

IgM- И IgA-ОТВЕТ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ В1-КЛЕТОК НА Т-НЕЗАВИСИМЫЙ АНТИГЕН ВТОРОГО РОДА В ПРИСУТСТВИИ $\gamma\delta$ T-КЛЕТОК *IN VITRO*

Снегирева Н.А.¹, Сидорова Е.В.¹, Дьяков И.Н.¹, Гаврилова М.В.¹,
Чернышова И.Н.¹, Пашков Е.П.², Свитиш О.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. IgA является важным компонентом мукозальной системы организма, поскольку ограничивает поступление патогенов в кровоток. С нарушениями в синтезе IgA могут быть связаны такие воспалительные заболевания кишечника, как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит. В кишечнике источником IgA являются как В1-клетки, так и В2-клетки. Особое внимание уделяется В1-клеткам, благодаря их способности отвечать преимущественно на Т-независимые антигены второго типа и вырабатывать естественные антитела. В1-клетками образуется около 50% всех IgA в кишечнике, в числе которых есть и специфические антитела к компонентам микроорганизмов, содержащихся на слизистых в желудочно-кишечном тракте. Механизм образования IgA Т-независимым способом исследован не достаточно полно. Имеется предположение, что помощь в переключении на синтез IgA могут оказывать $\gamma\delta$ T-клетки. В пользу этого предположения может свидетельствовать совместная локализация с В1-лимфоцитами в слизистой оболочке кишечника и участие наравне с В1-клетками в формировании первой линии защиты от патогенов. Кроме того, обе эти субпопуляции лимфоцитов появляются в онтогенезе первыми, раньше «классических» В2- и $\alpha\beta$ T-клеток. Исходя из этого, было сделано предположение, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты могут быть вовлечены в процессы индукции и/или регуляции образования IgM и IgA В1-клетками при ответе на ТН2-антигены.

В настоящей работе было проведено исследование воздействия $\gamma\delta$ T-клеток на образование В1-лимфоцитами IgA- и IgM-продуцентов *in vitro* в ответ на $\alpha(1,3)$ -декстран. Также было проведено исследование динамики экспрессии мРНК тяжелых цепей IgM и IgA В1-клетками в культурах в разные сроки после помещения в систему *in vitro*.

В ходе исследования было получено, что при совместном культивировании В1-клеток с 20% $\gamma\delta$ T-лимфоцитов не происходит увеличения числа специфичных к декстрану IgM-продуцентов. Экспрессия мРНК тяжелой цепи IgM в совместной культуре в ответ на декстран также была сниженной, по сравнению с ответом чистой культуры В1-клеток. Вопреки ранее сделанному предположению, присутствие $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в культуре не увеличивало образование IgA-продуцентов. Полученные данные свидетельствуют о проявлении регуляторных свойств $\gamma\delta$ T-лимфоцитов при ответе В1-клеток на Т-независимые антигены.

Ключевые слова: IgM, IgA, В1-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки, Т-независимый антиген 2-го типа, кишечник, декстран

Адрес для переписки:

Снегирева Надежда Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт имени
И.И. Мечникова», Москва, Россия
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (964) 590-73-53.
E-mail: snegireva.nadezda@gmail.com

Address for correspondence:

Snegireva Nadezda A.
105064, Russian Federation, Moscow,
Malyy Kazenny lane, 5a.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
Phone: 7 (964) 590-73-53.
E-mail: snegireva.nadezda@gmail.com

Образец цитирования:

Н.А. Снегирева, Е.В. Сидорова, И.Н. Дьяков,
М.В. Гаврилова, И.Н. Чернышова, Е.П. Пашков,
О.А. Свитиш «IgM- и IgA-ответ перитонеальных
В1-клеток на Т-независимый антиген второго рода
в присутствии $\gamma\delta$ T-клеток *in vitro*» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 245-256.
doi: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

© Снегирева Н.А. и соавт., 2021

For citation:

N.A. Snegireva, E.V. Sidorova, I.N. Dyakov, M.V. Gavrilova,
I.N. Chernishova, E.P. Pashkov, O.A. Svitich "IgM- and
IgA-response of peritoneal B1 cells to the TI-2 antigen
with *in vitro* presence of $\gamma\delta$ T cells", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 2,
pp. 245-256. doi: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

DOI: 10.15789/1563-0625-IAI-2157

IgM- AND IgA-RESPONSE OF PERITONEAL B1 CELLS TO THE TI-2 ANTIGEN WITH *IN VITRO* PRESENCE OF $\gamma\delta$ T CELLS

Snegireva N.A.^a, Sidorova E.V.^a, Dyakov I.N.^a, Gavrilova M.V.^a, Chernishova I.N.^a, Pashkov E.P.^b, Svitich O.A.^{a, b}

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. IgA is an important component of the mucosal system of the body. It limits penetration of pathogens into the bloodstream. Inflammatory diseases such as Crohn disease and colitis may be associated with disorders of IgA synthesis. Both B1 and B2 cells are a source of IgA in the intestines. Special attention is paid to B1 cells, which are able to respond to T-independent type 2 antigens and produce natural antibodies. B1 cells produce about 50% of the intestinal IgA including specific antibodies to the components of microorganisms contained in the gastrointestinal tract. The mechanism of IgA formation in the T-independent way is not investigated in details. It was suggested that the $\gamma\delta$ T-cells promote switching to IgA synthesis by B1 cells. This assumption may be supported by their co-localization with B1 lymphocytes in the intestinal mucosa, as well as participation, along with B1 cells, in formation of the first-line defense against the pathogens. In addition, the both lymphocyte subpopulations evolve during initial ontogenesis, earlier than "classic" B2 and $\alpha\beta$ T cells. Therefore, it was suggested that $\gamma\delta$ T lymphocytes may be involved into the processes of induction and/or regulation of IgM and IgA production by B1 cells in response to TH2 antigens.

In the present study, we have shown the effect of $\gamma\delta$ T cells upon generation of IgM- and IgA-forming B1 cells in response to α -1,3-dextran *in vitro*. We also studied the dynamics of the mRNA expression for IgM- and IgA-heavy chains by the B1 cells at different terms of *in vitro* culture.

It was found that, during co-cultivation of B1 cells with 20% $\gamma\delta$ T lymphocytes, there is no increase in the number of dextran-specific IgM-producing cells. The B1 cells exhibited an increase of IgM heavy chain mRNA expression in response to dextran but not in co-cultures. Expression of mRNA for IgM heavy chains in co-cultures was decreased compared to non-treated B-cell cultures. Contrary to the earlier assumption, a presence of $\gamma\delta$ T lymphocytes in culture did not enhance the formation of IgA producers. The obtained data suggest regulatory properties of the $\gamma\delta$ T lymphocytes during the B1 cells response to T-independent antigens.

Keywords: IgM, IgA, B1 cells, $\gamma\delta$ T cells, TI-2 antigen, intestine, dextran

Введение

Мукозальная система кишечника является важным компонентом иммунной системы организма. Факторы врожденного иммунитета, находящиеся в слизистой оболочке кишечника, обеспечивают баланс с микрофлорой. Кроме того, слизистая оболочка является барьером, который защищает организм от потенциально вредных пищевых антигенов и патогенных микробов [9]. В слизистой кишечника локализовано большое число иммунных факторов, выполняющих защитные функции.

Микрофлора кишечника представлена разнообразными микроорганизмами. Компоненты микробов являются антигенами различной природы, значительная часть которых имеет небелковую Т-независимую природу. Они, в свою очередь, подразделяются на антигены первого и второго рода (TH1 и TH2) [28]. Для TH2-антигенов характерно наличие множества одинаковых регулярно расположенных антигенных детерминант. Связывание с В-клеточными рецепторами обуславливает их кластеризацию и приводит к

индукции сигнала, достаточного для инициации ответа В-клетки в отсутствие «второго» сигнала от Т-лимфоцитов. На TH2-антигены отвечают преимущественно клетки минорной субпопуляции В1-лимфоцитов. К TH2-антигенам относятся бактериальные полисахариды, полимеризованный флагеллин, а также синтетические антигены — поливинилпирролидон, полипептиды, состоящие из D-аминокислот, конъюгаты гаптенных с Т-независимыми носителями и др. Таким образом, TH2-антигены являются важным компонентом окружающей среды, и в организме сформировалась система взаимодействия с такими антигенами и микроорганизмами, являющимися их источниками.

К компонентам иммунной системы, отвечающим за взаимодействие с микрофлорой, относится IgA слизистого секрета кишечника, участвующий в регуляции состава кишечной микрофлоры [30]. Принято считать, что IgA является основным иммуноглобулином в слизистых секретах и вырабатывается как В2-, так и В1-клетками. В2-лимфоциты локализуются в лимфоидной ткани кишечника в основном в Пейе-

ровых бляшках, а В1 — преимущественно в *lamina propria* [34]. В2-клетки отвечают на Т-зависимые антигены (ТЗ) белковой природы и для переключения классов продуцируемых иммуноглобулинов им нужна «помощь» Т-клеток. В1-клетки отвечают преимущественно на ТН2-АГ и, как было отмечено выше, помощь «классических» Т-хелперов при этом не вовлекается.

Первым изотипом антител, продуцируемых В-лимфоцитом, является IgM. Известно, что в «классическом» варианте В2-лимфоцитам для смены изотипа антител с IgM на любой другой изотип требуется помощь Т-хелперных клеток. Как было отмечено выше, В1-лимфоциты не способны привлекать «классическую» Т-клеточную помощь при ответе на Т-независимые антигены. В то же время В1-лимфоциты продуцируют значительную часть IgA в кишечнике [15], что свидетельствует о том, что переключение изотипа иммуноглобулина в них происходит даже в отсутствие помощи от Т-хелперов.

В настоящее время способность В1-клеток переключаться на синтез IgA Т-независимым путем уже не подвергается сомнению, однако не выяснены механизмы, вовлеченные в этот процесс. В исследовании Macpherson A.J. и соавт. (2000) отмечается, что присутствие бактериальной микрофлоры в кишечнике является необходимым условием для последующей индукции синтеза секреторного IgA [25]. Тем не менее работы по изучению продукции IgA В1-клетками при добавлении ТН2-антигенов *in vitro* в литературе практически не встречаются. Известен ряд факторов, способствующих синтезу IgA В1-клетками [27]. В работе Genestier (2007) показано, что различные TLR-лиганды могут индуцировать продукцию IgA в В1-клетках *in vitro* [22]. Известно также, что некоторые цитокины (TGF- β , IL-5, IL-15 и BAFF и др.) могут способствовать переключению на IgA. Помимо гуморальных факторов, на продукцию IgA может влиять и ряд клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки и др. Участие Т-хелперов при этом остается незначительным [27]. Так, известно, что образование IgA происходит и у мышей, имеющих дефицит Т-лимфоцитов, у CD40^{-/-} или CD28^{-/-} мышей (т.е. не имеющих важных костимулирующих молекул, участвующих в индукции Т-зависимого иммунного ответа) и т.д. [21]. В работе Fagarasan S. (2001) показано, что культивирование IgM⁺ В-клеток вместе со стромальными клетками слизистой оболочки кишечника преимущественно усиливает дифференцировку В-лимфоцитов в IgA⁺-плазматические клетки [18]. Также было выдвинуто предположение, что на синтез IgA В1-клетками могут влиять и другие компоненты мукозальной иммунной системы [27], в частности — субпопуляция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [22, 41].

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты локализуются преимущественно в коже и слизистых оболочках [29]. Они проявляют различные биологические эффекты: могут проявлять цитотоксичность, участвуют в иммунорегуляции, презентации антигенов и репарации поврежденных тканей и органов [7]. Особенности происхождения и полиморфность свойств этих клеток обуславливают их способность участвовать в процессах как врожденного, так и адаптивного иммунитета. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, вероятно, могут влиять и на синтез иммуноглобулинов. В пользу этого предположения может свидетельствовать совместная локализация с В1-лимфоцитами в слизистой оболочке кишечника и участие наравне с В1-клетками в формировании первой линии защиты от патогенов. Кроме того, обе эти субпопуляции лимфоцитов появляются в онтогенезе первыми, раньше «классических» В2- и $\alpha\beta$ Т-клеток. Исходя из этого, было сделано предположение, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут быть вовлечены в процессы индукции и/или регуляции образования IgM и IgA В1-клетками при ответе на ТН2-антигены [16].

Изучение роли $\gamma\delta$ Т-клеток в продукции IgM и IgA В1-лимфоцитами в слизистой кишечника является важной и весьма актуальной задачей в области фундаментальной иммунологии. Исходя из этого, целью представленной работы было изучение образования IgM и IgA В1-клетками в присутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и ТН2-антигена.

Материалы и методы

Животные

В работе использовали мышей линии СВА, самок, массой 18–20 г. Мыши получены из питомника «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Работа с животными проводилась согласно рекомендациям в ГОСТ 33215-2014 [5].

Антиген и индукция иммунного ответа

В качестве ТН2-антигена для индукции иммунного ответа в В1-лимфоцитах использовали $\alpha(1,3)$ -декстран *Leuconostoc mesenteroides* (Декс) (Sigma, США) в конечной концентрации 10 нг/мл в культуре клеток.

In vitro клетки культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах (Nunc, США) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в среде RPMI 1640 с добавлением 10% «HI FBS», 2% антибиотиков «PenStrep», 0,02 М HEPES (Gibco, США), 5 × 10⁻⁷ М 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), 0,003 М L-глутамина (Gibco, США), 0,001 М пирувата натрия (Gibco, США).

Выделение В1-лимфоцитов

В1-клетки выделяли у мышей СВА из перитонеальной полости. Полный протокол выделения представлен в статье [2]. Для получения В-лимфоцитов клетки инкубировали с магнитными бусами, покрытыми антителами крысы к

CD19 мыши “CD19 MicroBeads, mouse” (Miltenyi, Германия), в течение 15 мин при 4 °С. Смесь перитонеальных В1- и В2-клеток выделяли на магнитной MS колонке “MS Column” (Miltenyi, Германия). Затем методом негативной иммуномгнитной сепарации удаляли В2-популяцию, последовательно инкубируя перитонеальные В-клетки вначале с биотинилированными антителами к CD23 мыши “Biotin Rat Anti-Mouse CD23” (BD Biosciences, США) (20 мин при 4 °С), а затем с магнитными бусами “Biotin Binder Dynabeads” (Invitrogen, США) (30 мин при +4 °С на ротаторе “Multi Bio RS-24” (Biosan, Латвия)). В результате выделения получали суспензию В1-клеток с чистотой более 95%.

Выделение $\gamma\delta$ T-лимфоцитов

Выделение $\gamma\delta$ T-лимфоцитов проводилось с помощью модифицированного метода [38]. Кишечник измельчали и промывали в среде RPMI 1640 с 8% “HI FBS” (Gibco, США) без антибиотиков. Для выделения лимфоцитов промытые фрагменты кишечника инкубировали на горизонтальном шейкере в среде RPMI 1640 содержащую 8% ЭТС “HI FBS”, 1 mM ЭДТА (Calbiochem, США), 1 mM дитиотрейтола (ДТТ) (Sigma, США), и 2% антибиотиков “PenStrep” (GIBCO, США) предварительно прогретой в термостате до +37 °С. Состав сред подробно описан в публикации [38]. Полученную суспензию фильтровали для удаления остатков кишечника и клеточных агломератов и осаждали центрифугированием.

Из полученной суспензии лимфоцитов слизистой оболочки кишечника мыши выделяли $\gamma\delta$ T-клетки методом иммуномагнитной сепарации с использованием “TCR γ/δ T cell Isolation Kit” (Miltenyi, Германия). Полученные $\gamma\delta$ T-клетки переводили в полную среду для культивирования *in vitro* и инкубировали согласно схеме опыта. Из кишечника 3 мышей удавалось получить $1,0 \pm 0,2$ млн $\gamma\delta$ T-клеток с чистотой 90-92%.

Клеточный иммуноферментный анализ ELISPOT

ELISPOT проводили в планшетах с подложкой из нитроцеллюлозы Elispot MultiScreen (Merck, США). Для определения числа иммуноглобулинобразующих клеток (ИГОК) на нитроцеллюлозу сенсibilизировали антитела козы против IgM, IgA и IgG мыши “Goat Anti-Mouse IgG, IgA, IgM [H+L]” (Invitrogen, США). Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) к Декс фильтры сенсibilозировали Декс в концентрации 10 нг/мл в течение 2 ч при +37 °С, затем 12 ч при +20 °С. После сенсibilизации фильтры отмывали ФСБ и с помощью 1% БСА блокировали сайты неспецифической сорбции на мембране. Клетки культивировали на фильтрах 12-18 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС “HI FBS”.

Для определения числа АОК в лунку планшета вносили $100-200 \times 10^3$ клеток в 100 мкл среды, для определения ИГОК — $5-50 \times 10^3$ клеток в лунку. По окончании инкубации клетки удаляли. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли с использованием иммуноферментного анализа, поэтапно добавляя биотинилированные антитела к IgM “Goat Anti-Mouse IgM” или IgA мыши “Goat Anti-Mouse IgA” (Invitrogen, США), конъюгат Streptavidin HRP “AbD” (Bio-Rad, США) и субстратный буфер, содержащий 1,4-хлорнафтол и перекись водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой. После высыхания фильтров подсчитывали число окрашенных точек — «спотов» (каждая точка соответствует клетке). Полученный результат пересчитывали на 10^6 клеток.

Оценка экспрессии генов IgM и IgA в В1-лимфоцитах

Для оценки экспрессии генов IgM и IgA в В1-лимфоцитах, из клеток выделяли общую РНК на сроки: 0 ч, 1 ч, 1-е, 4-е и 7-е сут. Экстракция РНК из клеток проводилась с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот «АмплиСенс РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ). Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) в работе использовался набор «ОТ-1» (Синтол, РФ). Реакция проводилась по протоколу, представленному в инструкции к набору. Для постановки ПЦР-РВ применяли метод с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I и использованием «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Реакция проводилась согласно протоколу, приложенному к набору. Образцы супернатантов, полученные *in vitro* были исследованы на наличие мРНК константных областей иммуноглобулинов IgA и IgM. Данные о последовательностях праймеров для детекции экспрессируемых генов константных областей тяжелых цепей IgA (Ig α C region-1, sense primer GTCTGCGAGAAATCCCACCA, antisense primer CATCTGAACCCAGGAGCAGG) и IgM мыши (Ig μ C region. sense primer CCTGGCAACCTATGAAAC, antisense primer GGATGCTGTGGGTAAAGT) взяты из статьи [35]. Уровень экспрессии генов иммуноглобулинов IgM и IgA указаны в количестве копий на 10^6 клеток.

Статистическая обработка данных

Для обработки результатов применяли непараметрический метод анализа с использованием критерия Манна—Уитни. Все графики и расчеты выполняли с использованием программ GraphPad Prism 6 и Microsoft Office Excel. Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$. Данные представлены в форме медиан и 5-95 перцентилей.

Результаты

Образование IgM- и IgA-продуцирующих В1-лимфоцитов при совместной инкубации с $\gamma\delta$ Т-клетками

Первой задачей была отработка системы *in vitro* для совместного культивирования В1- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Из литературных данных известно, что в слизистой оболочке кишечника $\gamma\delta$ -TCR экспрессируют ≈ 20 -40% всех Т-лимфоцитов [14], в зависимости от линии мышей. Ранее было установлено, что $\gamma\delta$ Т-клетки мышей линии СВА составляют около 10%, а В1-клетки — около 5% всех лимфоцитов, выделяемых из тонкого кишечника [38].

В1-лимфоциты способны отвечать на ТН2-антигены без «классической» помощи Т-хелперных клеток. Условия экспериментов были подобраны так, чтобы обеспечить взаимодействие выделенных субпопуляций В1- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. В эксперименте оценивали следующие группы сравнения: интактные В1-лимфоциты (В1), В1-лимфоциты с добавлением 10 нг/мл Декс (В1 + Декс), смесь В1- и $\gamma\delta$ Т-клеток (В1 + $\gamma\delta$ Т), смесь В1 с $\gamma\delta$ Т-клетками с добавлением 10 нг/мл Декс (В1 + $\gamma\delta$ Т + Декс). Число ИГОК и АОК определяли на 4-е и 7-е сутки [8].

Предшественниками IgA-продуцентов в кишечнике являются преимущественно В1-клетки. Основным местом локализации В1-лимфоцитов, помимо слизистых оболочек, являются серозные полости, в том числе брюшная полость [17], где они составляют около 40% от лимфоцитов [11]. В связи с этим в качестве источника В1-лимфоцитов для оценки влияния $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на синтез IgA использовали клетки брюшной полости. Для инкубации *in vitro* использовали соотношения $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток 1:10 и 1:5. Сравнивали количество АОК и ИГОК, образованных В1-клетками в монокультуре при добавлении Декс с числом АОК и ИГОК, образованных В1-клетками в ответ на Декс при совместной инкубации с $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами. На первом этапе работы число IgM- и IgA-АОК и ИГОК оценивали на 4-е сутки, $\gamma\delta$ Т- и В1-клетки инкубировали в соотношении 1:10 (рис. 1).

При внесении ТН2-антигена Декс в культуру число IgM-АОК увеличивалось в 2 раза по сравнению с интактными В1-клетками. При этом достоверного возрастания числа IgM-ИГОК не происходило (рис. 1А). IgA-продуцентов на 4-е сутки выявлялось на порядок меньше, чем IgM-ИГОК. Добавление Декс к В1-лимфоцитам не приводило к достоверному изменению числа клеток, продуцирующих IgA *in vitro* (рис. 1В). IgA-АОК, специфичных к Декс на 4-е сутки выявлено не было.

Совместное культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток с В1-клетками в соотношении 1:10, а также до-

бавление к смеси Декс также не приводило к достоверным изменениям числа IgM-АОК и IgM- и IgA-ИГОК (рис. 1). По-видимому, $\gamma\delta$ Т-клетки в нашем эксперименте не оказывали влияния на продукцию неспецифических антител, но были способны угнетать образование антител, специфичных к Декс.

Поскольку влияния $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на образование АОК и ИГОК В1-клетками при совместной инкубации в соотношении 1:10 выявлено не было, а соотношение $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток в норме [14] превышает использованное в эксперименте, была предпринята попытка увеличить количество $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в культуре в рамках, которые позволяла методика их выделения, т.е. в 2 раза. Последующие эксперименты проводили, смешивая $\gamma\delta$ Т- и В1-лимфоциты в соотношении 1:5.

Совместная инкубация $\gamma\delta$ Т- и В1-клеток с Декс в соотношении 1:5 не приводила к увеличению числа IgM-АОК. Более того, число IgM-АОК в этой группе было достоверно ниже числа IgM-АОК в группе В1-клеток с Декс. Такие данные могут указывать на угнетающее действие $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на специфический ответ В1-лимфоцитов на Декс (рис. 2).

Добавление к В1-лимфоцитам как $\gamma\delta$ Т, так и Декс не изменяло индукцию IgA-ИГОК в сравнении с интактными В1-клетками (рис. 2). IgA-АОК при этом ни в одной группе выявлено не было. По-видимому, добавление Декс *in vitro* не приводит к увеличению уровня IgA-продуцентов среди В1-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты не влияют на образование IgA В1-лимфоцитами.

Таким образом, на 4-е сутки различного влияния $\gamma\delta$ Т-клеток на продукцию IgA в ответ на ТН2-антиген Декс выявлено не было. Предположили, что для выявления IgA необходима более длительная совместная инкубация. Оценивали те же показатели на более поздние сроки. Результаты совместной культивации клеток двух субпопуляций в течение 7 суток в соотношении 1:5 представлены на рисунке 3.

На 7-е сутки инкубации В1-клеток с Декс выявлено увеличение в 2 раза как IgM-АОК так и IgM-ИГОК (рис. 3). При совместном культивировании В1-и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов с Декс выявленное число специфичных IgM-АОК было в 2,5 раза больше, чем в культуре В1 и $\gamma\delta$ Т без антигена, но достоверно не отличалось от числа IgM-АОК в культуре В1-клеток с Декс. Такие данные могут указывать, что $\gamma\delta$ Т-клетки к 7 суткам перестают оказывать влияние на специфический IgM ответ В1-клеток на Декс.

По результатам экспериментов можно сделать вывод о супрессирующем влиянии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на специфический IgM-ответ на ТН2-антиген на 4-е сутки. Поскольку IgA-ИГОК

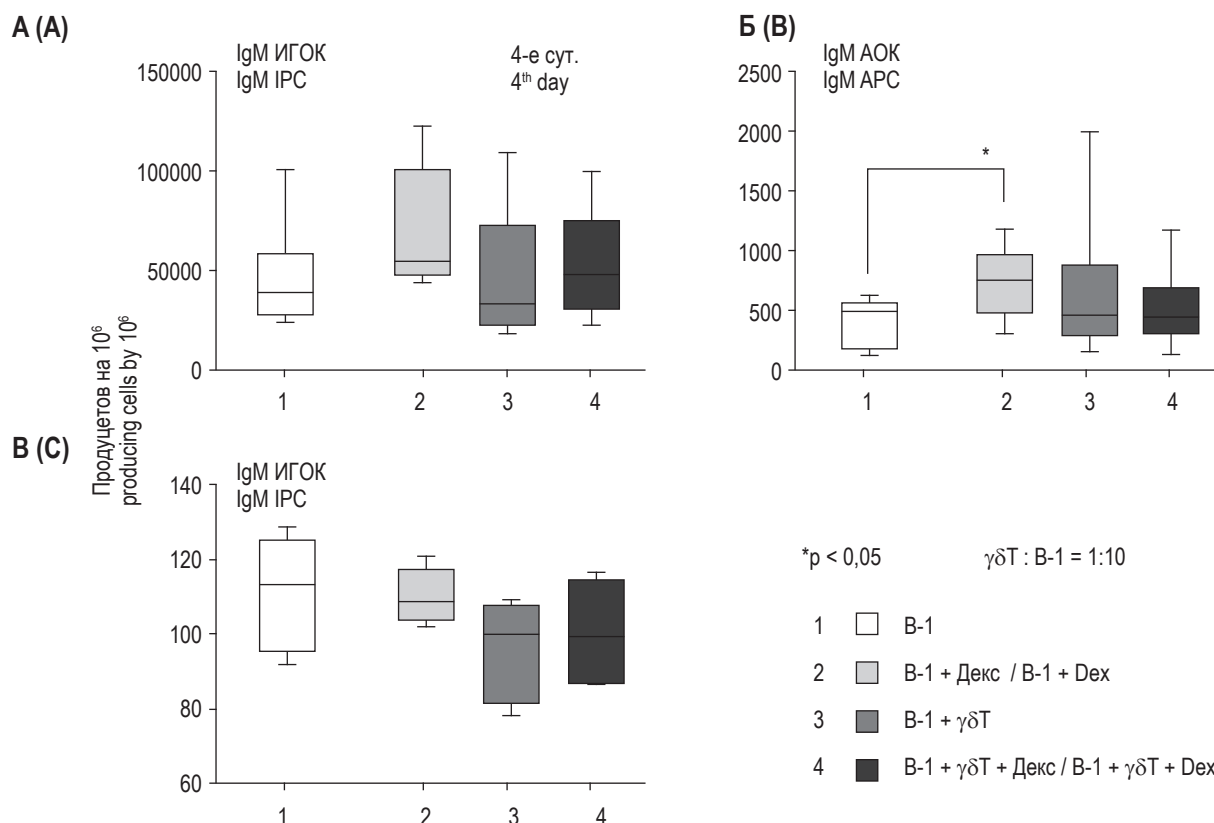


Рисунок 1. Количество Ig-продуцентов на 4-е сутки после инкубации γδT- и B1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 10

Figure 1. The number of Ig-producing cells after co-incubation of γδT and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 10, 4th day

и IgA-АОК на 7-е сутки выявлено не было, можно заключить, что в условиях нашего эксперимента взаимодействие с γδT-клетками не приводило к увеличению продукции IgA B1-лимфоцитами. Тем не менее отсутствие секретируемых молекул может свидетельствовать как об отсутствии их индукции, так и о нарушении трансляции и экспрессии/секреции. В связи с этим на следующем этапе работы был оценен уровень экспрессии генов тяжелых цепей IgM и IgA.

Динамика экспрессии генов тяжелой цепи IgM и IgA в B1-клетках в присутствии TH2-антигена и/или γδT-клеток

Поскольку результаты полученные методом ELISPOT не являются достаточными для оценки генерации IgA-продуцентов, было решено использовать для этой цели молекулярный метод исследования ПЦР-РВ. Преимуществом такого анализа является возможность выявить синтезируемые, но не секретируемые иммуноглобулины.

Клетки γδT- и B1-инкубировали *in vitro* в соотношении 1:5 с добавлением и без добавления Декс. Полученные данные по экспрессии гена тяжелой цепи IgM приведены на рисунке 4.

В течение первых суток во всех группах клеток изменений в экспрессии IgM не выявилось. На 4-е сутки при добавлении к B1-клеткам Декс

происходило достоверное увеличение экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM, что соответствует описанным выше результатам, полученным методом ELISPOT. К 7-му дню уровень экспрессии мРНК IgM увеличился в 4,6 раза в интактных B1-клетках, в 5,7 раза в B1-клетках при добавлении Декс.

При совместной инкубации B1- и γδT-клеток, как с Декс, так и без него динамика экспрессии мРНК IgM была аналогичной динамике в интактных B1-лимфоцитах. Добавление Декс к смеси B1- и γδT-клеток не приводило к усилению экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM на 4-е сутки и на 7-е сутки. Такие данные могут указывать на супрессирующее действие γδT-лимфоцитов, которое задерживает развитие ответа B1-клеток при контакте с Декс *in vitro*.

Результаты оценки экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA в динамике указывают на ее усиление к 4-м суткам во всех группах. На 7-е сутки значения выходили на плато (рис. 5). В культуре B1+Декс экспрессия мРНК тяжелой цепи IgA была выше, чем в остальных группах. На 7-е сутки различий в экспрессии IgA в исследуемых культурах клеток уже не выявлялось.

Экспрессия мРНК тяжелой цепи IgA была выявлена у интактных B1-клеток и в смеси γδT- и

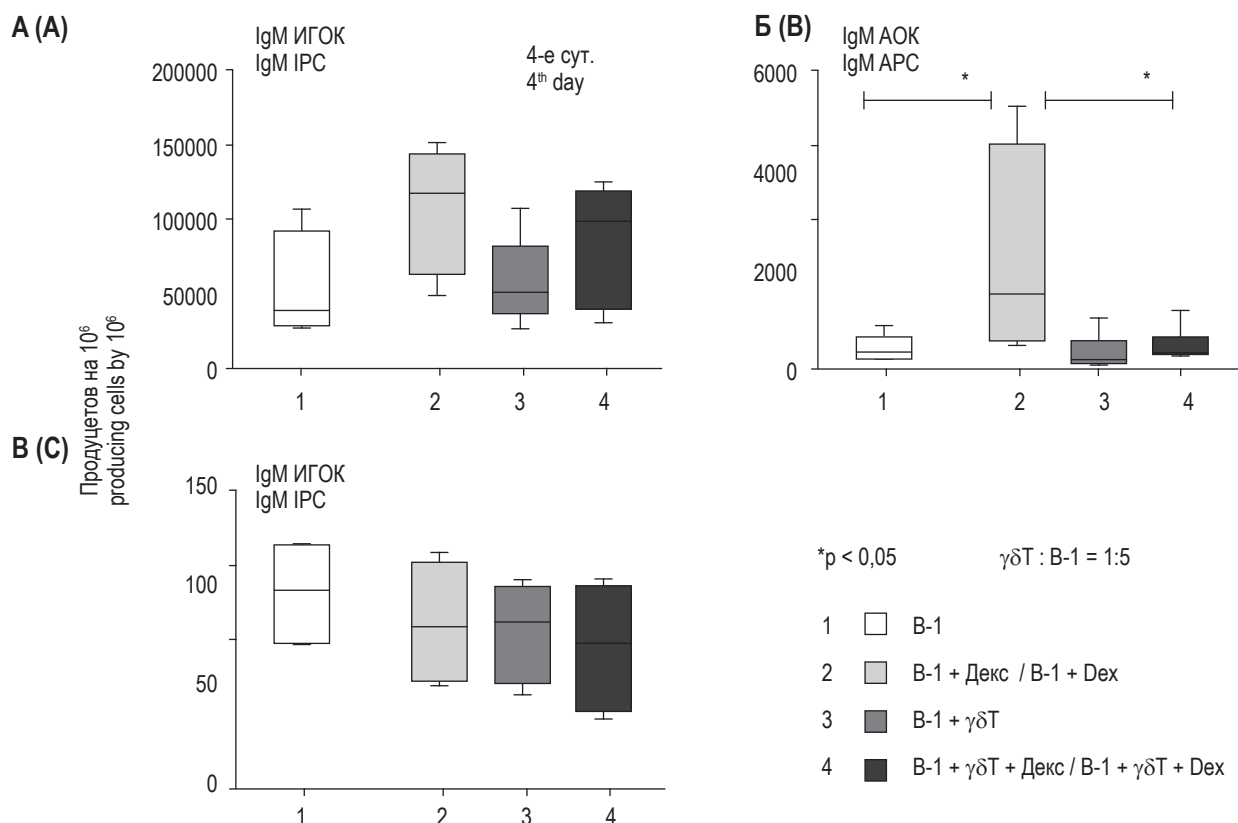


Рисунок 2. Количество Ig-продукторов на 4-е сутки после инкубации γδT- и B1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 5

Figure 2. The number of Ig-producing cells after co-incubation of γδT and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 5, 4th day

B1-лимфоцитов без антигена при инкубации в соотношении 1:5. Она увеличивалась уже в первый час совместной инкубации (в 4,5 и в 5,4 раза соответственно), однако через сутки экспрессия снижалась до исходного уровня.

Добавление антигена Декс к смеси клеток B1 и γδT не вызывает достоверного увеличения экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA в течение первого часа, однако на 1-е сутки наблюдается наибольшее возрастание этого показателя относительно нулевой точки в сравнении с другими группами. Отсутствие усиления экспрессии IgA в 1-й час в группах с Декс можно объяснить преимущественным ответом В-лимфоцитов вообще и B1-клеток в частности при первом контакте с антигеном продукции IgM. По той же причине происходит усиление экспрессии IgM во всех группах вплоть до четвертых суток, где наибольшие уровни отмечаются при добавлении Декс к B1-клеткам.

Экспрессия мРНК тяжелых цепей IgA на 1-е сутки усиливалась во всех группах. При этом в группе B1-клеток с добавлением ТН2-антигена экспрессия возрастала в 6,5 раз, тогда как в остальных группах отмечалось усиление не более чем в 2 раза (рис. 5). Такие результаты могут быть объяснены супрессорным действием γδT-клеток

на способность B1-лимфоцитов экспрессировать IgA *in vitro* в ответ на ТН2-антиген.

Обсуждение

В литературе есть большое количество данных, касающихся разнообразия субпопуляций γδT-клеток, их локализации, свойств и роли в различных иммунных процессах. Однако о механизмах взаимодействия γδT- с В-лимфоцитами известно мало. В частности показано, что γδT-клетки мыши способны взаимодействовать с клетками сингенной В-клеточной лимфомы и индуцировали ее дифференцировку [13]. Помимо этого, встречаются сообщения о способности γδT-лимфоцитов поддерживать и модулировать продукцию антител и влиять на дифференцировку популяций В-клеток селезенки [23]. Мыши с дефицитом αβT-лимфоцитов сохраняют способность продуцировать антитела Т-зависимых подклассов IgG1 и IgE, что предполагает участие в этом процессе CD4⁺ γδT-клеток [32]. Упоминается также опосредованное влияние γδT-клеток на продукцию антител. Rezende и соавт. (2015) показывают, что γδT-клетки могут индуцировать CD4⁺ FoxP3⁺ регуляторные Т-клетки, которые способны подавлять гуморальный ответ [12].

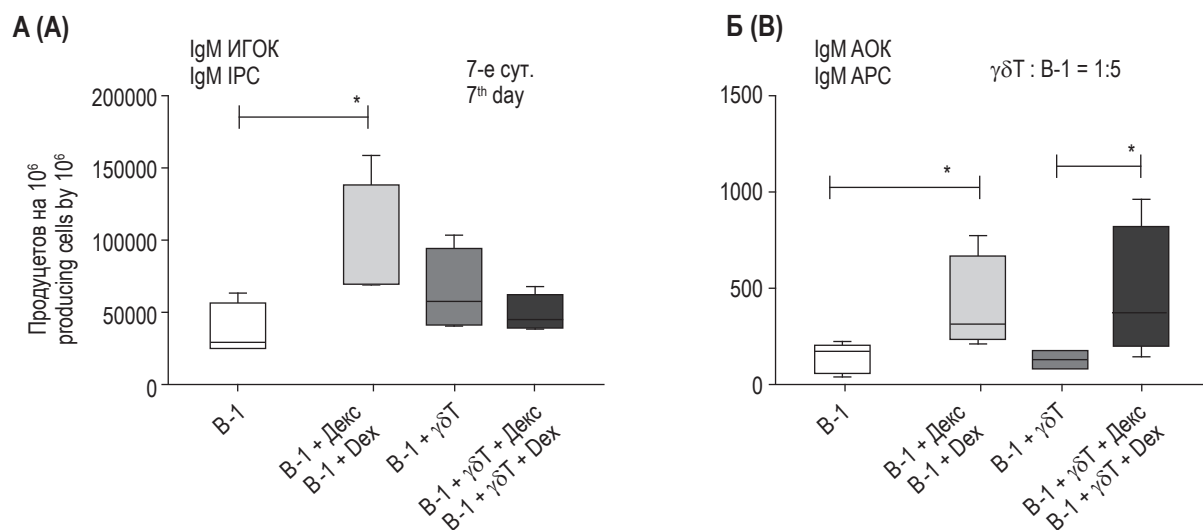


Рисунок 3. Количество Ig-продуцентов на 7-е сутки после инкубации γδT- и B1-клеток *in vitro* в соотношении 1 к 5
Figure 3. The number of Ig-producing cells after co-incubation of γδT and B-1 cells *in vitro* in a ratio of 1 to 5, 7th day

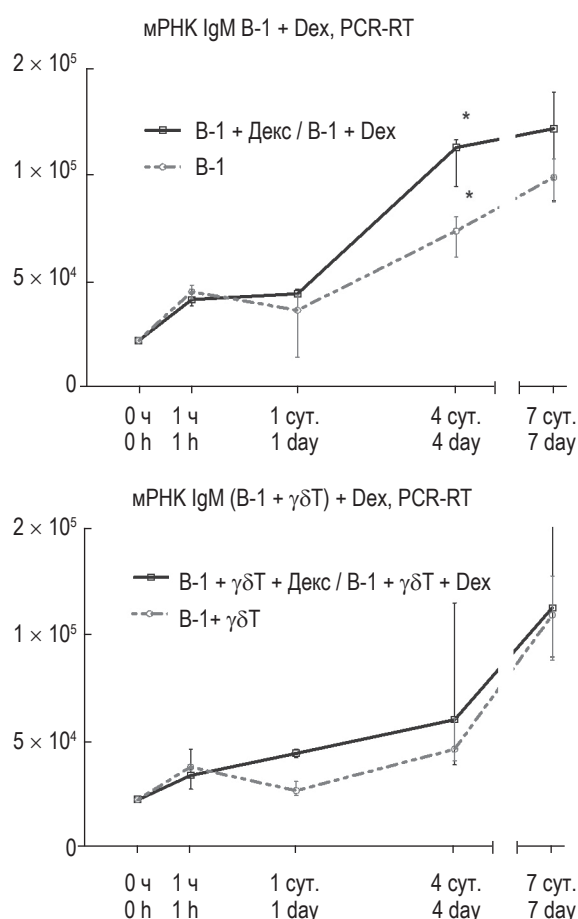


Рисунок 4. Динамика экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM B1-клетками

Примечание.* – $p < 0,05$.

Figure 4. An heavy chain IgM mRNA expression dynamics in the B-1 cells

Note. *, $p < 0.05$.

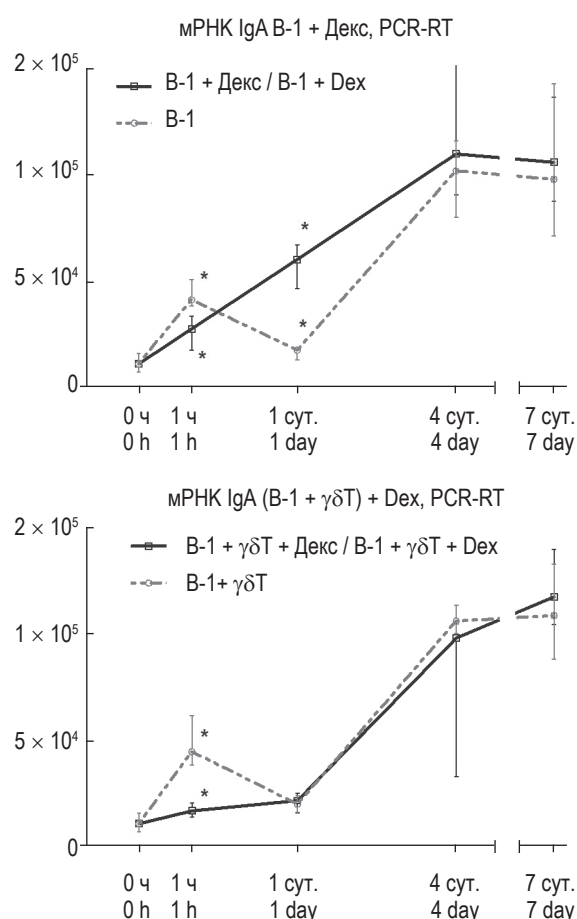


Рисунок 5. Динамика экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA B1-клетками

Примечание.* – $p < 0,05$.

Figure 5. An heavy chain IgA mRNA expression dynamics in the B-1 cells

Note. *, $p < 0.05$.

Однако большинство упомянутых исследований описывают $\gamma\delta$ T-клетки селезенки.

Имеется сообщение, что у мышей, у которых полностью отсутствуют $\gamma\delta$ T-лимфоциты, IgA-ответ на холерный и столбнячный токсин были значительно снижены в сравнении с нормой [20]. Однако практически отсутствуют данные о непосредственном воздействии $\gamma\delta$ T на продукцию антител. Ранее в опытах с мышами линии C57BL/6, нормальными и нокаутными по $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T⁻) *in vivo* нами были получены данные, что у нокаутных особей число IgA-продуцентов в селезенке нормальное и при иммунизации Декс также было снижено по сравнению с обычными C57BL/6 мышами. Однако введение Декс приводило к пропорциональному увеличению числа тотальных IgM и IgA-продуцентов у мышей обеих групп. По таким данным отсутствие в организме $\gamma\delta$ T-клеток не влияло на количество и соотношение IgM- и IgA-ИГОК в ответ Декс [6].

В настоящей работе была проведена оценка влияния $\gamma\delta$ T-клеток на образование IgM и IgA В1-лимфоцитами перитонеальной полости мышей СВА в присутствии ТН2-АГ Декс. Для этого была отработана система *in vitro*, где В1-клетки культивировали вместе с $\gamma\delta$ T-лимфоцитами с добавлением антигена Декс.

Увеличение числа IgM-АОК (АТ к Декс) при добавлении антигена к В1-лимфоцитам в 1,5-2 раза на 4-е сутки согласуется с полученными в предыдущих работах данными [1]. Пик продукции и экспрессии IgM приходился на 4-е сутки, что подтверждалось использованными методами. Продукция и экспрессия IgA количественно уступала IgM, несмотря на резкий, но кратковременный пик усиления экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA. Это может означать, что экспрессия в данном случае не приводила к трансляции тяжелых цепей IgA. Интересно также отметить, что «всплеск» экспрессии мРНК тяжелой цепи IgA выявился только в группах, где отсутствует ТН2-антиген.

Сравнение данных по числу IgM-ИГОК показывает, что ярко выраженного увеличения числа IgM-ИГОК под действием Декс не происходит, что коррелирует с данными литературы, согласно которым ТН2-антигены являются низкоиммуногенными [21].

Результаты исследования образования IgM и IgA-продуцентов показывают, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты, вероятно, оказывают супрессирующее действие на специфический IgM-ответ В1-клеток на ТН2-антиген Декс на ранних сроках *in vitro*. При этом само присутствие $\gamma\delta$ T-клеток в культуре без антигена не снижает образование естественных IgM-продуцентов в В1-лимфоцитах *in vitro*.

Тем не менее на 7-е сутки в культуре клеток выявляется ответ на Декс в культуре В1- и $\gamma\delta$ T-клеток. Вероятно, происходит снижение влияния $\gamma\delta$ T-клеток на ответ В1 клеток на ТН2-антиген Декс в использованных нами экспериментальных условиях. Также можно предположить, что сразу после выделения из кишечника $\gamma\delta$ T-лимфоциты проявляют регуляторные свойства и способны угнетать иммунный ответ *in vitro*, однако после длительной инкубации в отсутствие специфических факторов микроокружения они теряют эту способность. Обратимое изменение свойств клеток в результате инкубации *in vitro* было ранее продемонстрировано нами на примере В-клеток перитонеальной полости [3, 4].

Результаты исследования экспрессии мРНК IgM и IgA под действием $\gamma\delta$ T и сопоставление этих данных с результатами образования Ig-продуцентов предполагают супрессирующее воздействие $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в ответ на добавление ТН2-АГ Декс. По-видимому, $\gamma\delta$ T-клетки способны подавлять индукцию В1-клеток ТН2-антигеном. Известно, что $\gamma\delta$ T-клетки могут обладать как эффекторными, так и регуляторными свойствами. Они способны продуцировать противовоспалительный цитокин IL-10, который, наряду с IL-4, важен для переключения изотипов иммуноглобулинов [24, 31].

Данные по экспрессии мРНК на 4-е сутки не противоречат данным по числу IgM-продуцентов, полученные методом ELISPOT, где при добавлении Декс достоверно возрастает продукция IgM В1-клетками, но при добавлении Декс к смеси В1 и $\gamma\delta$ T-лимфоцитов такого увеличения не происходит. И в этом случае $\gamma\delta$ T-клетки, вероятно, оказывали супрессирующее действие на функциональную активность В1-клеток при ответе на Декс.

Следует отметить, что при совместной инкубации В1- и $\gamma\delta$ T-клеток без антигена абсолютные значения экспрессии мРНК тяжелой цепи IgM в этой группе были самыми низкими, что также может указывать на супрессирующее действие $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на функциональную активность В1-клеток.

По результатам настоящей работы можно заключить, что $\gamma\delta$ T-клетки слизистой оболочки тонкого кишечника мыши способны супрессировать выработку IgM и IgA при ответе на ТН2-антиген, а не усиливать, как предполагалось ранее. Такой эффект может быть обусловлен недостатком активирующих провоспалительных сигналов в использованной нами системе *in vitro*.

Роль В1-клеток в хронических воспалительных заболеваниях кишечника в настоящее время активно изучается. Согласно данным литературы В1-клетки играют регуляторную роль при ТН2-опосредованных колитах, вероятно, путем

продукции IL-10 и, вероятно, продукцией естественных антител. Способность противостоять образованию колитов коррелировала с продукцией естественного IgM B1-клетками [10, 36]. Встречаются сведения о способности B1a-клеток представлять антиген и способствовать дифференцировке Т-лимфоцитов в Th17-клетки. Таким образом, они могут способствовать развитию аутоиммунных процессов при нарушении их IL-10-опосредованных супрессорных функций [33].

$\gamma\delta$ T-клетки могут выступать в роли регуляторных и эффекторных клеток. Одни популяции $\gamma\delta$ T-клеток кишечника защищают эпителиальные клетки кишечника за счет продукции факторов роста, тогда как другие популяции способны приводить к негативным последствиям [24]. Также у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона было показано значительное увеличение экспрессии хемокинового рецептора CCR9, расположенного на циркулирующих $\gamma\delta$ T-клетках. Этим можно объяснить рецидивы названных заболеваний [19, 26]. Таким образом, роль $\gamma\delta$ T-клеток в иммунитете неоднозначна, и дальнейшее исследование этих клеток может быть полезным для понимания механизмов воспалительных заболеваний кишечника.

Немаловажным фактором иммунитета служит IgA. А поскольку B1-лимфоциты вносят большой вклад в синтез IgA, то изучение функциональной активности этих клеток имеет большое значение.

Появляется все больше доказательств, что дефициты IgA связаны с аутоиммунными процессами [37]. А также изменение состава микрофлоры слизистых может вносить свой вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний [40]. Изучение механизмов продукции IgA клетками кишечника может быть информативным для изучения иммуннопатогенеза воспалительных заболеваний слизистой кишечника, а также для разработки вакцин нового поколения.

Учитывая такие сходства B1- и $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, как раннее появление в онтогенезе, преимущественная локализация в слизистых, участие в первой линии защиты, наличие регуляторных свойств, можно предположить, что $\gamma\delta$ T-клетки и B1 могут взаимодействовать при реализации своей функциональной активности.

В настоящей работе было впервые продемонстрировано влияние $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на синтез IgM и IgA B1-клетками. Было показано, что продукция IgM B1-лимфоцитами может быть супрессирована $\gamma\delta$ T-клетками. Это означает, что сделанное раннее предположение о роли $\gamma\delta$ T-лимфоцитов как Т-хелперов для продукции IgA в ответ на TH2-антигены не подтверждается.

Изучение клеточной биологии B1-лимфоцитов, взаимодействие их с клетками микроокружения поможет разработать новые подходы к профилактике инфекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Список литературы / References

1. Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В. Влияние Breg и IL-10 на гуморальный иммунный ответ // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 331-338. [Gavrilova M.V., Snegireva N.A., Sidorova E.V. Influence of Breg and IL-10 upon humoral immune response. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 331-338. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338.
2. Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Хоченков Д.А., Сидорова Е.В. Клеточные взаимодействия при ответе на Т-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 4. С. 325-334. [Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Khochenkov D.A., Sidorova E.V. *In vitro* cellular interactions during immune response to t cellindependent type 2 antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 4, pp. 325-334. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-4-325-334.
3. Дьяков И.Н., Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Сидорова Е.В. Влияние микроокружения на функциональную активность В-лимфоцитов мыши // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2008. Т. 25, № 5. С. 360-366. [Dyakov I.N., Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Sidorova E.V. The influence of microenvironment on the functional activity of murine B lymphocytes. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membranoy i kletочноy biologii = Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane And Cell Biology*, 2008, Vol. 25, no. 5, pp. 360-366. (In Russ.)]
4. Дьяков И.Н., Григорьев И.В., Сидорова Е.В., Чернышова И.Н. Функциональная активность в-клеток мыши. Роль микроокружения // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 1. С. 51-58. [Dyakov I.N., Grigoriev I.V., Sidorova E.V., Chernyshova I.N. Functional activity of murine b cell: a role of microenvironment. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 51-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-51-58.
5. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. М.: ВПК, 2007. 448 с. [Karkischenko N.N. Biomedicine alternatives. Part 2. Classical and Alternative Pharmacotoxicology]. Moscow: VPK, 2007. 448 p.
6. Молекулярные и клеточные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунотоксикологии (экспериментальные модели) // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3s. С. 9-56. [Molecular and cellular basis of immune regulation, immune and immunodiagnostics (experimental models). *Meditsinskaya*

immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, Vol. 17, no. 3s, pp. 9-56. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-3s-9-56.

7. Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М. $\gamma\delta$ T-лимфоциты: общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 115-130. [Nizhegorodova D.B., Zafranskaya M.M. $\gamma\delta$ T-lymphocytes: general characteristics, subpopulation profile, biological role, and functional features. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 115-130. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-2-3-115-130.

8. Чернышова И.Н., Гаврилова М.В., Сидорова Е.В. Модельная система для изучения клеточных взаимодействий и механизмов иммунного ответа на Т-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2010. Т. 27, № 5. С. 1-7. [Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Sidorova E.V. Model system to study cell interactions and mechanisms of immune response to T-independent type 2 antigens *in vitro*. *Biologicheskie membrany: zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii = Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, Vol. 27, no. 5, pp. 1-7. (In Russ.)]

9. Allaire J.M., Crowley S.M., Law H.T., Chang S.Y., Ko H.J., Vallance B.A. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 9, pp. 677-696.

10. Aziz M., Holodick N.E., Rothstein T.L., Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol. Res.*, 2015, Vol. 63, no. 1-3, pp. 153-166.

11. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 1, pp. 34-46.

12. Born W.K., Huang Y., Reinhardt R.L., Huang H., Sun D., O'Brien R.L. $\gamma\delta$ T Cells and B Cells. *Adv. Immunol.*, 2017, Vol. 134, pp. 1-45.

13. Born W., Cady C., Jones-Carson J., Mukasa A., Lahn M., O'Brien R. Immunoregulatory functions of gammadelta T cells. *Adv. Immunol.*, 1999, Vol. 71, pp. 77-144.

14. Chien Y.H., Meyer C., Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 121-155.

15. Fagarasan S., Honjo T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 3, pp. 277-283.

16. Fagarasan S., Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, 2000, Vol. 290, no. 5489, pp. 89-92.

17. Fagarasan S., Kawamoto S., Kanagawa O., Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 243-273.

18. Fagarasan S., Kinoshita K., Muramatsu M., Ikuta K., Honjo T. *In situ* class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*, 2001, Vol. 413, no. 6856, pp. 639-643.

19. Fay N.S., Larson E.C., Jameson J.M. Chronic inflammation and $\gamma\delta$ T Cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 210. doi: 10.3389/fimmu.2016.00210.

20. Fujihashi K., McGhee J.R., Kweon M.N., Cooper M.D., Tonegawa S., Takahashi I., Hiroi T., Mestecky J., Kiyono H. gamma/delta T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 183, no. 4, pp. 1929-1935.

21. Gärdby E., Wrammert J., Schön K., Ekman L., Leanderson T., Lycke N. Strong differential regulation of serum and mucosal IgA responses as revealed in CD28-deficient mice using cholera toxin adjuvant. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 1, pp. 55-63.

22. Genestier L., Taillardet M., Mondiere P., Gheit H., Bella C., Defrance T. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 7779-7786.

23. Huang, Y., Getahun, A., Heiser, R.A., Detanico, T., Aviszus, K., Kirchenbaum, G. et al. Gammadelta T cells shape preimmune peripheral B cell populations. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, pp. 217-231.

24. Kober O.I., Ahl D., Pin C., Holm L., Carding S.R., Juge N. $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice show alterations in mucin expression, glycosylation, and goblet cells but maintain an intact mucus layer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2014, Vol. 306, no. 7, pp. G582-G593.

25. Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R., Hengartner H., Zinkernagel R.M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 2000, Vol. 288, no. 5474, pp. 2222-2226.

26. Mann E.R., McCarthy N.E., Peake S.T., Milestone A.N., Al-Hassi H.O., Bernardo D., Tee C.T., Landy J., Pitcher M.C., Cochrane S.A., Hart A.L., Stagg A.J., Knight S.C. Skin- and gut-homing molecules on human circulating $\gamma\delta$ T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 170, no. 2, pp. 122-130.

27. Meyer-Bahlburg A. B-1 cells as a source of IgA. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 2015, Vol. 1362, pp. 122-131.

28. Mond J.J., Vos Q., Lees A., Snapper C.M. T cell independent antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, Vol. 7, no. 3, pp. 349-354.

29. Nielsen M.M., Witherden D.A., Havran W.L. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 12, pp. 733-745.

30. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 12, pp. 821-832.

31. Paul S., Lal G. Regulatory and effector functions of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 139, no. 5, pp. 976-985.
32. Rezende R.M., Lanser A.J., Rubino S., Kuhn C., Skillin N., Moreira T.G., Liu S., Gabriely G., David B.A., Menezes G.B., Weiner H.L. $\gamma\delta$ T cells control humoral immune response by inducing T follicular helper cell differentiation. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 3151. doi: 10.1038/s41467-018-05487-9.
33. Rothstein T.L., Griffin D.O., Holodick N.E., Quach T.D., Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1285, pp. 97-114.
34. Roy B., Agarwal S., Brennecke A., Krey M., Pabst O., Düber S., Weiss S. B-1-cell subpopulations contribute differently to gut immunity. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, pp. 2023-2032.
35. Shao W., Zhang C., Liu E., Zhang L., Ma J., Zhu Z., Gong X., Qin Z., Qiu X. Identification of liver epithelial cell-derived Ig expression in μ chain-deficient mice. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 23669. Available at: <https://www.nature.com/articles/srep23669>.
36. Shimomura Y., Mizoguchi E., Sugimoto K., Kibe R., Benno Y., Mizoguchi A., Bhan A.K. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 6, pp. 729-737.
37. Singh K., Chang C., Gershwin M.E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, pp. 163-177.
38. Snegireva N., Gavrilova M., Sidorova E. Isolation of $\gamma\delta$ T cells from mouse small intestine. *Open J. Immunol.*, 2013, Vol. 3, No.4, 221-223.
39. Tougaard P., Skov S., Pedersen A.E., Krych L., Nielsen D.S., Bahl M.I., Christensen E.G., Licht T.R., Poulsen S.S., Metzendorff S.B., Hansen A.K., Hansen C.H. TL1A regulates TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes and gut microbial composition. *Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 45, no. 3, pp. 865-875.
40. van Praet J.T., Donovan E., Vanassche I., Drennan M.B., Windels F., Dendooven A., Allais L., Cuvelier C.A., van de Loo F., Norris P.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Rabot S., Tito R., Raes J., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., van de Wiele T., Eberl G., Ware C.F., Elewaut D. Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. *EMBO J.*, 2015, Vol. 34, no. 4, pp. 466-474.
41. Watanabe N., Ikuta K., Fagarasan S., Yazumi S., Chiba T., Honjo T. Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated gamma/delta T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 11, pp. 1577-1586.

Авторы:

Снегирева Н.А. — научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сидорова Е.В. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Дьяков И.Н. — к.б.н., заведующий лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гаврилова М.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Чернышова И.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Пашков Е.П. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Snegireva N.A., Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Sidorova E.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Dyakov I.N., PhD (Biology), Head, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Gavrilova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Chernishova I.N., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Immunoglobulin Biosynthesis Laboratory, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Pashkov E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation