

В-ЛИМФОЦИТЫ КАК АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ*

Е.М. Куклина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Е.Н. Смирнова, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Т.В. Байдина, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

И.В. Некрасова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Т.С. Балашова, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Н.В. Сурсякова, *Пермский государственный медицинский университет им. академика*

Е.А. Вагнера

И.Ю. Данченко, *Центр рассеянного склероза при ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая больница»*

У пациентов с органоспецифичными аутоиммунными патологиями изучена экспрессия В-лимфоцитами молекул, участвующих в презентации антигена Т-клеткам, CD80/CD86 и HLA-DR, а также ответ Т-лимфоцитов на экзо- и аутоантигены, представленные аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре. Показана повышенная экспрессия костимулирующей молекулы CD80 В-клетками памяти (CD19⁺CD27⁺) пациентов с аутоиммунными тиреоидитами (АИТ) *ex vivo*, а также усиление экспрессии CD80 (для пациентов с рассеянным склерозом (РС) и АИТ) и HLA-DR (для пациентов с АИТ) в условиях поликлональной активации В-клеток *in vitro*, что свидетельствует о повышении потенциальной антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов у пациентов исследованных групп.

Это предположение подтверждается более высоким, чем у здоровых доноров, пролиферативным ответом CD4⁺Т-лимфоцитов пациентов с АИТ на экзогенный антиген, столбнячный анатоксин, представленный аутологичными В-лимфоцитами. Кроме того, у больных АИТ индекс пролиферации CD4⁺Т-клеток в ответ на ключевой аутоантиген, ассоциированный с данной патологией, тиреоидную пероксидазу, был статистически значимо выше такового для здоровых доноров, хотя для второго аутоантигена, тиреоглобулина, подобного эффекта не выявлено.

Аналогичные исследования, проведенные в отношении пациентов с сахарным диабетом аутоиммунной этиологии, также продемонстрировали способность В-лимфоцитов, преинкубированных с аутоантигенами, вызывать пролиферативный ответ CD4⁺Т-лимфоцитов, однако из трех исследованных аутоантигенов индекс пролиферации был повышен только для проинсулина, но не для инсулина или декарбоксилазы глутаминовой кислоты. Учитывая интенсивную инфильтрацию В-лимфоцитами тканей-мишеней аутоиммунной

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-96007).

атаки, которая характерна для всех трех исследованных патологий, антигенпрезентирующая активность этих клеток может служить одним из механизмов индукции или прогрессии аутоиммунных процессов.

Ключевые слова: аутоиммунитет, В-лимфоциты, презентация антигена, рассеянный склероз, аутоиммунные тиреоидиты, сахарный диабет 1-го типа.

Участие В-лимфоцитов в патогнезе органоспецифичных аутоиммунных патологий, таких как рассеянный склероз (РС), сахарный диабет аутоиммунной этиологии (сахарный диабет 1-го типа, СД1) или аутоиммунные тиреоидиты (АИТ), на сегодняшний день убедительно доказано [1–5], однако целый ряд данных, полученных в экспериментальных моделях на животных, указывает на то, что аутоантитела не играют важной роли в этом процессе: удаление соответствующих аутоантител после индукции заболевания не приводит к исчезновению симптомов (экспериментальные аутоиммунные энцефаломиелиты, экспериментальные аутоиммунные тиреоидиты), а экзогенное введение аутоантител не вызывает развития аутоиммунной патологии или осложнения течения заболевания (экспериментальные аутоиммунные энцефаломиелиты) [6, 7]. Очевидно, основная роль В-лимфоцитов в развитии данных патологий заключается не в продукции аутоантител и не в антителообразовании в целом, а связана с реализацией альтернативных функций этих клеток, в первую очередь – с презентацией аутоантигенов Т-лимфоцитам [8]. Оценка антигенпрезентирующей активности В-клеток и была целью настоящего исследования.

В работе изучали лейкоциты пациентов с тремя органоспецифичными аутоиммунными заболеваниями – РС, СД1 и АИТ. Контрольную группу составляли здоровые доноры – лица с отсутствием аутоиммунных заболеваний в анамнезе, негативные в отношении соответствующих аутоантител, а также (для СД1) пациенты с диабетом неаутоиммунной природы – сахарным диабетом 2-го типа (СД2). Лейкоциты выделяли центрифуги-

рованием в градиенте плотности фикола-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$), с последующим фракционированием В- и Т-лимфоцитов ($\text{CD}19^+/\text{CD}4^+$ -клеток) с помощью соответствующих систем для выделения (Invitrogen, R&D Systems). Потенциальная способность В-клеток презентировать антигены оценивалась по экспрессии ко-стимулирующих молекул, необходимых для адекватного ответа Т-лимфоцита на презентуемый антиген, CD80, CD86, а также молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR, в составе которой В-лимфоциты представляют антиген $\text{CD}4^+$ Т-клеткам.

Эти показатели оценивались *ex vivo* и *in vitro*, в ответ на поликлональную активацию (анти-IgM/IgG + CD40L, Jackson IRL), отдельно в наивных В-лимфоцитах ($\text{CD}19^+\text{CD}27^-$) и В-клетках памяти ($\text{CD}19^+\text{CD}27^+$) – проточной цитометрией. Во всех пробах оценивался как процент клеток, несущих конкретный маркер, так и уровень экспрессии данного маркера (Mean Fluorescence Intensity, MFI).

Для непосредственной оценки антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов определяли способность В-клеток вызывать активацию $\text{CD}4^+$ Т-лимфоцитов, реактивных в отношении основных аутоантигенов, ассоциированных с конкретной аутоиммунной патологией (для АИТ – тиреоидной пероксидазы (ТПО, Abcam) и тиреоглобулина (ТГ, Sigma-Aldrich); для СД1 – декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD, Abcam), инсулина (Sigma-Aldrich) и проинсулина (R&D Systems); для рассеянного склероза – миелинолигодендроцитарного гликопротеина (MOG, R&D Systems).

В качестве положительного контроля использовали экзогенный антиген – столбнячный анатоксин (СА) или поли-

клональный лимфоцитарный активатор – фитогемагглютинин (ФГА). Ответ Т-лимфоцитов оценивали по пролиферации клеток и по продукции $IFN\gamma$. Проллиферативный ответ определяли иммуноферментным анализом, по включению в клетки синтетического аналога тимидина (Amersham). В-лимфоциты, предварительно нагруженные антигеном, культивировали (1×10^5 клеток/мл) с аутологичными Т-лимфоцитами (1×10^6 клеток/мл) в соотношении 1:10 в течение 5 суток, после чего определяли пролиферативный ответ. Результаты представляли как индекс стимуляции, т.е. отношение значения оптической плотности пробы с В-лимфоцитами, нагруженными антигеном, к таковому для пробы с В-клетками без антигена. В случае использования в качестве положительного контроля ФГА В-клетки после инкубации с антигеном обрабатывали митомицином С (50 мкг/мл) в течение 2 мин и отмывали – для предупреждения собственной В-клеточной пролиферации. Уровень интерферона гамма в супернатантах клеточных культур определяли иммуноферментным анализом. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Оценка экспрессии костимулирующих молекул и HLA-DR *ex vivo* не выявила статистически значимых отличий от контрольной группы у пациентов с РС, но показала повышение экспрессии CD80 наивными В-лимфоцитами у пациентов с АИТ, причем повышался как процент CD80-позитивных клеток ($0,219 \pm 0,054$ – у здоровых доноров, $1,01 \pm 0,259$ – у больных АИТ; $p < 0,05$) так и уровень экспрессии в них данного маркера, определяемый как средняя интенсивность свечения клеток (MFI: $57,7 \pm 8,20$ – у здоровых доноров, $101 \pm 23,8$ – у больных АИТ; $p < 0,05$).

Культивирование фракционированных В-лимфоцитов приводило к существенным колебаниям в экспрессии молекул CD80 и HLA-DR в условиях поликлональной активации клеток (анти-

IgM/IgG + CD40L): уровень экспрессии CD80 активированными В-лимфоцитами пациентов с РС был статистически значительно выше такового у здоровых доноров (MFI: $211 \pm 26,4$ – у здоровых доноров, $282 \pm 25,1$ – у больных РС; $p < 0,05$), а при АИТ показано повышение не только уровня экспрессии данной костимулирующей молекулы (MFI: $211 \pm 26,4$ – у здоровых доноров, $340 \pm 29,4$ – у больных АИТ; $p < 0,05$), но и процента В-лимфоцитов, несущих данный маркер ($62,8 \pm 7,94$ – у здоровых доноров, $85,7 \pm 11,6$ – у больных АИТ; $p < 0,05$). Уровень экспрессии HLA-DR активированными В-лимфоцитами также был повышен при АИТ (MFI: $176 \pm 20,1$ – у здоровых доноров, $247 \pm 29,5$ – у больных АИТ; $p < 0,05$).

В целом, продемонстрирована повышенная экспрессия молекулы CD80 наивными В-лимфоцитами пациентов с АИТ *ex vivo*, а также усиление экспрессии CD80 (для пациентов с РС и АИТ) и HLA-DR (для пациентов с АИТ) в условиях BCR-зависимой активации клеток *in vitro*. Выявленные эффекты свидетельствуют о повышении потенциальной антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов у пациентов исследованных групп.

Оценка пролиферативного ответа $CD4^+$ Т-лимфоцитов пациентов с АИТ на антигены, представленные аутологичными В-клетками в совместной культуре, в целом подтвердила приведенные выше эффекты: индекс пролиферации клеток в ответ на ТПО был у пациентов с АИТ статистически значительно выше такового для здоровых доноров и сопоставим с ответом на экзогенный антиген, СА (табл. 1). В отношении второго аутоантигена, тиреоглобулина, пролиферация $CD4^+$ Т-лимфоцитов значительно не отличалась от соответствующего показателя у здоровых доноров, но имела тенденцию к повышению (см. табл. 1).

Важно отметить, что ответ Т-лимфоцитов на экзогенный антиген (положительный контроль) у больных АИТ был

Таблица 1

Пролиферативный ответ CD4⁺Т-лимфоцитов больных АИТ на антигены, презентируемые аутологичными В-лимфоцитами в культуре

Тип антигена	Индекс пролиферации (M ± m)	
	здоровые доноры	пациенты с АИТ
Столбнячный анатоксин (положительный контроль)	1,780 ± 0,176	2,440 ± 0,385*
Тиреоидная пероксидаза	1,38 ± 0,15	2,520 ± 0,417*
Тиреоглобулин	1,150 ± 0,124 ^a	1,650 ± 0,221 ^a

Примечание: АИТ – аутоиммунный тиреозит; * – $p < 0,05$ (сопоставление с соответствующим показателем для здоровых доноров); ^a – $p < 0,05$ (сопоставление с соответствующим показателем для контрольного антигена).

более выражен, чем у здоровых доноров, что может служить свидетельством более высокой антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов у пациентов с АИТ и согласуется с показанной на предыдущем этапе повышенной экспрессией В-клетками таких пациентов молекул, участвующих в презентации антигена. Одновременная оценка уровня IFN γ в культуральных супернатантах не выявила статистически значимого повышения этого показателя в ответ как на экзогенный антиген, так и на аутоантигены.

Аналогичные исследования, проведенные в отношении пациентов с СД1, также продемонстрировали способность В-лимфоцитов, преинкубированных с аутоантигенами, вызывать пролиферативный ответ CD4⁺Т-лимфоцитов, однако индекс пролиферации был достоверно повышен только для проинсулина, но не инсулина или декарбоксилазы глутаминовой кислоты (табл. 2). У больных диабетом неаутоиммунной природы, сахарным диабетом 2-го типа (СД2), ответа на аутоантигены не выявлено, как и у здоровых доноров (см. табл. 2).

В целом, мы показали, что В-клетки пациентов с органоспецифичными аутоиммунными патологиями способны представлять не только экзо-, но и аутоантигены CD4⁺Т-лимфоцитам, причем для экзогенного антигена делают это более эффективно, чем В-лимфоциты здоровых доноров. Учитывая интенсивную инфильтрацию В-лимфоцитами тканей-мишеней аутоиммунной атаки как при АИТ [1], так и при аутоиммунной форме диабета [9] или рассеянном склерозе [2], антигенпрезентирующая активность этих клеток может служить одним из механизмов индукции или прогрессии аутоиммунных процессов. Что касается IFN γ , который эффективно синтезируется Т-лимфоцитами в ответ на поликлональный активатор (ФГА), но не выявляется в значимых количествах при ответе на антигены, представленные аутологичными В-клетками, то этот факт требует объяснения.

Согласно отдельным имеющимся в литературе данным на этот счет, презентация антигена В-лимфоцитами может вызывать анергию Т-лимфоцита, распознающего соответствующий антигенный пептид [10,

Таблица 2

Пролиферативный ответ CD4⁺Т-лимфоцитов больных сахарным диабетом аутоиммунной этиологии на антигены, презентируемые аутологичными В-лимфоцитами в культуре

Тип стимулятора	Индекс пролиферации (M ± m)		
	здоровые доноры	СД1	СД2
ФГА (положительный контроль)	9,320 ± 0,69	8,26 ± 0,94	6,88 ± 0,67
Декарбоксилаза глутаминовой кислоты	1,190 ± 0,112	1,280 ± 0,202	1,320 ± 0,169
Проинсулин	1,130 ± 0,109	3,020 ± 0,634* ^a	1,570 ± 0,328
Инсулин	1,280 ± 0,256	1,220 ± 102	1,270 ± 0,231

Примечание: СД1 – сахарный диабет 1-го типа, СД2 – сахарный диабет 2-го типа, ФГА – фитогемагглютинин; * – $p < 0,05$ (сопоставление с соответствующим показателем для контрольной группы); ^a – $p < 0,05$ (сопоставление с соответствующим показателем для СД2).

11] или, по другим данным, инициировать дифференцировку Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки (Treg) [12]. Наличие в наших исследованиях пролиферативного ответа на антиген, презентруемый В-лимфоцитами, анергию, по-видимому, исключает, а вот направленная индукция Treg вполне может объяснить выявленный

феномен, но в этом случае роль антиген-презентирующей функции В-клеток в развитии аутоиммунной патологии меняется на противоположную, поскольку Treg подавляют воспалительные процессы, в том числе аутоиммунные. Проверка этой гипотезы будет одной из задач следующего этапа работы.

Библиографический список

1. *Armengol M.P., Juan M., Lucas-Martin A.* [et al.] Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers // *Am. J. of Pathol.* – 2001. – Vol. 159. – P. 861–873.
2. *Magliozzi R., Howell O., Vora A.* [et al.] Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology // *Brain.* – 2007. – Vol. 130(4). – P. 1089–1104.
3. *Matsushita M., Yamamoto T., Yokozeki H.* Role of cytokines and proteases in murine scleroderma // *J. Med. Dent. Sci.* – 2008. – Vol. 55(3-4). – P. 215–225.
4. *Hauser S.L., Waubant E., Arnold D.L.* [et al.] B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 358(7). – P. 676–688.
5. *Alexopoulos H., Kampylafka E.I., Fouka P.* [et al.] Anti-aquaporin-4 autoantibodies in systemic lupus erythematosus persist for years and induce astrocytic cytotoxicity but not CNS disease // *J. Neuroimmunol.* – 2015. – Vol. 289. – P. 8–11.
6. *Braley-Mullen H., Yu S.* Early requirement for B cells for development of spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 7262–7269.
7. *Kuhle J., Pohl C., Mehling M.* [et al.] Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 356(4). – P. 371–378.
8. *Good K.L., Avery D.T., Tangye S.G.* Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182(2). – P. 890–901.
9. *Willcox A., Richardson S.J., Bone A.J.* [et al.] Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009. – Vol. 155. – P. 173–181.
10. *Höllsberg P., Batra V., Dressel A., Hafler D.A.* Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157(12). – P. 5269–5276.
11. *Dalai S.K., Mirshahidi S., Morrot A., Zavala F., Sadegh-Nasseri S.* Anergy in memory CD4+ T cells is induced by B cells // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181(5). – P. 3221–3231.
12. *Morlacchi S., Soldani C., Viola A., Sarukhan A.* Self-antigen presentation by mouse B cells results in regulatory T-cell induction rather than anergy or clonal deletion // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – P. 984–991.

B LYMPHOCYTES AS ANTIGENPRESENTING CELLS IN AUTOIMMUNE PATHOLOGIES

E.M. Kuklina¹, E.N. Smirnova², T.V. Baidina², I.V. Nekrasova¹,
T.S. Balashova², N.V. Sursyakova², I.Yu. Danchenko³

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

² *Perm State Medical University named after E.A. Wagner*

³ *Center of multiple sclerosis, Perm regional clinical hospital*

B cell expression of the molecules involved in antigen presentation for T cells, CD80/CD86 and HLA-DR, as well as a T lymphocyte response to exo-/auto-antigens presented by autologous B lymphocytes in mixed culture have been studied in patients with organo-specific autoimmune diseases. The increased *ex vivo* expression of costimulating molecule CD80 by memory B cells (CD19⁺CD27⁺) of autoimmune thyroidite (AIT) patients was shown, as well as the *in vitro* amplification of the expression of CD80 (for multiple sclerosis (MS) and AIT patients) and HLA-DR (for AIT patients) in B cell polyclonal activation, which is evidence of the increasing B cell potential antigenpresenting activity in autoimmune diseases.

This proposal is confirmed by a higher proliferative response of AIT patient CD4⁺T lymphocytes to the exoantigen tetanus toxoid presented by autologous B lymphocytes. Besides, in AIT patients, the CD4⁺T cell proliferative response to the key autoantigen, associated with the pathology, thyroid peroxidase, was higher than that of the healthy donors, though for the second autoantigen, thyroglobulin, the same effect was not revealed.

Analogous investigations toward autoimmune diabetes mellitus patients have revealed the ability of B lymphocytes, preincubated with autoantigens, to induce the CD4⁺T cell proliferative response, however, out of three autoantigens studied, the increased proliferation index was detected only for proinsulin, but not for insulin or glutamic acid decarboxylase. Considering the intensive B cell infiltration of autoimmune attack target tissues, which is characteristic of all the diseases investigated, the antigen presenting activity of B lymphocytes may serve as one of the mechanisms of autoimmune processes induction or progression.

Keywords: autoimmunity, B lymphocytes, antigen presentation, multiple sclerosis, autoimmune thyroiditis, type 1 diabetes mellitus.

Сведения об авторах

Куклина Елена Михайловна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: ibis_07@mail.ru

Смирнова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой эндокринологии, Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера (ПГМУ), 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: elenasm2001@mail.com

Байдина Татьяна Витальевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии, ПГМУ; e-mail: tatiana_baidina@mail.ru

Некрасова Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: nirina5@mail.ru

Балашова Татьяна Сергеевна, аспирант, ПГМУ; e-mail: permbtc@mail.ru

Сурсякова Надежда Владимировна, аспирант, ПГМУ; e-mail: nadezhda-sur@mail.ru

Данченко Ирина Юрьевна, кандидат медицинских наук, врач-невролог Центра рассеянного склероза при ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая больница», 614000, г. Пермь, ул. Луначарского, 95; e-mail: irene-dan@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.