

Вклад В-лимфоцитов в продукцию интерлейкина 17 при рассеянном склерозе

Сурсякова Н.В.¹, Куклина Е.М.², Байдина Т.В.¹, Некрасова И.В.², Трушников Т.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь; ²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», Пермь
¹Россия, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26; ²Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

Изучение патогенетических систем, участвующих в рассеянном склерозе (РС), необходимо для разработки новых подходов к терапии.

Цель исследования — определить вклад В-лимфоцитов в продукцию интерлейкина 17 (ИЛ17) при РС с оценкой способности В-клеток индуцировать дифференцировку Th17, собственной продукции ИЛ17 В-лимфоцитами при данной патологии.

Материал и методы. Обследованы 81 человек, из них 68 — пациенты с диагнозом РС, 13 — здоровые доноры. В сыворотке крови исследованы концентрации ИЛ17А, ИЛ10, факторов, ассоциированных с дифференцировкой (BAFF), и общего IgG методом иммуноферментного анализа. В дополнительном исследовании участвовали 13 пациентов с РС и 11 здоровых доноров. Из крови выделяли мононуклеарные клетки, из которых получали В-лимфоциты и CD4⁺T-лимфоциты. В-лимфоциты инкубировали с столбнячным анатоксином (ТТ) или с миелин-олигодендроцитарным гликопротеином, после чего отмывали от несвязавшегося антигена и культивировали совместно с аутологичными CD4⁺T-лимфоцитами или с мононуклеарными клетками периферической крови, затем оценивали содержание в пробе клеток Th17. С использованием проточной цитометрии *ex vivo* оценивали экспрессию RORγt В-лимфоцитами и CD4⁺T-лимфоцитами. Уровень ИЛ17 в сыворотке крови и в супернатантах клеточных культур определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Высокий уровень ИЛ17 в сыворотке пациентов с РС ассоциирован с повышенной концентрацией BAFF, у пациентов с высоким уровнем IgG концентрация ИЛ17 также была вдвое выше. Показано статистически значимо более высокое содержание ИЛ17-позитивных В-лимфоцитов при РС.

Заключение. В-лимфоциты могут вносить вклад в продукцию ИЛ17 при РС двумя путями — за счет индукции дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих данный цитокин, и за счет собственного синтеза ИЛ17.

Ключевые слова: рассеянный склероз; В-клетки; Th17-клетки; интерлейкин 17.

Контакты: Татьяна Николаевна Трушникова; trushnikova.t@mail.ru

Для ссылки: Сурсякова НВ, Куклина ЕМ, Байдина ТВ, Некрасова ИВ, Трушников ТН. Вклад В-лимфоцитов в продукцию интерлейкина 17 при рассеянном склерозе. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2023;15(Прил. 1):15–21. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-15-15-21

Contribution of B-lymphocytes to the production of Interleukin-17 in multiple sclerosis Sursyakova N.V.¹, Kuklina E.M.², Baidina T.V.¹, Nekrasova I.V.², Trushnikova T.N.¹

¹Acad. E.A. Vagner Perm State Medical University, Ministry of Health of Russia, Perm;

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences — the Branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm
¹26, Petropavlovskaya St., Perm 614990, Russia; ²13, Goleva St., Perm 614081, Russia

The study of pathogenic systems involved in multiple sclerosis (MS) is essential for the development of new therapies.

Objective: to determine the contribution of B-lymphocytes to the production of IL-17 in MS with an assessment of the ability of B-cells to induce the differentiation of Th17 and the own production of IL-17 by B-lymphocytes in this pathology.

Material and methods. A total of 81 subjects were examined, 68 of whom were patients diagnosed with MS, 13 were healthy individuals. The concentrations of IL-17A, IL-10, BAFF and total IgG were analyzed in blood serum by ELISA. The additional study included 13 MS patients and 11 healthy donors. Mononuclear cells were isolated from the blood, from which B-lymphocytes and CD4⁺T-lymphocytes were obtained. B-lymphocytes were incubated with tetanus toxoid or with myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG), after which they were washed from unbound antigen and cultured together with autologous CD4⁺T-lymphocytes or with peripheral blood mononuclear cells, then the content of Th17 cells in the sample was evaluated. Flow cytometry *ex vivo* assessed the expression of RORγt by B-lymphocytes and CD4⁺T-lymphocytes. The level of IL-17 in blood serum and cell culture supernatants was determined by ELISA.

Results. High IL-17 serum levels in MS patients are associated with elevated BAFF concentrations, and in patients with high IgG levels, IL-17 concentrations were also twice as high. A statistically significant higher level of IL-17-positive B-lymphocytes was detected in MS.

Conclusion. B-lymphocytes may contribute to the production of IL-17 in MS in two ways — by inducing the differentiation of T-lymphocytes producing this cytokine and by their own synthesis of IL-17.

Keywords: multiple sclerosis; B-lymphocytes; Th17; IL-17.

Contact: Tat'yana Nikolaevna Trushnikova: trushnikova.t@mail.ru

For reference: Sursyakova NV, Kuklina EM, Baidina TV, Nekrasova IV, Trushnikova TN. Contribution of B-lymphocytes to the production of Interleukin-17 in multiple sclerosis. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika* = *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2023;15(Suppl. 1):15–21. DOI: 10.14412/2074-2711-2023-1S-15-21

Рассеянный склероз (РС) является распространенным хроническим воспалительным, демиелинизирующим и нейродегенеративным расстройством центральной нервной системы (ЦНС), поражающим молодых людей, что делает особенно актуальной постоянную разработку новых подходов к его лечению. Тщательно исследуются патогенетические системы, участвующие в РС, для определения звеньев их дисрегуляции и дисфункции и разработки стратегий создания препаратов для целевого вмешательства. Цитокины семейства интерлейкинов 17 (ИЛ17) играют важную роль в развитии воспаления и вовлечены в различные формы иммунного ответа: они участвуют в противоинфекционной защите организма, в противоопухолевом и трансплантационном иммунитете, а также в развитии аутоиммунных заболеваний. В частности, ИЛ17А играет важную роль в развитии РС — нейровоспалительного дегенеративного заболевания, ассоциированного с демиелинизацией нервных волокон вследствие поражения тканей ЦНС аутоспецифичными лимфоцитами [1, 2]. Экспрессия данного интерлейкина повышена у мышей с экспериментальными аутоиммунными энцефаломиелитами (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE, — модель РС у животных) [3], тогда как дефицит ИЛ17 в такой модели ассоциирован с устойчивостью к развитию EAE [1, 3, 4]. У пациентов с РС уровень ИЛ17 в крови также повышен [5, 6] и коррелирует с тяжестью заболевания [5], что позволило рассматривать данный цитокин в качестве перспективной терапевтической мишени — в настоящее время ведутся исследования по использованию моноклональных антител к ИЛ17А в лечении рецидивирующе-ремиттирующей формы РС [7].

Основным продуцентом ИЛ17 является Т-хелперная субпопуляция Th17. Клетки Th17 дифференцируются из наивных CD4⁺Т-лимфоцитов в ответ на антиген, представленный в норме дендритными клетками. Однако при РС важную роль в презентации антигена играют «непрофессиональные» антигенпрезентирующие клетки — В-лимфоциты, которые интенсивно инфильтрируют ЦНС и формируют в мозге структуры, аналогичные зародышевым центрам вторичных лимфоидных органов [8, 9], поэтому исследование роли В-лимфоцитов в индукции дифференцировки Th17 важно для понимания механизмов появления в организме ИЛ17 при данной патологии. Кроме того, сами В-лимфоциты могут при некоторых условиях продуцировать данный цитокин — такие эффекты показаны в ответ на инфицирование *Trypanosoma cruzi* [10] или на активацию Toll-подобных рецепторов на мембране В-клеток *in vitro* [11].

Цель настоящей работы — определить вклад В-лимфоцитов в продукцию ИЛ17 при РС с оценкой как способности В-клеток индуцировать дифференцировку Th17, так и собственной продукции ИЛ17 В-лимфоцитами при данной патологии.

Материал и методы. Обследованы 81 человек, из них 68 — пациенты с диагнозом РС, 13 — здоровые лица. У всех

пациентов и здоровых доноров были взяты образцы периферической крови. В сыворотке крови были исследованы концентрации ИЛ17А, ИЛ10, фактора активации В-клеток (B-cell activating factor, BAFF) и общего IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В дополнительном исследовании приняли участие 13 пациентов (шесть мужчин и семь женщин) с рецидивирующе-ремиттирующим типом течения РС и 11 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с первой группой. Для пациентов были установлены *критерии включения*: достоверно установленный диагноз РС согласно критериям Макдональда (2010), клиническое состояние по Расширенной шкале статуса инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS) до 6 баллов, отсутствие обострения, острых воспалительных заболеваний и беременности на момент исследования. Средний возраст пациентов составил 35±6 лет, уровень инвалидизации по шкале EDSS — 3,2±1 балл. Все пациенты находились на терапии глатирамера ацетатом (оригинальный копаксон) в течение не менее 6 мес до исследования. Глатирамера ацетат является структурным аналогом основного белка миелина (myelin basic protein, MBP), ключевого аутоантигена, ассоциированного с РС, — он конкурирует с эндогенным MBP за связывание с MBP-специфичными Т-лимфоцитами, предупреждая активацию последних. Учитывая это, в данной работе при оценке ответа Т-клеток на активацию использовался другой ключевой аутоантиген, ассоциированный с РС, — миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG).

Из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла и верографина выделяли мононуклеарные клетки, из которых далее получали В-лимфоциты (CD19⁺-клетки) и CD4⁺Т-лимфоциты — фракционированием на иммуномагнитных частицах с помощью стандартных систем для выделения (R&D Systems, США). В-лимфоциты инкубировали с экзогенным антигеном, столбнячным анатоксином (Tetanus toxoid, TT; 5 мкг/мл) или с аутоантигеном, ассоциированным с РС (MOG; 5 мкг/мл) в течение 12 ч, после чего отмывали от несвязавшегося антигена и культивировали совместно с аутологичными фракционированными CD4⁺Т-лимфоцитами или с мононуклеарными клетками периферической крови (МПК) в соотношении 1:10 в течение 48 ч. По окончании культивирования оценивали содержание в пробе клеток Th17 — по экспрессии ключевого транскрипционного фактора и маркера данной Т-клеточной субпопуляции, RORγt, с помощью соответствующих моноклональных антител: анти-CD4*FITC (BioLegend, США), анти-RORγt*PerCP (R&D Systems, США), и набора фиксирующих/пермеабилизирующих буферов для оценки внутриклеточных молекул (BioLegend, США). Наряду с этим *ex vivo* оценивали экспрессию RORγt В-лимфоцитами и CD4⁺Т-лимфоцитами методом проточной цитометрии с использованием моно-

клональных антител анти-CD3*PerCP, анти-CD4*FITC, анти-CD19*FITC, анти- RORγt*PerCP, PE (R&D Systems, США). Уровень ИЛ17 в сыворотке крови и в супернатантах клеточных культур определяли иммуноферментным анализом с использованием стандартного набора («Вектор-Бест», Россия).

Антигенпрезентирующую активность В-лимфоцитов оценивали по ответу Т-клеток на экзоантиген (ТТ) и ключевой аутоантиген, ассоциированный с РС (МОГ), представленный аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре с фракционированными CD4⁺Т-лимфоцитами или с мононуклеарными клетками периферической крови (МПК, источник Т-лимфоцитов). Для оценки Т-хелперной дифференцировки использовали два показателя: 1) процент клеток Th17 в культуре, определяемый по экспрессии ключевого маркера данной популяции, транскрипционного фактора RORγt; 2) уровень ИЛ17 в супернатантах Т-/В-клеточной культуры. При этом наряду с непосредственным определением содержания Th17 и ИЛ17 в культуре оценивались эффекты антигенов, выраженные как отношение исследуемого показателя в пробе с антигеном к соответствующему показателю в пробе без антигена.

В исследовании *in vitro* участвовали больные РС, находящиеся на терапии глатирамера ацетатом — структурным аналогом ключевого РС-ассоциированного аутоантигена МВР, который, конкурентно взаимодействуя с МВР-специфичными Т-лимфоцитами, предупреждает их активацию, но при этом, теоретически, не должен оказывать влияния на взаимодействие Т-лимфоцитов с другим РС-ассоциированным аутоантигеном — МОГ, а также с экзоантигеном ТТ, которые и были использованы в данной работе в качестве активаторов.

Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 10.0 с использованием непараметрических методов Манна—Уитни (для оценки различий между двумя независимыми выборками) и Вилкоксона (для оценки различий между двумя зависимыми выборками).

Результаты. Факторы, ассоциированные с активностью Т-хелперной популяции Th17 и В-лимфоцитов, в сыворотке крови пациентов с РС. Исследованы сывороточные уровни ключевого цитокина, продуцируемого клетками Th17 (ИЛ17), а также основных факторов, ассоциированных с дифференцировкой (BAFF) и функционированием (IgG)

В-лимфоцитов (табл. 1). Сопоставление этих уровней у здоровых доноров и больных РС не выявило статистически значимых отличий ни для одного из исследуемых факторов в контрольной группе ($p=0,150$).

Прямых корреляционных связей между концентрациями ИЛ17, BAFF и общего IgG в сыворотке пациентов с РС также не отмечено, однако сравнительный анализ уровней ИЛ17, BAFF, IgG при разном содержании в сыворотке больных РС каждого из факторов относительно значения медианы его содержания у здоровых доноров позволил выявить ряд закономерностей. Так, показано, что высокий уровень ИЛ17 в сыворотке пациентов с РС ассоциирован с повышенной (вдвое) концентрацией В-клеточного активатора BAFF по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем ИЛ17 ($p=0,063$). И наоборот, высокий уровень BAFF в сыворотке пациентов с РС был ассоциирован с повышенной концентрацией ИЛ17 по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем BAFF ($p=0,062$). Кроме того, у пациентов с высоким уровнем в сыворотке важного показателя В-клеточной активации — IgG — концентрация ИЛ17 также была вдвое выше по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем IgG ($p=0,088$).

В целом, результаты оценки сывороточных факторов у пациентов с РС указывают на возможную связь между провоспалительным цитокином ИЛ17 и факторами, ассоциированными с функционированием В-лимфоцитов, — BAFF и IgG: высокое содержание ИЛ17 у больных РС ассоциировано с повышенным уровнем BAFF, и наоборот, высокие уровни В-клеточных факторов BAFF и IgG ассоциированы с повышенной концентрацией в сыворотке ИЛ17. Следующий этап работы был посвящен исследованию вклада В-лимфоцитов в продукцию ИЛ17 при РС *in vitro*. При этом учитывалось, что В-клетки могут делать это двумя путями: во-первых, презентуя антиген наивным CD4⁺Т-лимфоцитам и иницируя их дифференцировку в Th17; во-вторых, за счет собственной продукции данного цитокина.

Исследование дифференцировки наивных CD4⁺Т-клеток в Th17 в ответ на антиген, представленный В-лимфоцитами, при РС. В группе здоровых доноров содержание Th17 в культуре не изменялось в присутствии экзо- или аутоантигенов, представленных аутологичными В-лимфоцитами (рис. 1, а, б), однако у пациентов с РС оно статистически значимо возрастало в ответ на ключевой ауто-

Таблица 1. Уровни цитокинов и общего IgG в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых доноров, Me [25-й; 75-й перцентили]

Table 1. Serum cytokines and total IgG in MS patients and healthy donors, Me [25th; 75th percentile]

Показатель	ИЛ17, пг/мл	ИЛ10, пг/мл	BAFF, нг/мл	IgG, мг/мл
ИФНβ (n=19)	51,62 [11,63; 70,80]	32,64 [9,07; 47,99]	0,40 [0,21; 0,83]	93,22 [78,99; 104,86]
Глатирамера ацетат (n=18)	43,37 [32,67; 56,39]	26,89 [21,20; 47,73]	0,22 [0,16; 5,46]	93,99 [85,08; 106,97]
Натализумаб (n=20)	24,45 [16,28; 37,38]	17,77 [13,88; 35,68]	0,26 [0,17; 2,41]	83,70 [75,67; 92,24]
Без ПИТРС (n=11)	78,06 [65,98; 175,40]	6,69 [2,90; 72,44]	0,56 [0,40; 1,26]	87,80 [86,18; 91,7]
Все пациенты с РС (n=68)	39,75 [18,6; 70,81]	22,68 [11,24; 48,52]	0,35 [0,19; 1,48]	87,80 [81,48; 103,33]
Здоровые доноры (n=13)	48,05 [39,75; 124,48]	43,60 [35,93; 51,39]	0,30 [0,25; 0,80]	85,31 [81,90; 94,68]

Примечание. ИФНβ — интерферон β; ПИТРС — препараты, изменяющие течение РС.

антиген — MOG, в совместной культуре В-лимфоцитов как с изолированными CD4⁺T-клетками, так и с МПК в качестве источника Т-лимфоцитов (см. рис. 1, а, б).

При этом выявленные эффекты связаны именно с презентацией антигенов, а не с В-зависимой активацией Th17, изначально присутствующих в культуре, поскольку содер-

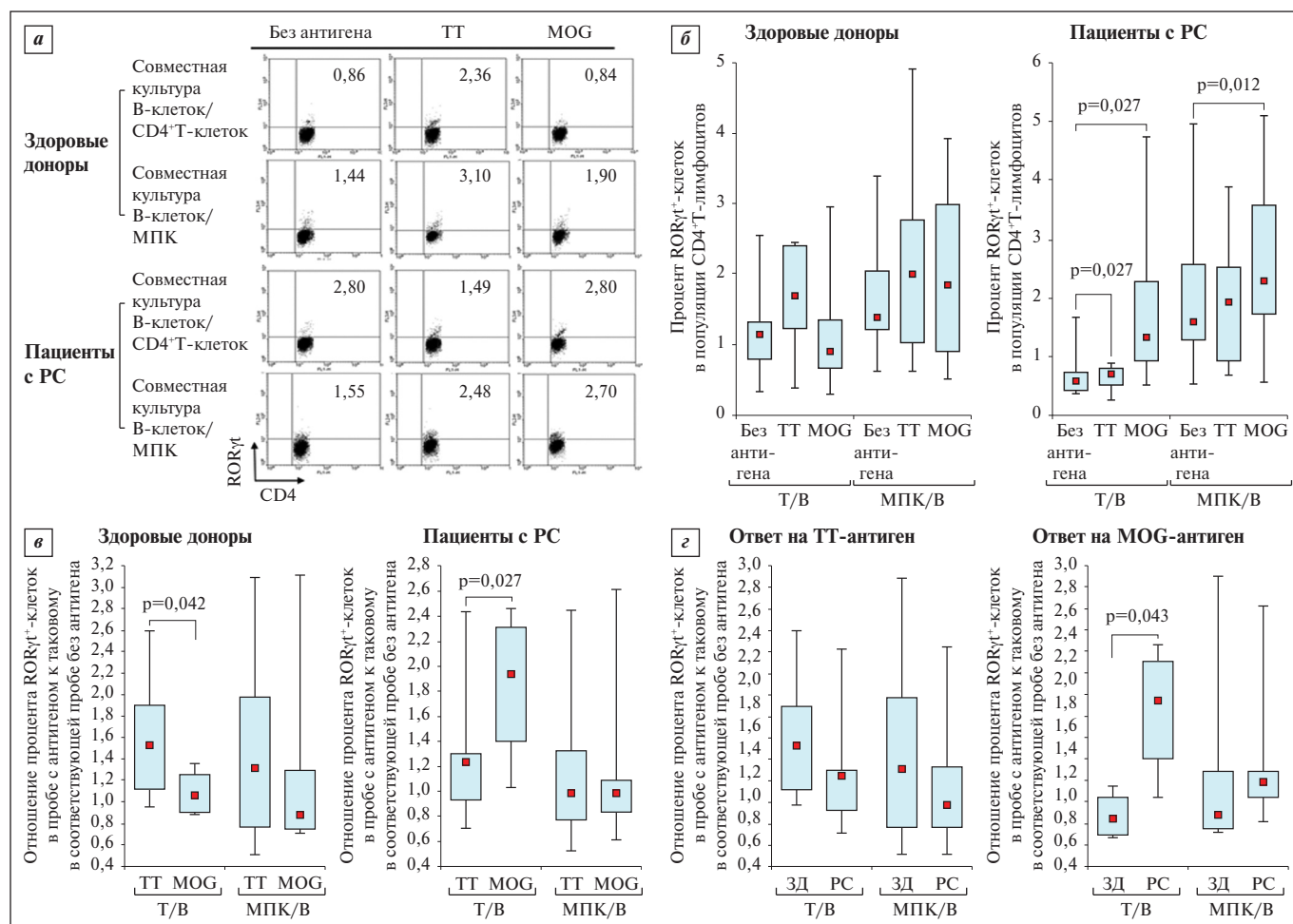


Рис. 1. Дифференцировка CD4⁺T-лимфоцитов здоровых доноров и пациентов с РС в клетки Th17 в ответ на экзоантиген (ТТ) или аутоантиген (МОГ), презентируемые аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре.

а — пример экспрессии RORγt CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на антигены; представлены результаты одного из 11 аналогичных экспериментов для здоровых доноров и одного из 13 для пациентов с РС; указан процент RORγt⁺-клеток в популяции CD4⁺T-лимфоцитов; б — содержание Th17 в совместной культуре CD4⁺T-клеток или МПК с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными антигенами; значимость различий оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона; представлены значения для p<0,05; в — эффекты антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Th17 в ответ на ТТ и МОГ, выраженные как отношение процента Th17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена; значимость различий оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона; представлены значения для p<0,05; г — сопоставление эффектов антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Th17, выраженных как отношение процента Th17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров и пациентов с РС; значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни, представлены значения p<0,05; ЗД — здоровые доноры; РС — пациенты с РС

Fig. 1. Differentiation of CD4⁺T- lymphocytes from healthy donors and patients with MS into Th17 cells in response to exoantigen (TT) or self-antigen (MOG) presented by autologous B-lymphocytes in co-culture.

а — an example of RORγt expression by CD4⁺T lymphocytes in response to antigens; shown are the results of one of 11 similar experiments in healthy donors and one of 13 in patients with MS; the percentage of RORγt⁺ cells in the population of CD4⁺T lymphocytes is indicated; б — Th17 content in a co-culture of CD4⁺T cells or PBMCs with autologous B lymphocytes loaded with antigens; significance of differences was assessed using the paired Wilcoxon test; values for p<0.05 are presented; в — effects of antigens presented by B-lymphocytes on Th17 differentiation in response to TT and MOG, expressed as the ratio of the percentage of Th17 in a sample with antigen to the percentage of Th17 in the corresponding sample without antigen; significance of differences was assessed using the paired Wilcoxon test; values for p<0.05 are given; г — comparison of the effects of antigens presented by B-lymphocytes on Th17 differentiation, expressed as the ratio of the percentage of Th17 in the sample with antigen to the percentage of Th17 in the corresponding sample without antigen, in healthy donors and patients with MS; significance of differences was assessed using the Mann—Whitney U-test, values for p<0.05 are given

жание Th17 в пробах с В-лимфоцитами, не нагруженными антигеном, сопоставимо с таковым для культуры без В-лимфоцитов — как для здоровых доноров, так и для пациентов с РС (табл. 2).

Аналогичные закономерности в случае использования МПК вместо фракционированных CD4⁺T-лимфоцитов вполне объяснимы, поскольку В-лимфоциты перед внесением в культуру отмывались от несвязавшегося антигена и вклад в презентацию исследуемых антигенов (ТТ и МОГ) моноцитов и В-лимфоцитов, присутствующих в суспензии МПК, исключен.

Анализ эффектов В-зависимой антигенной презентации на дифференцировку Th17, выраженной как отношение процента Th17 клеток в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, показал статистически значимые различия между эффектами облигатного антигена (ТТ) и аутоантигена (МОГ) в обеих исследуемых группах доноров, однако у здоровых доноров эффект ТТ был выше такового для МОГ, тогда как у больных РС, напротив, МОГ-зависимая стимуляция дифференцировки Th17 была статистически значимо выше эффекта облигатного антигена (рис. 1, в). Более того, сопоставление эффектов конкретного антигена в разных группах доноров выявило статистически значимо более высокий эффект МОГ в отношении дифференцировки Th17 у пациентов с РС по сравнению с таковым у здоровых доноров (рис. 1, г).

Вклад В-зависимой презентации антигена в направленную дифференцировку Th17 *in vitro* подтверждается и результатами оценки уровня ИЛ17 в супернатантах клеточных культур: он статистически значимо возрастал в ответ на облигатный антиген (ТТ) у здоровых доноров и в ответ на аутоантиген (МОГ) у пациентов с РС (рис. 2, а). При этом анализ эффектов антигенов в исследуемых группах, выраженный как отношение концентрации ИЛ17 в пробах с антигеном к таковому в соответствующих пробах без антигена, не выявил статистически значимых отличий (рис. 2, б).

В целом, мы показали, что В-лимфоциты способны эффективно презентировать Т-клеткам не только экзо-, но и аутоантигены, стимулируя преимущественную дифференцировку последних в Th17 и сдвигая баланс Th17 / Т-регуляторных клеток. Этот эффект существенно более выражен у пациентов с РС в ответ на МОГ, указывая на вклад В-клеток в продукцию ИЛ17 при РС.

Исследование собственной продукции В-лимфоцитами ИЛ17 при РС. У пациентов с РС и у доноров контрольной группы было определено содержание в периферической крови В-клеток с внутриклеточной экспрессией ИЛ17 (CD19⁺ИЛ17⁺-клеток) *ex vivo*. Показано статистически значимо более высокое содержание ИЛ17-позитивных В-лимфоцитов при РС (рис. 3, а, б), что, наряду с В-зависимой презентацией аутоантигенов, должно вносить вклад в продукцию цитокина при данной патологии. Полученные исследования показывают, что активность продуцентов ИЛ17

Таблица 2.

Содержание Th17 (CD4⁺RORγt⁺-клеток) в пробах без В-лимфоцитов и с В-лимфоцитами, не нагруженными антигеном, у пациентов с РС и здоровых доноров, Me [25-й; 75-й перцентили]

Table 2.

The content of Th17 (CD4⁺RORγt⁺ cells) in samples without B-lymphocytes and with B-lymphocytes not loaded with antigen in patients with MS and healthy donors, Me [25th; 75th percentile]

Группа	Проба без В-лимфоцитов, %	Проба с В-лимфоцитами, не нагруженными антигеном, %	p
Пациенты с РС	1,505 [0,71; 1,99]	1,66 [0,42; 2,21]	0,05
Здоровые доноры	1,26 [0,87; 1,93]	1,27 [0,8; 1,88]	0,05

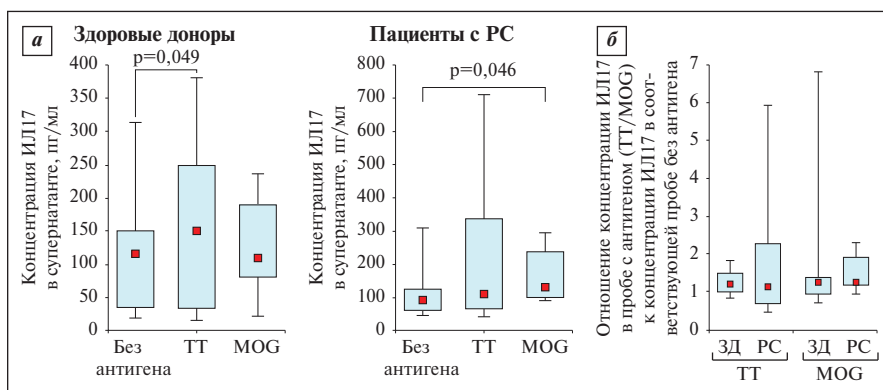


Рис. 2. Продукция ИЛ17 в совместной культуре CD4⁺T-лимфоцитов с аутологичными В-клетками, нагруженными экзоантигеном (ТТ) или аутоантигеном (МОГ), у здоровых доноров и пациентов с РС.

а — уровень ИЛ17 в супернатантах клеточной культуры, пг/мл; значимость различий оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона; представлены значения для $p < 0,05$; **б** — сопоставление эффектов антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении продукции ИЛ17, определяемые как отношение уровня ИЛ17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена; значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, представлены значения $p < 0,05$; ЗД — здоровые доноры; РС — пациенты с РС

Fig. 2. Production of IL-17 in a co-culture of CD4⁺T lymphocytes with autologous B cells loaded with exoantigen (TT) or autoantigen (MOG) from healthy donors and patients with MS.

а — level of IL-17 in cell culture supernatants, pg/ml; significance of differences was determined by paired Wilcoxon test; values for $p < 0.05$ are presented; **б** — comparison of the effects of antigens presented by B-lymphocytes in relation to the production of IL-17, defined as the ratio of the level of IL-17 in the sample with antigen to that in the corresponding sample without antigen; the significance of the differences was assessed using the Mann–Whitney U-test; the values for $p < 0.05$ are given

в пробах с облигатным антигеном выше, чем в пробах без антигена, у обеих исследуемых групп, но только у пациентов с РС их активность также высока в пробе с аутоантигеном.

Обсуждение. Проведенные исследования показали, что В-лимфоциты пациентов с РС способны презентировать антигены (в том числе аутоантигены) аутологичным Т-лимфоцитам в совместной культуре и индуцировать формирование Th17 более эффективно, чем В-клетки здоровых доноров. Кроме того, впервые выявлена собственная продукция В-лимфоцитами ИЛ17 при РС. Полученные данные свидетельствуют о существовании нового, ранее неизвестного механизма участия В-лимфоцитов в развитии РС, связанного с прямой или опосредованной активацией синтеза провоспалительного цитокина ИЛ17, и позволяют отчасти объяснить снижение продукции данного цитокина в случае терапии, направленной на истощение В-клеточной популяции [12].

Согласно некоторым данным литературы, презентация антигена В-клетками может вызывать анергию Т-лимфоцитов, распознающих соответствующий антигенный пептид [13], или их дифференцировку в регуляторные Т-клетки [14]. Однако эти эффекты не объясняют неоднократно показанную отрицательную роль В-лимфоцитов в развитии РС [8, 9], которая не связана с продукцией аутоантител и обеспечивается альтернативными функциями В-клеток, в первую очередь — антигенпрезентирующей [15, 16]. Кроме того, недавние исследования развития ЕАЕ продемонстрировали способность инфильтрирующих ЦНС В-лимфоцитов индуцировать преимущественное развитие провоспалительных субпопуляций Т-хелперов — Th1 и Th17 [17]. В-зависимая дифференцировка Th17, продемонстрированная в нашем исследовании в ответ на

ключевой аутоантиген, связанный с РС, показывает, что данные процессы имеют место и у человека в условиях соответствующей патологии.

Способность В-лимфоцитов продуцировать ИЛ17 также была выявлена ранее в ряде работ — в ответ на внеклеточный патоген *Trypanosoma cruzi in vivo* и на его транссиа-лидазу *in vitro* [10], а также на прямую стимуляцию Toll-подобных рецепторов на В-клеточной мембране [11]. При этом было показано, что ROR γ t не участвует в реализации этого эффекта в ответ на инфекцию, как это происходит в классических продуцентах ИЛ17 — клетках Th17 [10]. Мы расширили спектр ситуаций, при которых В-лимфоциты могут продуцировать ИЛ17, дополнив его аутоиммунными патологиями, в частности, РС.

Следует отметить, что антигенпрезентирующая активность В-лимфоцитов невысока: по способности инициировать эффективный Т-клеточный ответ они существенно уступают «профессиональным» презентерам антигенов — дендритным клеткам и макрофагам. Связано это, в частности, с тем, что у В-лимфоцитов ниже экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости, необходимых для презентации антигена, и костимулирующих молекул, таких как CD80/CD86, обеспечивающих адекватную активацию Т-лимфоцита. С продукцией В-лимфоцитами цитокинов ситуация аналогична: эта функция не является главной для В-клеток, по уровню продукции цитокинов эти клетки несопоставимы с их «профессиональными» продуцентами — Т-хелперами, в том числе с клетками Th17. Тем не менее, обсуждая последствия выявленных эффектов В-лимфоцитов, важно учитывать их возможную локализацию. Известно, что РС сопровождается интенсивной инфильтрацией ЦНС В-лимфоцитами, более того,

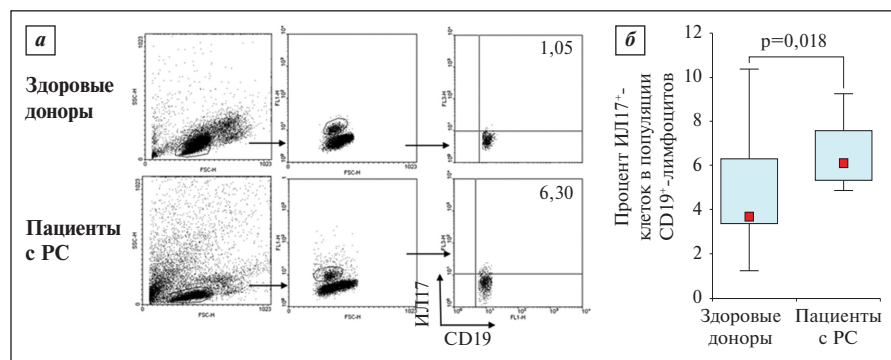


Рис. 3. В-лимфоциты как продуценты ИЛ17 при РС.

a — пример экспрессии ИЛ17 В-лимфоцитами (CD19⁺-клетками) периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров *ex vivo*; представлены результаты одного из пяти аналогичных экспериментов для здоровых доноров и одного из шести для пациентов с РС; показан процент клеток, несущих ИЛ17, в популяции CD19⁺-клеток; *б* — содержание ИЛ17⁺ В-лимфоцитов в крови пациентов с РС и здоровых доноров; значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни, представлены значения $p < 0,05$

Fig. 3. B-lymphocytes as IL-17 producers in multiple sclerosis.

a — an example of IL-17 expression by B-lymphocytes (CD19⁺ cells) in the peripheral blood of patients with MS and healthy donors *ex vivo*; the results of one of 5 similar experiments for healthy donors and one of 6 for patients with MS are shown; the percentage of cells expressing IL-17 in the population of CD19⁺ cells is shown; *б* — the level of IL-17⁺ B-lymphocytes in the blood of patients with MS and healthy donors; the significance differences was determined by Mann—Whitney U-test, $p < 0.05$ values are shown

В-клетки формируют в мозге фолликулы, аналогичные таковым в лимфатических узлах и селезенке, и участвуют в презентации аутоантигенов Т-лимфоцитам [8, 9]. И в этих условиях показанная нами способность В-лимфоцитов вызывать в ходе презентации аутоантигена Т-лимфоцитам преимущественное развитие клеток Th17, а также самостоятельно продуцировать ИЛ17 должна вносить вклад в нейровоспаление и может быть новым механизмом развития заболевания. В подтверждение этого у пациентов с вторичным прогрессирующим РС выявлена экспрессия ROR γ t в менингеальных В-клеточных фолликулах, причем не только в CD3-позитивных клетках (Т-лимфоцитах), но и в CD3-негативных (возможно, В-клетках) [18].

Заключение. Проведенные исследования показали, что В-лимфоциты могут вносить вклад в продукцию ИЛ17 при РС двумя путями — за счет индукции дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих данный цитокин, и за счет собственного синтеза ИЛ17.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011 Jul;74(1):1-13. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x
- Chen G, Shannon M. Transcription factors and Th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Crit Rev Immunol*. 2013;33(2):165-82. doi: 10.1615/critrevimmunol.2013006959.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):566-73. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.566
- Saitoh K, Kon S, Nakatsuru T, et al. Anti-IL-17A blocking antibody reduces cyclosporin A-induced relapse in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Biochem Biophys Res*. 2016 Aug 26;8:139-45. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.08.021
- Matusiewicz D, Kivisäkk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999 Apr;5(2):101-4. doi: 10.1177/135245859900500206
- Li YF, Zhang SX, Ma XW, et al. Levels of peripheral Th17 cells and serum Th17-related cytokines in patients with multiple sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 Nov;18:20-5. doi: 10.1016/j.msard.2017.09.003. Epub 2017 Sep 13.
- Havrdova E, Belova A, Goloborodko A, et al. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol*. 2016 Jul;263(7):1287-95. doi: 10.1007/s00415-016-8128-x. Epub 2016 May 3.
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, et al; HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):676-88. doi: 10.1056/NEJMoa0706383
- 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 Apr;130(Pt 4):1089-104. doi: 10.1093/brain/awm038
- Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORγt and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol*. 2013 May;14(5):514-22. doi: 10.1038/ni.2569. Epub 2013 Apr 7.
- Agrawal S, Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol*. 2011 Feb;31(1):89-98. doi: 10.1007/s10875-010-9456-8. Epub 2010 Sep 7. Erratum in: *J Clin Immunol*. 2011 Feb;31(1):136.
- Monson NL, Cravens P, Hussain R, et al. Rituximab therapy reduces organ-specific T cell responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17103. doi: 10.1371/journal.pone.0017103
- Dalai SK, Mirshahidi S, Morrot A, et al. Anergy in memory CD4+ T cells is induced by B cells. *J Immunol*. 2008 Sep 1;181(5):3221-31. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3221
- 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 Jul 28;118(4):984-91. doi: 10.1182/blood-2011-02-336115. Epub 2011 Jun 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 Jan 25;356(4):371-8. doi: 10.1056/NEJMoa063602
- Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol*. 2009 Jan 15;182(2):890-901. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.890
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM. B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192(3):929-39. doi: 10.4049/jimmunol.1302171. Epub 2013 Dec 23.
- Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, et al. RORγt Expression and Lymphoid Neogenesis in the Brain of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016 Sep;75(9):877-88. doi: 10.1093/jnen/nlw063. Epub 2016 Jul 13.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

29.03.2023/30.06.2023/01.07.2023

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Сурсякова Н.В. <https://orcid.org/0000-0001-8876-4379>

Куклина Е.М. <https://orcid.org/0000-0002-2173-2724>

Байдина Т.В. <https://orcid.org/0000-0002-5114-0463>

Некрасова И.В. <https://orcid.org/0000-0002-6706-5912>

Трушников Т.Н. <https://orcid.org/0000-0001-9199-7392>