© Коллектив авторов, 2021

Астахова Е.А.^{1,2}, Фролов Е.А.¹, Шилкина А.Б.¹, Бязрова М.Г.¹⁻³,
Латышева Е.А.¹, Латышева Т.В.¹, Филатов А.В.^{1,2}

Стимуляция В-клеток в системе ИЛ-21/CD40L в норме и у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 117198, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) относится к первичным иммунодефицитам. К настоящему времени идентифицирован ряд генов, мутации в которых приводят к развитию ОВИН. Однако моногенные дефекты лежат в основе не более чем 10 % случаев ОВИН, а основная часть ОВИН связана с участием множества генов. В этих условиях для поиска и расшифровки возможных патогенетических факторов эффективно использовать анализ функциональных дефектов в активации В-лимфоцитов.

Цель исследования – поиск функциональных дефектов активации В-лимфоцитов у больных с ОВИН при стимуляции *in vitro* в системе ИЛ-21/CD40L.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 14 пациентов с ОВИН. Группа сравнения состояла из 10 здоровых добровольцев. Из периферической крови были получены образцы мононуклеарных клеток крови, которые использовали для активации Т-клеток. В качестве активаторов использовали фитогемагглютинин (ФГА) или комбинацию форболмиристат-ацетата (РМА) и иономицина (Io). Индукцию экспрессии CD40L на CD4⁺-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии. Активацию в системе ИЛ-21/CD40L проводили на В-клетках, которые предварительно выделяли из популяции мононуклеарных клеток методом иммуномагнитной сепарации. В качестве активирующих стимулов использовали рекомбинантный ИЛ-21 и фидерные клетки A549, стабильно трансфицированные геном *CD40L*. Дифференцировку В-клеток в плазмбласты определяли по доле клеток с фенотипом CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20^{low}. Субпопуляции наивных (IgM⁺IgD⁺), непереключенных (IgM⁺CD27⁺) и переключенных (IgG⁺CD27⁺) В-клеток выделяли с помощью проточного сортировщика. Секрецию IgG и IgM определяли с помощью иммуноферментного анализа, а количество IgG-секретирующих клеток оценивали с помощью метода ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot Analysis).

Результаты. При активации Т-клеток с помощью поликлональных стимуляторов часть CD4⁺-клеток начинала экспрессировать CD40L. Стимуляция Т-клеток здоровых добровольцев с помощью ФГА или комбинации РМА и Io приводила к экспрессии CD40L на 10 и 80 % CD4⁺-клеток, соответственно. Наблюдалась сравнимая активация Т-клеток, полученных от пациентов с ОВИН, и доля CD4⁺CD40L⁺-клеток была близка к норме. В-клетки пациентов с ОВИН при стимуляции в системе ИЛ-21/CD40L сохраняли способность дифференцироваться в плазмбласты с фенотипом CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20^{low}, но секретируют IgG в 10 раз меньше, чем В-клетки здоровых добровольцев.

Заключение. У пациентов с ОВИН пути активации В-клеток, связанные с ИЛ-21 и CD40L, остаются интактными, и функциональные дефекты, наблюдаемые при ОВИН, очевидно, связаны с другими молекулами.

Ключевые слова: общая вариабельная иммунная недостаточность; В-лимфоциты; плазмбласты; ИЛ-21; CD40L

Для корреспонденции
Филатов Александр Васильевич –
доктор биологических наук,
профессор, заведующий
лабораторией иммунохимии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: avfilat@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

Статья получена 17.10.2021. Принята в печать 19.11.2021.

Для цитирования: Астахова Е.А., Фролов Е.А., Шилкина А.Б., Бязрова М.Г., Латышева Е.А., Латышева Т.В., Филатов А.В. Стимуляции В-клеток в системе ИЛ-21/CD40L в норме и у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью. Иммунология. 2021; 41 (6): 631–640. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-631-640>

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00318. Работа Бязровой М.Г. выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Astakhova E.A.^{1,2}, Frolov E.A.¹, Shilkina A.B.¹, Byazrova M.G.¹⁻³,
Latysheva E.A.¹, Latysheva T.V.¹, Filatov A.V.^{1,2}

Stimulation of B cells in the IL-21/CD40L system in healthy donors and in patients with common variable immunodeficiency

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² M.V. Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russian Federation

³ Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Common variable immunodeficiency (CVID) refers to primary immunodeficiencies. To date, a number of genes have been identified, mutations in which lead to the development of CVID. However, monogenic defects underlie no more than 10 % of CVID cases, and the bulk of CVID is associated with the participation of many genes. Under these conditions, to search for and decipher possible pathogenetic factors, it is effective to use the analysis of functional defects in the activation of B-lymphocytes.

The aim of the study – to search for functional defects in the activation of B-lymphocytes in patients with CVID when stimulated *in vitro* in the IL-21/CD40L system.

Material and methods. The study involved 14 patients with CVID. The group of comparison consisted of 10 healthy volunteers. Samples of blood mononuclear cells were obtained from peripheral blood and used to activate T cells. Phytohemagglutinin (PHA) or a combination of phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin (Io) were used as activators. CD40L induction on CD4⁺-cells was assessed using flow cytometry. B cells were isolated from the mononuclear cells by the method of immunomagnetic separation and B cell activation in the IL-21/CD40L system was carried out. Recombinant IL-21 and A549 feeder cells stably transfected with the *CD40L* gene were used as activating stimuli. The differentiation of B cells into plasmablasts was determined by the proportion of cells with the CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20^{low} phenotype. Subpopulations of naive (IgM⁺IgD⁺), unswitched (IgM⁺CD27⁺) and switched (IgG⁺CD27⁺) B cells were isolated using a flow sorter. The secretion of IgG and IgM was determined using an enzyme immunoassay, and the number of IgG-secreting cells was estimated using the ELISpot method (Enzyme-Linked ImmunoSpot Analysis).

Results. When T cells were activated by polyclonal stimulants, some of the CD4⁺-cells began to express CD40L. In T cells of healthy volunteers, stimulation with PHA or a combination of PMA and Io resulted in CD40L expression on 10 and 80 % of CD4⁺-cells, respectively. T cells from patients with CVID showed comparable activation and the proportion of CD4⁺CD40L⁺-cells was close to normal. When stimulated in the IL-21/CD40L system, B cells of patients with CVID retained the ability to differentiate into plasmablasts with the CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20^{low} phenotype, but secreted IgG 10 times less than B cells from healthy volunteers.

Conclusion. In CVID patients the B cell activation pathways associated with IL-21 and CD40L remain intact, and the functional defects observed in CVID are obviously associated with other molecules.

Keywords: common variable immunodeficiency; B lymphocytes; plasmablasts; IL-21; CD40L

For correspondence

Alexander V. Filatov –
Dr. Sci., PhD, Prof.,

Head of the Immunochemistry Laboratory
of NRC Institute of Immunology

FMBA of Russia,

Moscow, Russian Federation

E-mail: avfilat@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

Received 17.10.2021. Accepted 19.11.2021.

For citation: Astakhova E.A., Frolov E.A., Shilkina A.B., Byazrova M.G., Latysheva E.A., Latysheva T.V., Filatov A.V. Stimulation of B cells in the IL-21/CD40L system in healthy donors and in patients with common variable immunodeficiency. *Immunologiya*. 2021; 41 (6): 631–40. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-631-640> (in Russian)

Funding. The study was supported by the grant of Russian Foundation for Basic Research (RFBR) No. 20-015-00318. Byazrova M.G. was supported by the Strategic Academic Leadership Program from RUDN University of the MSHE of Russia.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Общая вариабельная иммунная недостаточность (ОВИН) относится к первичным иммунодефицитам. Клинические проявления ОВИН очень вариативны [1]. Одним из ключевых признаков ОВИН является нарушение в переключении В-лимфоцитов, что приводит к снижению синтеза Ig изотипов G, A и/или M [2]. По этой причине пациенты с ОВИН часто страдают от повторяющихся инфекций. Однако в клинической картине наблюдаются не только инфекционные проявления, но и такие симптомы, как патологическая лимфопролиферация, аутоиммунные осложнения, энтеропатия и развитие опухолей (в первую очередь лимфом).

При ОВИН наблюдаются нарушения в дифференцировке наивных В-клеток в В-клетки памяти и антителосекретирующие клетки. Учитывая гетерогенность клинических симптомов у пациентов с ОВИН, были предприняты попытки стратификации пациентов по нарушениям дифференцировки В-лимфоцитов с целью поиска иммунологических маркеров формирования клинического фенотипа. Так, были созданы Фрайбургская (2002 г.) и Парижская (2003 г.) классификации, подразделяющие пациентов по количеству наивных В-клеток, В-клеток памяти с переключенным и непереключенным синтезом Ig [3–6]. Патогенез ОВИН в значительной степени остается невыясненным. К настоящему времени выявлено более 20 различных генов, регулирующих иммунный ответ, функциональность которых нарушена при этом заболевании [7]. Однако генетические дефекты регистрируются не более чем в 10 % случаев ОВИН. Вполне вероятно, что основная часть случаев ОВИН имеет комплексный генетический характер, и для их характеристики необходимо применять более общие физиологические параметры. К таким параметрам можно отнести эффективность стимуляции и дифференцировки В-лимфоцитов в системе *in vitro*.

Можно выделить 3 пути активации В-лимфоцитов. К 1-му пути относят активацию через антиген-специфический рецептор BCR, ко 2-му – стимуляцию под действием сигналов, получаемых в результате межклеточных взаимодействий CD40/CD40L с участием интерлейкина (ИЛ)-21 или ИЛ-4, и, наконец, 3-й путь включает активацию под действием ФНО-подобных цитокинов BAFF и APRIL. Основной путь активации В-лимфоцитов проходит через антиген-специфический рецептор BCR с участием костимуляторных молекул CD19, CD21, CD81 и Leu13. Этот сигнальный путь запускается при связывании BCR с антигеном или его

поперечном связывании анти-Ig-антителами и комплементом. При стимуляции В-клеток через BCR и толл-подобный рецептор TLR9 развивается иммунный ответ на тимус-независимые антигены.

Ответ на тимус-зависимые антигены требует также участия дополнительных факторов и определенных клеточных взаимодействий, которые происходят в герминативных центрах лимфоузлов. В этих структурах В-клетки вступают в контакт с фолликулярными Т-хелперами, которые несут на своей поверхности CD40L и продуцируют значительное количество ИЛ-21. Совместное действие ИЛ-21 и CD40L обеспечивает активную пролиферацию В-клеток, их дифференцировку в плазмбласты, а затем в плазматические клетки, а также переключение синтеза Ig [8]. Дополнительным стимулом при активации В-клеток являются факторы BAFF (B cell Activating Factor of the TNF family) и APRIL (A Proliferation Induced Ligand) [9]. В отличие от ИЛ-21/CD40L, эти факторы обеспечивают долговременное выживание В-клеток и их превращение в долгоживущие плазматические клетки [10, 11].

Таким образом, анализируя функциональные дефекты в активации В-лимфоцитов, можно охватить широкий круг возможных нарушений и при этом установить молекулярные механизмы, приводящие к проявлению ОВИН. Такой функциональный подход позволяет сузить круг предполагаемых дефектов, которые в дальнейшем могут быть идентифицированы прямыми генетическими методами. Ранее нами был отработан эффективный метод для стимуляции В-клеток, который обеспечивает активацию В-клеток, дифференцировку их в плазмбласты и Ig-секретирующие клетки [12].

Цель настоящего исследования – поиск функциональных дефектов в активации В-лимфоцитов у пациентов с ОВИН при стимуляции В-клеток *in vitro* в системе ИЛ-21/CD40L.

Материал и методы

Характеристика пациентов. В исследуемую группу были включены 10 пациентов с диагнозом ОВИН (4 женщины и 6 мужчин, средний возраст – 42 года, в диапазоне от 27 до 80 лет). Все пациенты характеризовались сниженным уровнем сывороточных IgG, IgA и/или IgM, при нормальном количестве CD19⁺-клеток. Пациенты ежемесячно проходили заместительную терапию в виде введения внутривенного иммуноглобулина.

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоци-

ации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого». Письменное информированное согласие было получено от каждого участника исследования перед выполнением каких-либо процедур исследования. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен Этическим комитетом Института иммунологии (№ 3-1, 11 марта 2020 г.).

Образцы цельной крови собирали в гепаринизированные вакутейнерные пробирки (Sarstedt, Cat. No. 04.1927, Германия). Мононуклеарные клетки крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). В-клетки выделяли методом отрицательной иммуномагнитной сепарации с использованием набора Dynabeads Untouched human B cell kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11351D, США). Субпопуляции переключенных В-клеток памяти ($\text{IgG}^+\text{CD27}^+$), непереключенных В-клеток памяти ($\text{IgM}^+\text{CD27}^+$) и наивных В-лимфоцитов ($\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD38}^+$) выделяли с помощью проточного сортировщика клеток.

Активация лимфоцитов. Для активации Т-хелперов в качестве стимулирующих агентов использовали фитогемагглютинин (ФГА; 10 мкг/мл), а также комбинацию форболмиристора (PMA; 17 нМ) и иономицина (Io; 220 нМ). Выделенные лимфоциты крови инкубировали *in vitro* в присутствии стимулирующих агентов в течение 18 ч (ФГА) или 4 ч (PMA + Io). В-лимфоциты выделяли из мононуклеарной фракции методом негативной иммуномагнитной сепарации или с помощью сортировки клеток на проточном сортировщике клеток. Выделенные В-клетки культивировали *in vitro* в течении нескольких дней в присутствии 25 нг/мл рекомбинантного ИЛ-21 (Peprotech, США) и фидерных клеток, несущих поверхностный CD40L [12]. На 4-й и 7-й день проводили рестимуляцию, добавляя свежую порцию ИЛ-21 и фидерных клеток.

Проточная цитометрия. Для окрашивания лимфоцитов использовали следующие антитела: CD19-PE (клон LT19), CD27-PECy5.5 (клон LT27), CD38-PECy7 (клон LT38), против человеческого IgG-FITC (клон CH1) и IgM-FITC (клон MA2). Указанные антитела ранее были получены в нашей лаборатории [13, 14] и были конъюгированы с соответствующими красителями по ранее описанному методу [15, 16]. Для определения экспрессии CD40L и IgD использовали клоны 24-31 и IA6-2 (Biolegend, США). Окрашивание производили в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки 2 раза отмывали в физиологическом растворе, забуференном фосфатами. Перед измерением клеточную суспензию пропускали через ситечко с диаметром пор 40 мкм. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), оснащенного 2 диодными лазерами 488 и 561 нм. Клетки сортировали на проточном сортировщике SH800S (Sony Biotechnology, США). Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программы FlowJo (BD Biosciences, США).

Определение Ig методом иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела против человеческого IgG (клон 2A11) и IgM (клон CH2) в концентрации 10 мкг/мл сорбировали в лунках 96-луночных планшетов (Greiner, Германия), внося в лунку по 100 мкл раствора антител в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ). Планшеты инкубировали ночь при 4 °C, после чего трижды отмывали буфером ФСБ/Tween 20. Лунки блокировали добавлением ФСБ, содержащего 1 % бычьего сывороточного Ig, инкубировали в течение часа и 3 раза отмывали с помощью ФСБ с добавлением 0,1 % Tween 20 (ФСБ-Т). Образцы культуральных супернатантов серийно разводили от 1 : 2 до 1 : 200 раз в буфере для образцов. Планшеты инкубировали с образцами в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки планшеты дополнительно инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами против IgG или IgM человека, конъюгированными с пероксидазой хрена. Далее планшеты промывали 7 раз и проявляли в течение 10 мин с помощью 100 мкл раствора хромогена ТМВ. Реакцию остановили добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и оптическую плотность при 450 нм измеряли с помощью фотометра BioRad iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad, США), данные анализировали с помощью программы Zemfira 4.0 (BioRad, США).

Определение Ig-секретирующих клеток методом ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot Analysis). Лунки 96-луночного планшета Multiscreen HTS Filter Plates (Merck, США) с размером пор 0,45 мкм покрывали кроличьими антителами против IgG или IgM человека (R&D Systems, США) в концентрации 10 мкг/лунку. Стимулированные В-клетки высевали в лунки (от 100 до 3000 клеток на лунку) и инкубировали в течение 16 ч при 37 °C, 5 % CO_2 . После 3-кратной отмывки в PBS, содержащем 0,05 % Tween 20, в лунки добавляли биотинилированные антитела против IgG или IgM человека (R&D Systems, США) и инкубировали 16 ч. После 3-кратной отмывки в PBS/Tween20, в разведении 1 : 60 добавляли конъюгат стрептавидина с щелочной фосфатазой (R&D Systems, США) и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 ч. После нескольких отмывок добавляли хромоген из набора B Cell ELISpot Development (R&D Systems, США) и инкубировали до появления четких пятен. Реакцию останавливали промыванием водой. Изображения лунок получали с помощью ридера CTL ImmunoSpot Analyzer (CTL, США). Лунки, покрытые нерелевантным белком, служили в качестве отрицательного контроля.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версия 8.4.3 (GraphPad, США). Значимость различий между выборками оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, а также с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные на гистограммах показывают медиану и межквартильный размах.

Рис. 1. Индукция экспрессии молекулы CD40L на CD4⁺-клетках пациентов с ОВИН и здоровых добровольцев

Лимфоциты крови культивировали *in vitro* в присутствии фитогемагглютинина (ФГА) (А) или комбинации форболмиристат-ацетата (РМА) и иономицина (Io) (Б).

Здесь и на рис. 3–5: ОВИН – общая переменная иммунная недостаточность.

Результаты

Наблюдаемые при ОВИН дефекты стимуляции В-лимфоцитов потенциально могут быть связаны с нарушениями активации Т-хелперов. Для того чтобы оценить эту возможность, мы изучили индукцию стимуляторной молекулы CD40L на Т-клетках пациентов с ОВИН. Т-клетки активировали обработкой фитогемагглютинином (ФГА) или комбинацией форболмиристат-ацетата (РМА) и иономицина (Io) в течение 18 ч (ФГА) или 4 ч (РМА + Io). Стимулированные клетки окрашивали комбинацией антител CD4-FITC и CD40L-PE. При стимуляции Т-клеток здоровых добровольцев с помощью ФГА ($n = 10$) около 10 % CD4⁺-клеток начинали экспрессировать CD40L. Примерно такую же активацию Т-лимфоцитов мы наблюдали при стимуляции Т-клеток пациентов с ОВИН ($n = 14$, $p = 0,12$) (рис. 1).

Активация с помощью РМА + Io была более эффективной и вызывала значительную экспрессию CD40L на поверхности Т-хелперов. Стимуляция клеток здоровых добровольцев ($n = 6$) в течение 4 ч обеспечивала экспрессию CD40L на 85 % CD4⁺-клеток (рис. 1). У пациентов с ОВИН ($n = 5$) доля CD4⁺-клеток, экспрессирующих CD40L, была незначительно ниже ($p = 0,25$). Таким образом, по крайней мере у исследованных пациентов с ОВИН нарушения в функционировании В-лимфоцитов не были связаны с недостатком экспрессии молекулы CD40 при активации Т-хелперов.

Далее мы перешли к функциональной оценке непосредственно В-клеточного звена иммунитета. С этой целью мы сравнили пациентов с ОВИН со здоровыми добровольцами по эффективности В-клеточной стиму-

ляции *in vitro* в системе ИЛ-21/CD40L. Используемая нами схема стимуляции была достаточно эффективной и обеспечивала пролиферацию В-клеток и их дифференцировку в плазмобласты лимфоцитов, полученных как от здоровых добровольцев, так и от пациентов с ОВИН. В контрольные точки на 4, 7 и 10-й день стимуляции с помощью проточной цитометрии мы определяли общее количество и фенотип активированных клеток.

Рис. 2. Пролиферация отдельных субпопуляций В-клеток здоровых добровольцев при стимуляции *in vitro* в системе ИЛ-21/CD40L

С помощью клеточного сортировщика были выделены наивные В-клетки (IgM⁺IgD⁺) и В-клетки памяти с непереключенным (IgM⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенным (IgG⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁺) фенотипом, которые стимулировали *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L.

Рис. 3. Стимуляция *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L отдельных субпопуляций В-лимфоцитов здоровых добровольцев. С помощью клеточного сортировщика были выделены наивные В-клетки (IgM⁺IgD⁺) и В-клетки памяти с непереключенным (IgM⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенным (IgG⁺CD27⁺IgD⁺) фенотипом, которые стимулировали *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L. Слева показана пролиферация клеток; справа – дифференцировка в плазмобласты В-клеток из различных субпопуляций.

Эксперименты с В-клетками здоровых добровольцев показали, что наивные В-лимфоциты пролиферировали более активно, чем В-клетки памяти (рис. 2). На 7-й день стимуляции индекс пролиферации наивных В-лимфоцитов более чем в 2 раза превышал индекс пролиферации переключенных и непереключенных В-клеток памяти.

Наряду с пролиферацией наблюдалась также дифференцировка В-клеток в плазмобласты. Как правило, пациенты с ОВИН характеризуются сниженным количеством переключенных В-клеток памяти. Тем не менее именно эти клетки наиболее активно дифференцировались в плазмобласты. На 7-й день стимуляции процент плазмобластов в популяции переключенных В-клеток памяти достигал 80 % (рис. 3), в то время в отсорти-

рованных субпопуляциях наивных и непереключенных В-клеток памяти доля плазмобластов составляла всего 7 и 61 % соответственно. Увеличение доли плазмобластов сопровождалось уменьшением доли исходных недифференцировавшихся IgG⁺CD27⁺-клеток. В отличие от этого, у пациентов с ОВИН только малая доля переключенных В-клеток памяти дифференцировалась в плазмобласты. Соответственно доля IgG⁺CD27⁺-клеток при этом уменьшалась незначительно.

К 7-му дню стимуляции В-клетки начинали секретировать в среду Ig. По секреции IgM наивные и непереключенные В-клетки памяти пациентов с ОВИН не отличались от таковых показателей В-клеток здоровых добровольцев (рис. 4). Можно отметить, что В-клетки памяти с поверхностным IgG вовсе не секретировали IgM, что свидетельствовало о хорошем качестве сортировки. Вполне естественно, что секреция IgG в наибольшей степени отмечалась в субпопуляции В-клеток с переключенным фенотипом. У В-клеток пациентов с ОВИН уровень IgG секреции был примерно на порядок меньше, чем у В-клеток здоровых добровольцев ($p = 0,0006$). Наивные В-клетки, несмотря на высокий уровень пролиферации, не демонстрировали заметной секреции IgG, следовательно, стимуляция ИЛ-21/CD40L не обеспечивала переключение синтеза с IgM на IgG. В популяции непереключенных клеток памяти здоровых добровольцев в некоторых случаях наблюдался небольшой, но вполне заметный уровень секреции IgG. Это свидетельствовало о возможности переключения с синтеза IgM на синтез IgG при стимуляции ИЛ-21/CD40L *in vitro*. В отличие от этого, у пациентов с ОВИН в субпопуляции В-клеток с непереключенным фенотипом никакой секреции IgG не наблюдалось.

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть возможность переключения синтеза Ig при стимуляции *in vitro* В-клеток пациентов с ОВИН, мы провели дополнительное исследование с помощью более чувстви-

Рис. 4. Секреция IgM и IgG в культурах ИЛ-21/CD40L-стимулированных субпопуляций В-лимфоцитов здоровых добровольцев и пациентов с ОВИН на 7-й день после стимуляции

Рис. 5. Образование IgG-секретирующих клеток в культурах ИЛ-21/CD40L-стимулированных субпопуляций В-лимфоцитов здоровых добровольцев и пациентов с ОВИН на 7-й день стимуляции

Перед стимуляцией В-клетки были поделены на субпопуляции наивных (IgM^+IgD^+), непереключенных (IgM^+CD27^+) и переключенных (IgG^+) клеток.

ного метода ELISpot (рис. 5). В среднем около 50 % переключенных В-клеток здоровых добровольцев ($n = 5$), а также пациентов с ОВИН ($n = 5$) в процессе стимуляции ИЛ-21/CD40L превращались в IgG-секретирующие клетки (рис. 5). В популяции непереключенных и наивных В-клеток наблюдался небольшой, но достоверный уровень IgG-секретирующих клеток. Таким образом, В-клетки пациентов с ОВИН по сравнению с В-клетками здоровых добровольцев характеризовались существенно сниженным уровнем секреции IgG, однако сохраняли способность к переключению синтеза с IgM на IgG.

Обсуждение

Как известно, ОВИН характеризуется дефектами в функционировании В-клеточного звена иммунитета. Эта недостаточность может быть следствием нарушений как в самих В-лимфоцитах, так и в Т-хелперах, которые обеспечивают нормальное функционирование В-клеток. Важной молекулой, участвующей в поддержании и регуляции В-клеточного ответа, является CD40L [17, 18]. Эта костимуляторная молекула экспрессируется на активированных Т-хелперах, которые участвуют в стимуляции В-лимфоцитов и в развитии иммунного ответа. Взаимодействие молекул CD40L и CD40 запускает сигналинг, который приводит к В-клеточной пролиферации, препятствует апоптозу, вызывает переключение изотипа синтезируемого Ig, соматического гипермутагенеза, а также созреванию аффинности антител [19]. При дисрегуляции или отсутствии экспрессии CD40L на Т-хелперах значительно снижается активация В-лимфоцитов. Мы предположили, что дефекты активации и стимуляции В-лимфоцитов при ОВИН могут быть связаны с недостаточной экспрессией CD40L на Т-хелперах.

Экспрессию CD40L на Т-хелперах мы индуцировали путем совместной активации протеинкиназы C и кальциевых каналов под действием PMA и Ио. Аль-

тернативный путь стимуляции Т-клеток – воздействие на митоген-активируемую протеинкиназу MAPK с помощью обработки ФГА. И в одном, и в другом случае наблюдалась индуцированная экспрессия CD40L на $CD4^+$ -клетках. Однако различий между Т-клетками пациентов с ОВИН и здоровых добровольцев по индукции CD40L не наблюдалось. Мы пришли к выводу, что для исследованных нами вариантов ОВИН экспрессия CD40L не является причиной дефектного функционирования В-клеток. В литературе имеются довольно противоречивые сведения об изменениях экспрессии CD40L при ОВИН. Полученные нами результаты находятся в соответствии с данными, полученными в работе [20], однако противоречат выводам другой публикации [21]. В последней работе авторы отмечают, что наиболее заметные нарушения экспрессии CD40L наблюдались в клетках детей от 7 до 14 лет. Средний возраст обследованных нами пациентов был значительно выше (42 года), возможно, этим объясняются различия в полученных результатах.

Изучение ОВИН до сих пор в основном концентрировалось на определении отдельных субпопуляций В-лимфоцитов [5, 10, 22]. В отношении функциональных тестов при ОВИН имеются только единичные сообщения. В качестве примера можно привести публикацию S. Borte и соавт. [23], в которой было показано, что ИЛ-21/анти-CD40-стимуляция В-лимфоцитов, полученных от пациентов с ОВИН, способна вызывать переключение синтеза IgM на синтез IgG и IgA и обеспечивать дифференцировку в плазматические клетки, секретирующие IgG и IgA. Возможность переключения синтеза Ig у пациентов с ОВИН была нами продемонстрирована с помощью чувствительного теста ELISpot. Наше исследование показало, что В-клетки пациентов с ОВИН способны должным образом реагировать на активирующие стимулы и они сохраняют способность к передаче сигнала по оси ИЛ-21/CD40. Совокуп-

ность полученных нами и литературных данных говорит о том, что при распространенных формах ОВИН ни ИЛ-21, ни CD40L не являются лимитирующими факторами созревания В-клеток и что функциональные дефекты, очевидно, связаны с другими молекулами. Это открывает новые возможности для разработки новых способов лечения пациентов с ОВИН.

Заключение

Таким образом, при стимуляции Т-клеток пациентов с ОВИН с помощью как комбинации РМА и Io, так и ФГА наблюдается выраженная индукция CD40L на CD4⁺-клетках. По способности к индукции CD40L Т-хелперы пациентов с ОВИН не отличаются от соответствующих Т-клеток нормальных добровольцев и патогенез ОВИН не связан с нарушением экспрессии

молекулы CD40L. В-клетки пациентов с ОВИН при стимуляции в системе ИЛ-21/CD40L секретируют в 10 раз меньше IgG, чем В-клетки здоровых добровольцев. В то же время В-клетки пациентов с ОВИН при стимуляции сохраняли способность к переключению синтеза IgM на синтез IgG. Это свидетельствует о том, что при ОВИН ни ИЛ-21, ни CD40L не являются лимитирующими факторами созревания В-клеток и что функциональные дефекты, наблюдаемые при ОВИН, очевидно, связаны с другими молекулами.

Вклад авторов. Сбор и обработка материала – Астахова Е.А., Шилкина А.Б., Бязрова М.Г., Фролов Е.А.; написание текста, редактирование – Филатов А.В., Бязрова М.Г., Латышева Т.В.; окончательный вариант и целостность текста – Филатов А.В., Латышева Е.А.

Литература

1. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract* 2013; 1: 545–56; quiz 557. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.09.015>
2. Maglione P.J., Ko H.M., Beasley M.B., Strauchen J.A., Cunningham-Rundles C. Tertiary lymphoid neogenesis is a component of pulmonary lymphoid hyperplasia in patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol* 2014; 133: 535–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.022>
3. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. *Иммунология*. 2019; 40 (6): 63–76. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-16009>
4. Piqueras B., Lavenu-Bombled C., Galicier L., Bergeson-van der Cruyssen F., Mouthon L., Chevret S. et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23: 385–400. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025373601374>
5. Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G. et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27-IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002; 99: 1544–51. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1544>
6. Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111: 77–85. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744>
7. Bogaert D.J.A., Dullaers M., Lambrecht B.N., Vermaelen K.Y., De Baere E., Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet* 2016; 53: 575–90. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690>
8. Ettinger R., Sims G.P., Fairhurst A.-M., Robbins R., da Silva Y.S., Spolski R. et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 2005; 175: 7867–79. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7867>
9. Avery D.T., Kalled S.L., Ellyard J.I., Ambrose C., Bixler S.A., Thien M. et al. BAFF selectively enhances the survival of plasma blasts generated from human memory B cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 286–97. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI18025>
10. Barbosa R.R., Silva S.L., Silva S.P., Melo A.C., Pereira-Santos M.C., Barata J.T. et al. Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 2014; 34: 573–83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0047-y>
11. Matsuda Y., Haneda M., Kadomatsu K., Kobayashi T. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naive (CD27-) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cell. Immunol.* 2015; 295: 127–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celimm.2015.02.011>
12. Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека in vitro с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. *Иммунология*. 2020; 41 (6): 18–27. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-6-00-00>
13. Filatov A.V., Krotov G.I., Zgoda V.G., Volkov Y. Fluorescent immunoprecipitation analysis of cell surface proteins: A methodology compatible with mass-spectrometry. *J. Immunol. Methods*. 2007; 319: 21–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.09.014>
14. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S. et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12573. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep12573>
15. Berg E.A., Fishman J.B. Labeling antibodies with Cy5-Phycocerythrin. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019; 2019: pdb.prot099317. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099317>
16. Vira S., Mekhedov E., Humphrey G., Blank P.S. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Anal. Biochem* 2010; 402: 146–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.036>
17. Foy T.M., Aruffo A., Bajorath J., Buhlmann J.E., Noelle R.J. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 591–617. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.591>
18. van Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 2–17. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.2>
19. Revy P., Geissmann F., Debré M., Fischer A., Durandy A. Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells. *Eur. J. Immunol* 1998; 28: 3648–54. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3648::AID-IMMU3648>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3648::AID-IMMU3648>3.0.CO;2-U)
20. Kowalczyk D., Macura-Biegun A., Zembala M. The expression of CD40 on monocytes of children with primary humoral immunodeficiencies. *Pediatr. Res.* 2006; 59: 816–9. DOI: <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000219298.96471.18>
21. Brugnani D., Airò P., Lebovitz M., Malacarne F., Ugazio A.G., Notarangelo L.D. et al. CD4⁺ cells from patients with Common Variable Immunodeficiency have a reduced ability of CD40 ligand membrane expression after in vitro stimulation. *Pediatr. Allergy Immunol* 1996; 7: 176–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1996.tb00129.x>
22. Лаберко А.Л., Старичкова Ю.В., Хисматуллина Р.Д., Персианцева М.И., Масчан М.А., Балашов Д.Н., Румянцев А.Г. Оптимизация планирования трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток с использованием информационной системы у детей с первичными иммунодефицитами. *Иммунология*. 2021; 42 (1): 49–59. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-1-49-59>
23. Borte S., Pan-Hammarström Q., Liu C., Sack U., Borte M., Wagner U. et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*. 2009; 114: 4089–98. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-207423>

References

1. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract* 2013; 1: 545–56; quiz 557. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2013.09.015>
2. Maglione P.J., Ko H.M., Beasley M.B., Strauchen J.A., Cunningham-Rundles C. Tertiary lymphoid neogenesis is a component of pulmonary lymphoid hyperplasia in patients with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol* 2014; 133: 535–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.022>
3. Lushova A.A., Zheremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V. B-lymphocyte subsets: functions and molecular markers. *Immunologiya*. 2019; 40 (6): 63–76. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-16009> (in Russian)
4. Piqueras B., Lavenue-Bombled C., Galicier L., Bergeson-van der Cruyssen F., Mouthon L., Chevret S., et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23: 385–400. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025373601374>
5. Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM–IgD–) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*. 2002; 99: 1544–51. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1544>
6. Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E., et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111: 77–85. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744>
7. Bogaert D.J.A., Dullaers M., Lambrecht B.N., Vermaelen K.Y., De Baere E., Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet* 2016; 53: 575–90. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103690>
8. Ettinger R., Sims G.P., Fairhurst A.-M., Robbins R., da Silva Y.S., Spolski R., et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 2005; 175: 7867–79. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7867>
9. Avery D.T., Kalled S.L., Ellyard J.I., Ambrose C., Bixler S.A., Thien M., et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 286–97. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI18025>
10. Barbosa R.R., Silva S.L., Silva S.P., Melo A.C., Pereira-Santos M.C., Barata J.T., et al. Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 2014; 34: 573–83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0047-y>
11. Matsuda Y., Haneda M., Kadomatsu K., Kobayashi T. A proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27–) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen. *Cell. Immunol.* 2015; 295: 127–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celimm.2015.02.011>
12. Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Vasil'eva Yu.V., Prilipov A.G., Filatov A.V. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes in vitro and their characteristics. *Immunologiya*. 2020; 41 (6): 18–27. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-6-00-00> (in Russian)
13. Filatov A.V., Krotov G.I., Zgoda V.G., Volkov Y. Fluorescent immunoprecipitation analysis of cell surface proteins: A methodology compatible with mass-spectrometry. *J. Immunol. Methods*. 2007; 319: 21–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.09.014>
14. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12573. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep12573>
15. Berg E.A., Fishman J.B. Labeling antibodies with Cy5-Phycocerythrin. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019; 2019: pdb.prot099317. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099317>
16. Vira S., Mekhedov E., Humphrey G., Blank P.S. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Anal. Biochem* 2010; 402: 146–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.036>
17. Foy T.M., Aruffo A., Bajorath J., Buhlmann J.E., Noelle R.J. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 591–617. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.591>
18. van Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 2–17. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.2>
19. Revy P., Geissmann F., Debré M., Fischer A., Durandy A. Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells. *Eur. J. Immunol* 1998; 28: 3648–54. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3648::AID-IMMU3648>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3648::AID-IMMU3648>3.0.CO;2-U)
20. Kowalczyk D., Macura-Biegun A., Zembala M. The expression of CD40 on monocytes of children with primary humoral immunodeficiencies. *Pediatr. Res.* 2006; 59: 816–9. DOI: <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000219298.96471.18>
21. Brugnani D., Airò P., Lebovitz M., Malacarne F., Ugazio A.G., Notarangelo L.D., et al. CD4+ cells from patients with Common Variable Immunodeficiency have a reduced ability of CD40 ligand membrane expression after in vitro stimulation. *Pediatr. Allergy Immunol* 1996; 7: 176–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1996.tb00129.x>
22. Laberko A.L., Starichkova Yu.V., Khismatullina R.D., Persiantseva M.I., Maschan M.A., Balashov D.N., Rumyantsev A.G. Optimization of hematopoietic stem cell transplantation planning using medical information system in children with primary immunodeficiencies. *Immunologiya*. 2021; 42 (1): 49–59. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-1-49-59> (in Russian)
23. Borte S., Pan-Hammarström Q., Liu C., Sack U., Borte M., Wagner U., et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*. 2009; 114: 4089–98. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-207423>

Сведения об авторах

Астахова Екатерина Андреевна – мл. науч. сотр. лаб. иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; аспирант каф. иммунологии ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: ast_kat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4737-5892>

Фролов Евгений Александрович – мл. науч. сотр. отд. иммунопатологии взрослых ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. Москва, Российская Федерация
E-mail: frolovevgeny@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0800-5960>

Шилкина Анна Борисовна – интерн ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: anyuta.spiridonowa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4229-3377>

Authors' information

Ekatereina A. Astakhova – Junior Researcher of the Immunochimistry Lab., NRC Institute of Immunology FMBA of Russia; PhD Student of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: ast_kat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4737-5892>

Evgeniy A. Frolov – Junior Researcher of the Adult Immunopathology Dept., NRC Institute of Immunology FMBA Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: frolovevgeny@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0800-5960>

Anna B. Shilkina – Internist, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: anyuta.spiridonowa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4229-3377>

Бязрова Мария Георгиевна – мл. науч. сотр. лаб. иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; асп. каф. иммунологии ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова; ассистент каф. иммунологии ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация
E-mail: mbyazrova@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9858-7596>

Латышева Елена Александровна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд. иммунопатологии взрослых ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ealat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1606-205X>

Латышева Татьяна Васильевна – д-р мед. наук, проф., рук. отд. иммунопатологии взрослых и интенсивной терапии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: tvlat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1508-0640>

Филатов Александр Васильевич – д-р биол. наук, проф., зав. лаб. иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; проф. каф. иммунологии биол. факультета ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: avfilat@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

Maria G. Byazrova – Junior Researcher of the Immunochemistry Lab., NRC Institute of Immunology FMBA of Russia; PhD Student of M.V. Lomonosov Moscow State University; Assistant of RUDN University of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: mbyazrova@list.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9858-7596>

Elena A. Latysheva – MD, PhD, Senior Researcher of the Immunopathology Dept., NRC Institute of Immunology FMBA Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ealat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1606-205X>

Tatiana V. Latysheva – MD, PhD, Prof., Head of the Immunopathology and Intensive Care Depts, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: tvlat@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1508-0640>

Alexander V. Filatov – Dr. Sci., PhD, Prof., Head of the Immunochemistry Lab., NRC Institute of Immunology FMBA of Russia; Prof. Immunology Chair, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation
E-mail: avfilat@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>