,55; 10,29)	16,82 (13,19; 24,74)	<0,001
«дважды негативные» клетки	3,19 (2,16; 4,54)	4,78 (3,17; 5,69)	0,013
Анализ ко-экспрессии CD5 и CD27:			
CD27 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup>	13,35 (10,69; 17,35)	33,77 (23,79; 41,76)	<0,001
CD27 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>	1,38 (0,90; 2,16)	1,87 (1,26; 2,88)	0,012
CD27 <sup>-</sup> CD5 <sup>-</sup>	68,42 (57,57; 76,42)	53,79 (42,74; 61,15)	<0,001
CD27 <sup>-</sup> CD5 <sup>+</sup>	16,35 (8,73; 18,66)	10,90 (9,07; 14,74)	0,080

В-лимфоциты за счет секреции таких цитокинов как TNF $\alpha$ , IL-6, GM-CSF способны усиливать воспаление и активировать широкий спектр клеток-мишеней [6]. С другой стороны, некоторые популяции В-клеток, секретирующие IL-10 и IL-35, обладают выраженными супрессорными свойствами, что способствует ограничению воспалительного ответа и снижает область поражения в периферических тканях [7]. Детальное исследование роли как В-клеток, так и фолликулярных Т-хелперов, оказывающих непосредственное влияние на процессы созревания и дифференцировки В-лимфоцитов, может оказать существенное влияние на современное понимание причин возникновения и патогенез рассеянного склероза, а также разработать новые подходы к терапии данного заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Serafini B., Rosicarelli B., Magliozzi R. et al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.*, 2004, 14, 164-174.
2. Bittner S., Ruck T., Wiendl H. et al. Targeting B-cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: from pathophysiology to optimal clinical management. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, 2017, 10, 51-66.
3. Bohnhorst J. Q., Bjørgan M. B., Thoen J.E, et al. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J. Immunol.*, 2001, 10, 3610-3618.
4. Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.*, 2008, .20, 67-82.
5. Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, (2 издание дополненное и расширенное), 2014, 576 с. [Zurochka A. V., Khaydukov S. V., Kudryavtsev I. V., Chereshevnev V. A. Flow cytometry in medicine and biology. Ekaterinburg, URO RAS (2nd edition), 2014, 576 p.].
6. Dang V.D., Hilgenberg E., Ries S. et al. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, 28, 77-83.
7. Shen P, Roch T, Lampropoulou V. et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 2014, 507, 366-370.

## PERIPHERAL BLOOD B CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Kudryavtsev I. V.<sup>1,2</sup>, Ilves A. G.<sup>3</sup>, Krobinets I. I.<sup>4</sup>, Mineev K. K.<sup>3</sup>,  
Serebriakova M. K.<sup>1</sup>, Petrov A. M.<sup>3</sup>, Stoliarov I. D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Medicine;* <sup>2</sup>*N. N. Petrov Research Institute of Oncology;*

<sup>3</sup>*N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain RAS;* <sup>4</sup>*Russian Research Institution of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russia*

Demyelination during multiple sclerosis (MS) can be associated with B-cells that can produce autoreactive antibodies and can be localized in specialized lymphoid follicles within the central nervous system. Using multicolor flow cytometry, it was found out that the relative number of peripheral blood CD19<sup>+</sup> B cells in patients with MS (n = 25) was significantly higher (p = 0.005) when compared with the healthy volunteers (n = 27, 17.88% (12.88, 25.15) and 11.77% (9.52, 15.26), respectively). To identify the distinct B lymphocytes subsets we studied coexpression of IgD and CD38, IgD and CD27, as well as CD5 and CD27. It was shown that in patients with MS the relative number of IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>low</sup> “naive” and IgD<sup>low</sup> memory subsets was significantly decreased due to the increased proportion of activated IgD<sup>dim</sup>CD38<sup>dim</sup> B lymphocytes. Furthermore, the relative content of B cells with the IgD<sup>dim</sup>CD27<sup>low</sup> phenotype was significantly increased (p < 0.001), while the percentages of the other subsets purified on the co-expression of IgD and CD27 were significantly reduced. A detailed analysis of B cells and follicular T-helpers – Th subset that affects the maturation and differentiation of B lymphocytes – could have a significant impact on the current understanding of the causes and pathogenesis of MS, as well as could develop the new approaches to the therapy of this disease.

*Key words:* multiple sclerosis, flow cytometry, B cell subsets, IgD and CD38