



УДК 616-097;615.917;616.248

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ БЕНЗО(*a*)ПИРЕНА НА ПРОДУКЦИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE СВЯЗАНО С ФОРМИРОВАНИЕМ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ЭКСТРАФолликулярной АКТИВАЦИЕЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В ТКАНИ ЛЕГКИХ

© 2024 г. Д. Б. Чудаков*,[#], О. А. Шустова*, М. А. Стрельцова*, А. А. Генералов*, Р. А. Величинский*, О. Д. Коцарева*, Г. В. Фаттахова*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.01.2024 г.

После доработки 20.01.2024 г.

Принята к публикации 21.01.2024 г.

Несмотря на достаточно большое количество работ, посвященных поиску механизмов формирования IgE-продуцирующих В-лимфоцитов, вопрос об относительном вкладе В-лимфоцитов герминальных центров и экстрафолликулярных фокусов в этот процесс еще остается дискуссионным. Особенно актуально изучение механизмов стимуляции аллергического иммунного ответа под действием аэрополлютантов. Целью работы было изучить связь адъювантного воздействия аэрополлютанта бензо(*a*)пирена (BaP) на продукцию специфического IgE в новой низкодозовой модели аллергии с изменением субпопуляционного состава В-лимфоцитов в ткани места иммунизации и вторичных лимфоидных органах. Мышей линии BALB/с иммунизировали интраназально в течение 9 недель низкой (0.3 мкг) дозой антигена овальбумина. Части животных вместе с антигеном вводили BaP в дозе 4 нг. Животных забивали на разные сроки (3 и 9 недель), проводили забор крови и анализировали субпопуляционный состав В-лимфоцитов и плазматических клеток методом проточной цитометрии. BaP достоверно стимулировал продукцию аллерген-специфического IgG₁ на раннем (3 недели) сроке и аллерген-специфического IgE на позднем (9 недель) сроке, а также повышал содержание В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ и их предшественников CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ в селезенке на раннем и позднем сроках, но не в легких и не в региональных лимфатических узлах. Под действием BaP также повышалось содержание экстрафолликулярных плазматических фенотипов CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ и CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ в селезенке на раннем сроке и в ткани легких на позднем сроке. В селезенке BaP повышал содержание CD138⁺CD19⁺B220⁺ и CD138⁺CD19⁺B220⁺ зрелых плазматических клеток, а в региональных лимфоузлах – содержание CD138⁺CD19⁺B220⁺ незрелых плазматических клеток на позднем сроке. Адъювантное действие BaP на продукцию специфического IgE был в большей степени связан со стимуляцией формирования герминальных центров в селезенке и с экстрафолликулярной активацией В-лимфоцитов в ткани легких.

Ключевые слова: IgE, бензо(*a*)пирен, гуморальный ответ, герминальные центры, экстрафолликулярный ответ, плазматические клетки

DOI: 10.31857/S0132342324060106, EDN: NEWCLK

ВВЕДЕНИЕ

В качестве одной из главных причин повсеместного роста в последние десятилетия частоты встречаемости заболеваний, связанных с продукцией IgE на безвредные антигены, на-

зывают рост содержания аэрополлютантов в воздухе мегаполисов и промышленно развитых регионов [1]. Наибольшее внимание при этом уделяют частицам – продуктам неполного сгорания дизельного топлива [2–4]. Данные час-

Сокращения: ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ЧДТ – частицы дизельного топлива; BaP – бензо(*a*)-пирен; OVA – овальбумин.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-40-11; эл. почта: boris-chudakov@yandex.ru).

тицы обычно имеют размер $\sim 0.1\text{--}2.5$ мкм и состоят из углеродного ядра, на котором адсорбированы различные углеводороды, в том числе полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), их полихлорированные и нитропроизводные, тяжелые металлы и т.д. [2, 5]. Именно ПАУ – один из основных действующих токсических компонентов подобных частиц, обуславливающих их сильный адьювантное действие на формирование 2-го типа иммунного ответа и аллергического воспаления [6–10]. Было установлено, что введение животным прототипного ПАУ бензо(а)пирена способно запускать формирование аллергического воспаления, причем в этих работах было достаточно пикомолярного количества данного поллютанта [11–13].

Для разработки новых методов этиотропной терапии IgE-зависимых патологий, в том числе вызываемых аэрополлютантами, необходимо точное знание о связи формирования продукции специфического IgE с активацией различных субпопуляций В-лимфоцитов. К сожалению, несмотря на достаточно большое количество работ, посвященных этому вопросу, он еще остается дискуссионным. Результаты сильно зависят от дизайна клинического исследования и используемой модели лабораторных животных. Согласно классической точке зрения, формирование В-лимфоцитов и плазматических клеток, экспрессирующих В-клеточный рецептор и(или) секретирующих антитела, отличные от изотипов IgM и IgD, происходит в герминальных центрах [14]. Однако в работах начала 2010-х гг. выяснилось, что IgE⁺ В-лимфоциты, появляющиеся в герминальных центрах на ранних стадиях формирования данных структур, быстро исчезают оттуда по мере их созревания, поскольку происходит быстрая дифференцировка подобных клеток в плазматические клетки [15] либо их апоптоз [16]. Действительно, мастер-регулятором развития герминальных центров и фактором, обеспечивающим выживаемость В-лимфоцитов в этих структурах, является транскрипционный репрессор Bcl6 [17]. Однако этот фактор одновременно подавляет переключение на IgE, в особенности прямое, с изотипа IgM [18]. Вследствие неравного распределения этого фактора между разными дочерними клетками при делении центробластов герминального центра некоторые клетки могут получать меньшее количество

этого фактора [19]. Однако они, очевидно, будут также подвержены апоптозу или выходу из реакции герминального центра. Ряд работ показывает, что хотя герминальные центры и нужны для получения высокоаффинных антител в ходе соматического гипермутагенеза, само переключение изотипов может происходить и в клетках-предшественниках герминальных центров или в экстрафолликулярных фокусах [20, 21]. Действительно, большинство последних клинических данных показывает, что локальное переключение изотипов на IgE связано именно с экстрафолликулярным В-клеточным ответом [22–24]. Кроме того, исследование клеточного транскриптома IgE⁺ плазматических клеток показало их сходство в большей степени с не полностью зрелыми короткоживущими плазматобластами экстрафолликулярного ответа [25]. Длительную персистенцию IgE в организме больных объясняют в таких случаях постоянным появлением новых IgE⁺-клеток из IgG₁⁺-клеток (IgG₄ у человека) в ходе последовательного переключения изотипов [26, 27], которое может и не сопровождаться появлением новых герминальных центров.

С другой стороны, имеются и прямо противоположные данные, например, на клетках *ex vivo*, согласно которым именно клетки герминальных центров склонны к переключению на синтез IgE [28, 29]. Клонирование В-клеточного рецептора изотипа IgE из клеток, выделенных из организма больных пищевой аллергией, показало их высокую аффинность [30], что указывает в пользу их происхождения в реакции герминального центра. Некоторые новые данные на модели с использованием лабораторных животных показали, что формирование высокоаффинных анафилактогенных IgE-антител происходит в ходе реакции герминального центра [31]. Также показана возможность формирования длительно персистирующих плазматических клеток при хроническом попадании антигена в организм через барьерный эпителий [32]. Это может свидетельствовать о роли герминальных центров в процессе, поскольку именно эти структуры связывают с формированием долгоживущих плазматических клеток [30].

Прямое изучение IgE⁺ В-лимфоцитов затруднено как в связи с их малочисленностью, так и с наличием на поверхности большинства IgE⁺ В-лимфоцитов рецептора к растворимому IgE,

что затрудняет детекцию “истинных” IgE⁺ В-лимфоцитов [26]. В этой связи важную роль приобретают косвенные методики, например, анализ связи продукции IgE с содержанием разных В-клеточных субпопуляций.

На сегодняшний день в литературе нет информации об исследованиях, в которых анализировалась бы связь продукции IgE, индуцируемой аэрополлютантами, с содержанием разных В-лимфоцитарных субпопуляций локально, в месте попадания аллергена, и системно, во вторичных лимфоидных органах. Целью настоящей работы было по возможности устранить данный пробел и определить связь адьювантного эффекта BaP с содержанием различных В-клеточных субпопуляций в месте попадания аллергена (ткани легких), лимфатических узлах и селезенке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, BaP как основной действующий компонент ЧДТ способен самостоятельно вызывать индукцию локального аллергического воспаления и продукцию аллер-

ген-специфических антител [11–13]. В ходе данной работы нами было произведено многократное, дважды в неделю в течение 9 недель, интраназальное введение модельного антигена OVA в низкой (0.3 мкг) дозе в отсутствие и в присутствии 4 нг BaP. Действительно, согласно представленным на рис. 1 и табл. 1 данным, продукция OVA-специфических антител достоверно усиливалась под воздействием BaP. Продукция аллерген-специфических IgE формировалась только на позднем сроке (63-и сутки) и только при совместном введении антигена и BaP. В отсутствие поллютанта формирование продукции специфического IgE не отмечалось при сравнении с интактной группой (рис. 1а). В то же время продукция специфического IgG₁ под действием BaP на позднем сроке формировалась со схожей интенсивностью в группах, иммунизированных как в присутствии BaP, так и без него. Однако на раннем сроке было отмечено достоверное стимулирующее воздействие BaP на продукцию антител данного субкласса (рис. 1б).

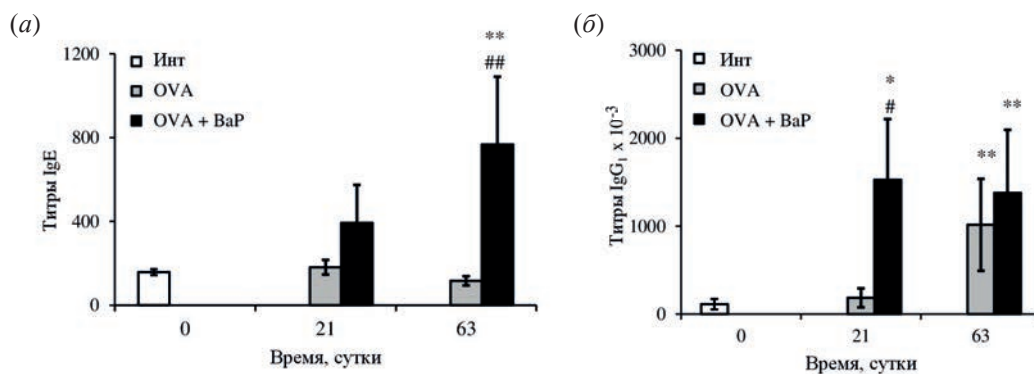


Рис. 1. Гуморальный ответ у мышей линии BALB/c на ранний и поздний срок. Титры специфических антител класса IgE (а) и IgG₁ (б) у мышей линии BALB/c – интактных (Инт) или иммунизированных интраназально антигеном овальбумином (OVA) без бензо(а)пирена либо овальбумином с бензо(а)пиреном (OVA + BaP) в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

Таблица 1. Титры специфических IgE и IgG₁ антител у животных после иммунизации антигеном OVA в отсутствие стимулов и в присутствии бензо(а)пирена

Срок иммунизации, дни	Группа, протокол	Титры IgE	Титры IgG ₁
0	Интактные	150 ± 15	110 ± 60
21	OVA	180 ± 30	180 ± 110
	OVA + BaP	390 ± 180	1500 ± 700*, #
63	OVA	120 ± 20	1000 ± 500**
	OVA + BaP	800 ± 300**, ##	1400 ± 700**

*/** $p < 0.05/0.01$ (достоверности отличий между указанной группой и интактными животными).

$p < 0.05/0.01$ (достоверности отличий между указанной группой, иммунизируемой с BaP, и аналогичной группой без BaP).

Для выявления связи адъювантного эффекта поллютанта с различными механизмами В-лимфоцитарной активации (герминальные центры или экстрафолликулярный ответ) была проведена проточная цитометрия образцов клеток, взятых из ткани легких, региональных лимфатических узлов и селезенки. Анализ субпопуляций осуществляли по схеме, представленной на рис. 2. Согласно полученным данным, интраназальное введение антигена увеличивало содержание клеток $B220^{+}CD38^{+}CD95^{+}$ в $CD19^{+}$ В-лимфоцитах легких на позднем сроке (63-и сутки) (рис. 3а). Эти клетки представляли собой предшественников герминальных центров [33]. Несмотря на это, содержание В-лимфоцитов герминальных центров фенотипа $B220^{+}CD38^{-}CD95^{+}$ в В-лимфоцитах легких, напротив, снижалось. ВаР не оказывал влияния на процентное соотношение данных субпопуляций В-лимфоцитов в легких. Содержание В-лимфоцитов – предшественников герминальных центров – достоверно возрастало под действием

антигена также на раннем сроке (21-е сутки) в региональных лимфатических узлах. При этом ВаР достоверно оказывал сильный стимулирующее воздействие на накопление В-лимфоцитов – предшественников герминальных центров в селезенке на раннем и позднем сроках, но не в региональных лимфатических узлах (рис. 3б, 3в). В региональных лимфатических узлах отмечали небольшое, но достоверное, снижение содержания В-лимфоцитов фенотипа герминального центра на раннем сроке в группе, иммунизированной с ВаР (рис. 3д). Интраназальное введение антигена без ВаР стимулировало небольшое достоверное накопление В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров в селезенке. Однако введение ВаР с антигеном значительно усиливало это накопление (рис. 3е). Хотя наибольшей интенсивности эффект ВаР + достигал на позднем сроке (содержание В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров под действием поллютанта увеличивалось приблизительно на порядок),

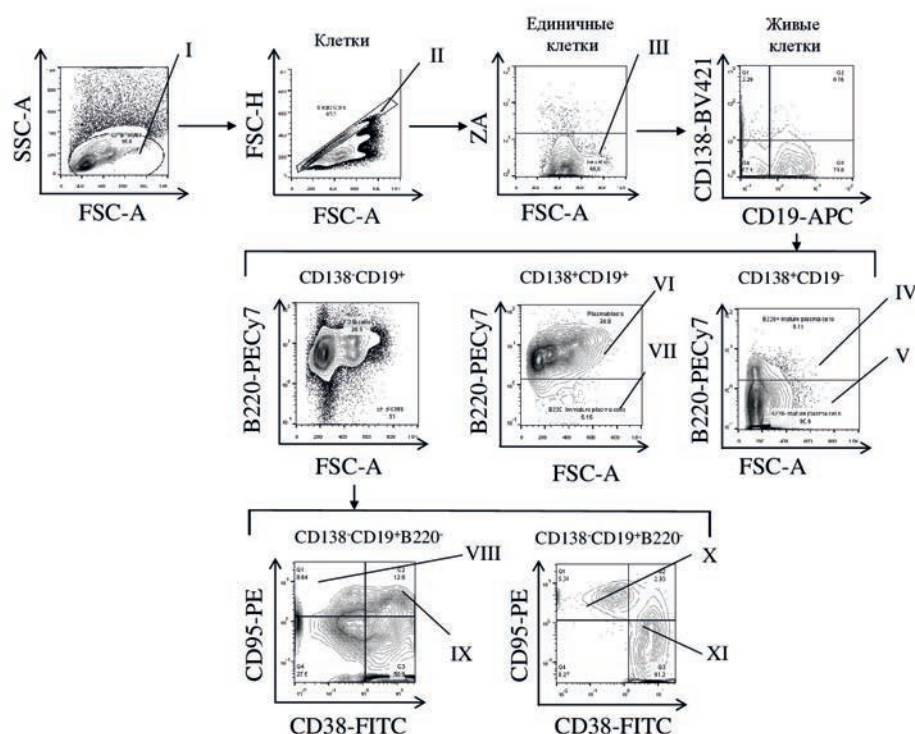


Рис. 2. Стратегия анализа субпопуляций В-лимфоцитов и плазматических клеток. Цифрами обозначены следующие субпопуляции, упомянутые в статье: I – лимфоидные клетки в целом; II – единичные клетки; III – живые клетки; IV – $CD138^{+}CD19^{-}B220^{+}$ зрелые плазматические клетки; V – $CD138^{+}CD19^{-}B220^{-}$ зрелые плазматические клетки; VI – $CD138^{+}CD19^{+}B220^{+}$ плазмабласты; VII – $CD138^{+}CD19^{+}B220^{-}CD19^{+}$ незрелые плазматические клетки; VIII – $CD38^{-}CD95^{+}B220^{-}CD19^{+}$ активированные плазмабласты экстрафолликулярного ответа; IX – $CD38^{+}CD95^{+}B220^{-}CD19^{+}$ активированные плазмабласты экстрафолликулярного ответа; X – $CD38^{-}CD95^{+}B220^{+}CD19^{+}$ В-лимфоциты герминальных центров; XI – $CD38^{+}CD95^{+}B220^{+}CD19^{+}$ предшественники В-лимфоцитов герминального центра.

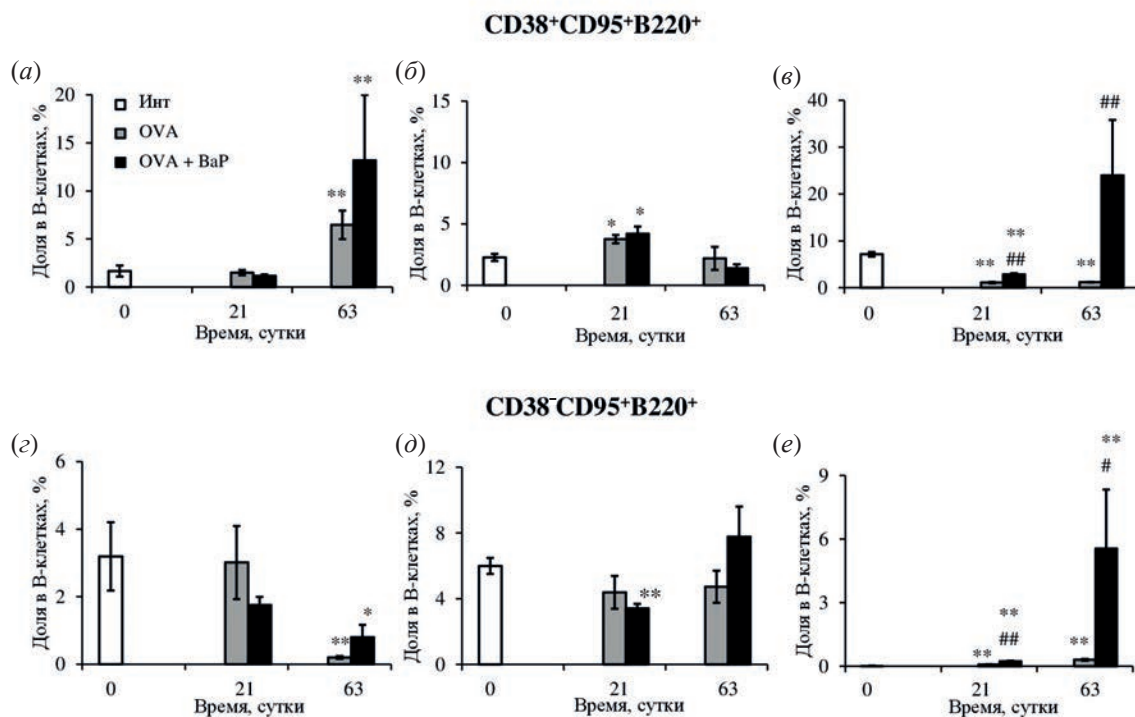


Рис. 3. Содержание субпопуляций фолликулярно активированных В-лимфоцитов у мышей на разные сроки. Доля В-лимфоцитов – предшественников клеток герминального центра $CD38^{+}CD95^{+}B220^{+}CD19^{+}$ (а–в) и собственно В-лимфоцитов герминального центра $CD38^{-}CD95^{+}B220^{+}CD19^{+}$ (з–е) в $CD19^{+}$ В-лимфоцитах ткани легких (а, з), региональных лимфатических узлов (б, д) и селезенки (в, е) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с ВаР и без него.

эффект был достоверен и в образцах, взятых от мышей на раннем сроке. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае В-лимфоцитов – предшественников герминальных центров, отличавшихся сохранявшейся экспрессией CD38 (рис. 3в, 3е). Таким образом, имеется связь между влиянием ВаР на продукцию антител и накоплением клеток герминальных центров и их предшественников в региональных лимфоузлах и легких.

Интраназальное введение антигена в отсутствие дополнительных стимулов не оказывало влияния на изменение субпопуляционного состава и содержания активированных $CD38^{-}CD95^{+}B220^{-}$ и $CD38^{+}CD95^{+}B220^{-}$ плазмбластов [34] в общем пуле В-лимфоцитов легких (рис. 4а, 4з). Введение OVA достоверно повышало содержание этих клеток в региональных лимфатических узлах в образцах, взятых от животных на раннем сроке (рис. 4б, 4д). Кроме того, наблюдали достоверное увеличение содержания $CD38^{-}CD95^{+}B220^{-}$ плазмбластов на раннем и позднем сроках им-

мунизации в селезенке под действием антигена. В отношении $CD38^{+}CD95^{+}B220^{+}$ плазмбластов селезенки подобное наблюдали на раннем сроке (рис. 4в, 4е). Введение ВаР достоверно и заметно (в ~2–3 раза) повышало содержание субпопуляций активированных плазмбластов в селезенке, но не региональных лимфатических узлах, на раннем сроке (рис. 4в, 4е). В образцах легких, взятых у мышей на позднем сроке, когда происходило формирование продукции IgE, наблюдали повышение содержания активированных плазмбластов в ткани легких, которое было достоверно для $CD38^{-}CD95^{+}B220^{-}$ субпопуляции (рис. 4а, 4з). Хотя поллютант не оказал значительного влияния на накопление субпопуляций $CD38^{+}CD95^{+}B220^{-}$ плазмбластов в региональных лимфоузлах по сравнению с группами мышей, иммунизированных без него, именно в группах с поллютантом сохранилось их повышенное содержание, наблюдавшееся на всех сроках иммунизации по сравнению с интактными животными (рис. 4б). Полученные данные указывают на

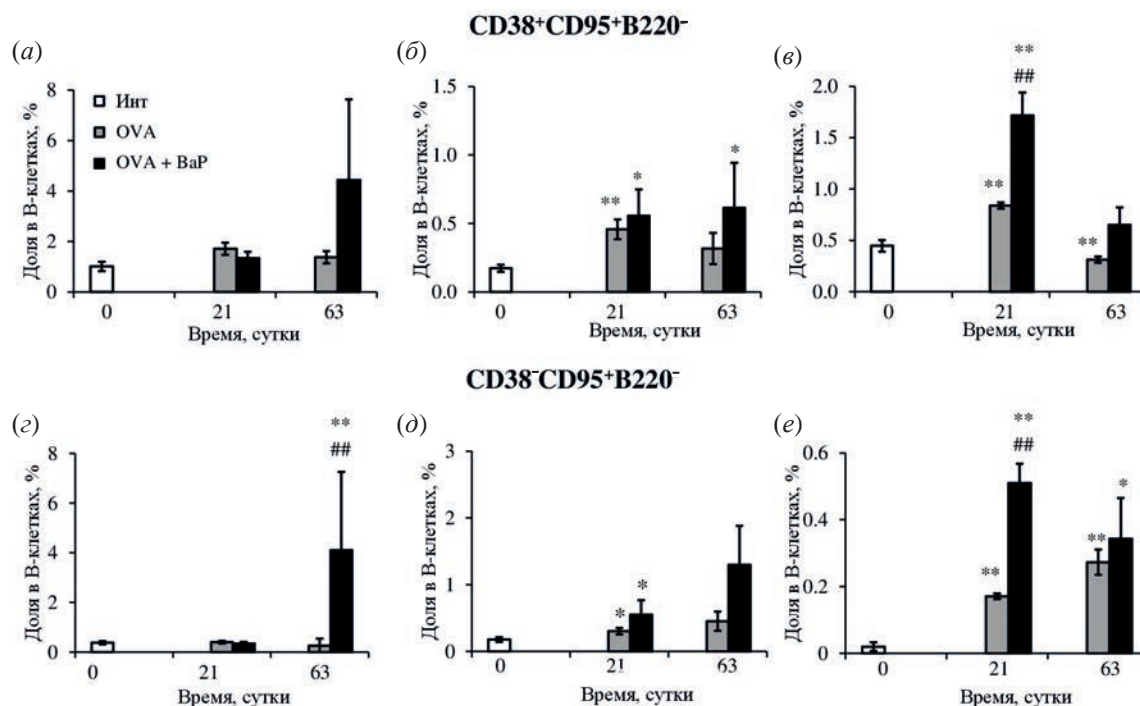


Рис. 4. Содержание субпопуляций экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов у мышей на разные сроки. Доля различных субпопуляций экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов – CD38⁺CD95⁺B220⁻CD19⁺ (a–в) и CD38⁻CD95⁺B220⁻CD19⁺ (z–e) в CD19⁺ В-лимфоцитах ткани легких (a, z), региональных лимфатических узлов (б, d) и селезенки (в, e) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности различий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

связь адьювантного воздействия BaP на продукцию специфического IgE, сформировавшуюся на позднем сроке, с накоплением экстрафолликулярно активированных плазмбластов локально, в ткани легких. Также существовала связь между адьювантным влиянием на продукцию специфического IgG₁ на раннем сроке иммунизации с усилением накопления под влиянием BaP экстрафолликулярно активированных плазмбластов в селезенке на том же сроке.

Часть субпопуляции плазматических клеток даже после “созревания” и утраты экспрессии CD19 продолжает экспрессировать маркер B220, отличия плазматических клеток B220⁺ от B220⁻ пока не полностью понятны [35]. По ряду данных, фракция B220⁻CD138⁺ плазматических клеток включает в себя больше долгоживущих плазматических клеток, чем B220⁺ [36]. Под действием антигена происходило снижение содержания CD19⁻CD138⁺B220⁺ зрелых плазматических клеток в ткани легких и в региональных лимфатических узлах на позднем сроке (рис. 5a, 5б). На-

против, антиген индуцировал накопление этой субпопуляции зрелых плазматических клеток в селезенке на обоих сроках, причем на позднем сроке процесс стимулировался BaP (рис. 5в). В отношении субпопуляции CD19⁻CD138⁺B220⁻, которую с осторожностью можно назвать более долгоживущей субпопуляцией зрелых плазматических клеток, чем предыдущая, закономерности были во многом сходны. Антиген уменьшал их содержание на позднем сроке в ткани легких и региональных лимфоузлах. Однако на раннем сроке в этих органах наблюдали рост их содержания (рис. 5z, 5d). Как и в прошлом случае, антиген стимулировал накопление данных субпопуляций в селезенке на раннем сроке, а на позднем сроке BaP усиливал этот процесс (рис. 5e).

Лимфоциты фенотипа CD138⁺CD19⁺B220⁺ соответствуют по фенотипу терминально дифференцированным, но способным к делению короткоживущим плазмбластам, формируемым в экстрафолликулярных фокусах [37]. Согласно полученным данным, под воздействием антигена

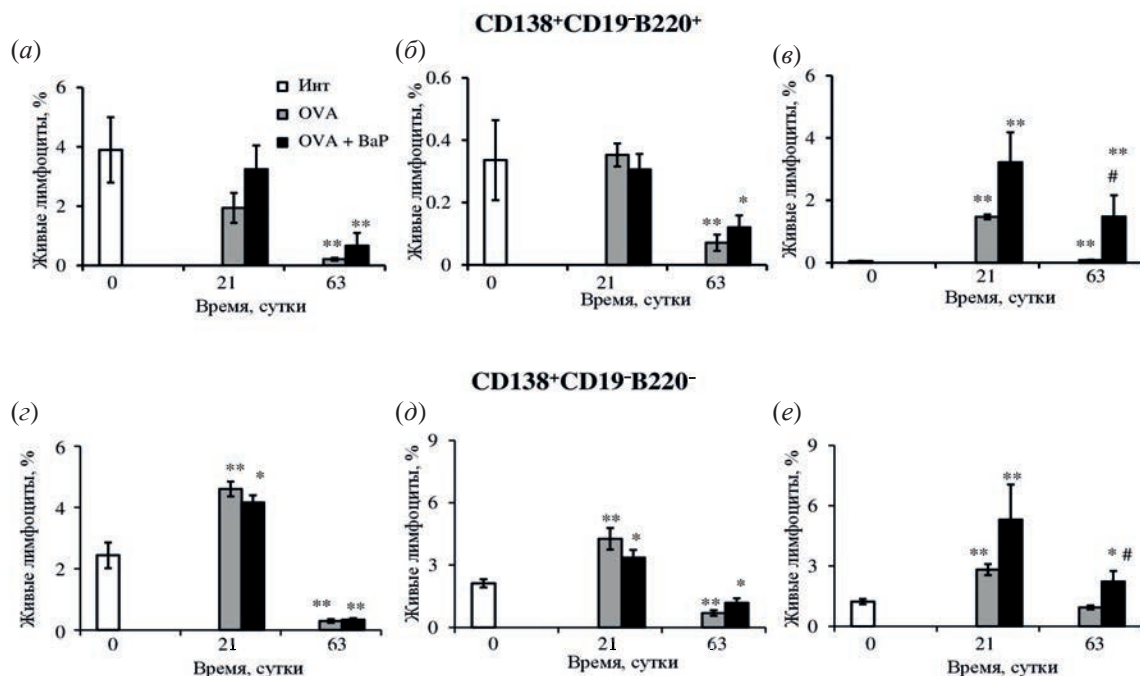


Рис. 5. Содержание субпопуляций зрелых плазматических клеток у мышей на разные сроки. Доля субпопуляций зрелых CD138⁺CD19⁻ плазматических клеток, имеющих высокий (а–в) и низкий (г–е) уровень экспрессии B220 в живых лимфоидных клетках ткани легких (а, г), региональных лимфатических узлов (б, д) и селезенки (в, е) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

происходит увеличение содержания плазмобластов фенотипа CD138⁺CD19⁺B220⁺ в клетках региональных лимфатических узлов и селезенки на раннем сроке, которое при более длительной иммунизации снижается, оставаясь выше уровня у интактных мышей, в случае с селезенкой (рис. 6в), или ниже, в случае с региональными лимфоузлами (рис. 6б). Подобного роста не наблюдается в случае с образцами ткани легких (рис. 6а, 6г). Интересно, что нами была также обнаружена субпопуляция CD138⁺CD19⁺B220⁻ незрелых плазматических клеток. Введение антигена усиливает их накопление в региональных лимфатических узлах и селезенке в основном на раннем сроке (рис. 6е). Введение BaP несколько снижало антиген-индуцированное накопление плазмобластов и в селезенке, и в лимфоузлах. При этом на позднем сроке BaP усиливал накопление данной субпопуляции только в региональных лимфатических узлах (рис. 6д, 6е). В ткани легких в группе, иммунизированной антигеном и BaP, наблюдали содержание этих клеток на раннем сроке, а в группе, иммунизированной антигеном без BaP, – на позднем сроке

(рис. 6г). Воздействие BaP на продукцию специфического IgE, таким образом, было связано как с влиянием на накопление к позднему сроку субпопуляций зрелых CD19⁻CD138⁺ плазматических клеток в селезенке, так и с накоплением незрелых плазматических клеток фенотипа CD19⁺CD138⁺B220⁻ региональных лимфоузлов.

В нашей прошлой работе нами было установлено, что ЧДТ способны индуцировать продукцию специфического IgE при введении как с высокими, так и с низкими дозами антигена [38]. В настоящей работе нами получены данные, согласно которым BaP, прототипный ПАУ, также стимулировал продукцию специфического IgE (на позднем сроке) и IgG1 (на более раннем сроке) при интраназальном введении с антигеном. Это вполне согласуется с работами, согласно которым именно ПАУ – основные действующие компоненты ЧДТ (частиц дизельного топлива) [6–10], и их введение самих по себе способно стимулировать локальное аллергическое воспаление [11–13].

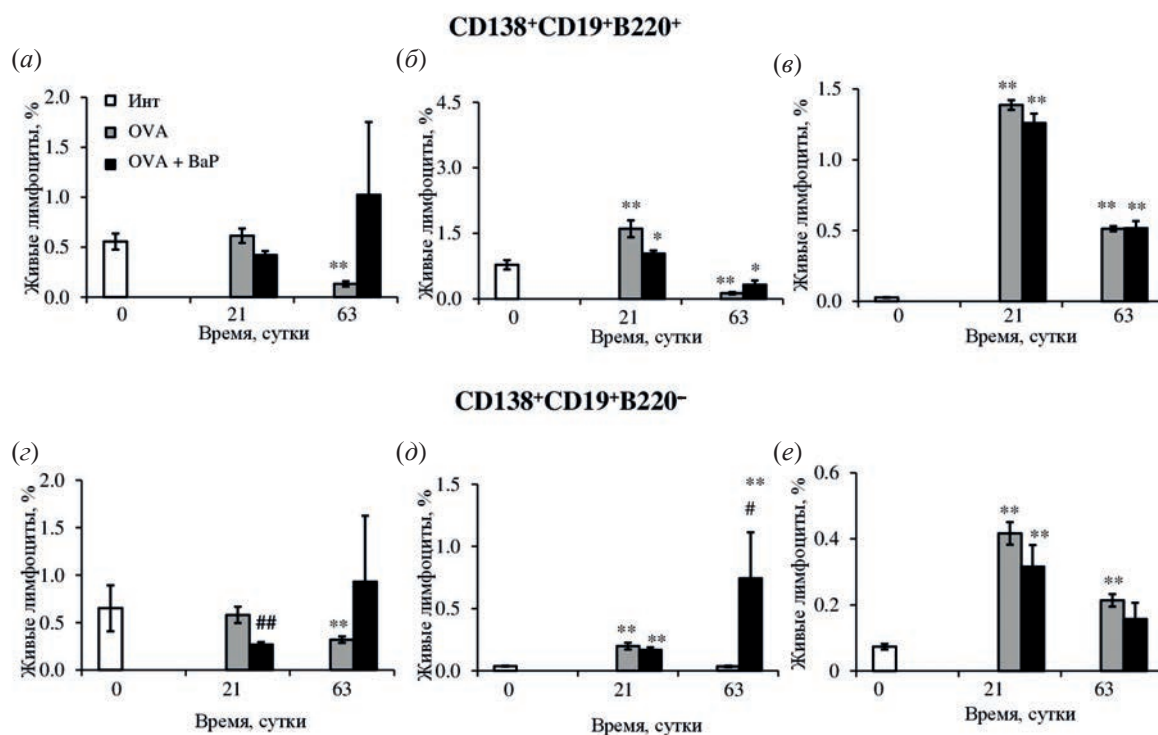


Рис. 6. Содержание субпопуляций незрелых плазматических клеток у мышей на разные сроки. Доля субпопуляций незрелых CD138⁺CD19⁺ плазматических клеток, имеющих высокий (а–в) и низкий (г–е) уровень экспрессии B220 в живых лимфоидных клетках ткани легких (а, г), региональных лимфатических узлов (б, д) и селезенки (в, е) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

В ряде работ [22–24, 39] была показана важная роль локального переключения изотипов в продукции специфического IgE у больных с астмой и аллергическим ринитом. В данной работе удалось установить, что под действием BaP наблюдается накопление на позднем сроке CD38⁺CD95⁺B220⁺CD19⁺ экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов в легких, но не во вторичных лимфоидных органах. В нашей прошлой работе [40] было выдвинуто предположение, что эти лимфоциты, напоминающие своим фенотипом клетки герминального центра, представляют собой экстрафолликулярно активированные плазмабласты, взаимодействующие с экстрафолликулярными Т-хелперами. В результате активации CD40-рецептора на В-лимфоцитах происходит подъем уровня экспрессии CD95 [41], а снижение уровня экспрессии CD38 может свидетельствовать об их дифференцировке в зрелые плазматические клетки [42]. Сочетание поверхностной экспрессии CD19 с отсутствием поверхностной экспрессии B220 и CD138 указывает тем не менее на природу этих клеток как ранних плазмаблас-

тов [33]. Однако в данном случае связь продукции специфического IgE этой субпопуляцией экстрафолликулярно активированных плазмабластов вызывает сомнение, поскольку продукция специфического IgE на позднем сроке не была связана с накоплением в ткани легких зрелых CD138⁺CD19⁺ плазматических клеток, что может свидетельствовать о неблагоприятных условиях для их формирования в ткани. Несмотря на то что антиген индуцировал накопление в ткани легких CD38⁺CD95⁺B220⁺CD19⁺ В-лимфоцитов, являющихся по фенотипу предшественниками герминальных центров [34], накопление В-клеток собственно герминальных центров (CD38⁺CD95⁺B220⁺CD19⁺) не происходило, и BaP никак не влиял на этот процесс. Это согласуется с данными нашей прошлой работы, в которой BaP стимулировал локальное переключение в легких, активируя экстрафолликулярный иммунный ответ, но не формирование герминальных центров [38].

Согласно данным настоящей работы, влияние BaP на субпопуляционный состав В-лимфоцитов проявляется в основном в селезенке. Введе-

ние антигена стимулировало накопление В-лимфоцитов фенотипа герминального центра $CD38^-CD95^+B220^+CD19^+$ в селезенке. Аэрополлютант ВаР значительно и достоверно увеличивал их содержание как на раннем, так и на позднем сроке, а также увеличивал содержание предшественников В-лимфоцитов фенотипа герминального центра $CD38^+CD95^+B220^+CD19^+$. Именно в селезенке происходило увеличение процентного содержания $CD138^+CD19^-$ зрелых плазматических клеток, в региональных лимфатических узлах происходило только накопление одной из субпопуляций незрелых плазматических клеток ($CD138^+CD19^+B220^-$). Данные о накоплении зрелых плазматических клеток параллельно с накоплением В-лимфоцитов герминального центра позволяют предположить, что основные события, связанные с адьювантным влиянием поллютанта на продукцию IgE, происходят в селезенке (а не в ткани легких, где усиление накопления плазматических клеток под действием ВаР не наблюдалось). Хотя введение антигена приводило к накоплению в региональных лимфоузлах некоторых субпопуляций активированных В-лимфоцитов, этот процесс не был связан с адьювантным эффектом ВаР. Полученные данные находятся в противоречии с рядом литературных данных, согласно которым вводимый интраназально антиген сначала транспортируется в лимфатические узлы и лишь затем переносится в селезенку как с помощью дендритных клеток [43, 44], так и В-лимфоцитов [45]. С другой стороны, наши данные согласуются с результатами работы, в которой В-клетки переносили антиген из легких одновременно как в дренирующие легкие лимфатические узлы, так и в селезенку [46]. Это происходит в том случае, если В-лимфоциты переносят антиген на своих В-клеточных рецепторах, имеющих к нему низкое сродство [46]. В таком случае должна иметь место миграция В-лимфоцитов из ткани легких в селезенку. Косвенно это подтверждается уменьшением под действием антигена содержания в легких В-лимфоцитов фенотипа герминального центра. Действительно, можно предположить, что именно В-лимфоциты играют основную роль на ранних стадиях как клетки, первые воспринимающие антиген [47] и иногда переносящие его из легких в другие органы, что было отмечено в ряде работ [45, 46, 48], особенно если использовали низкие дозы антигена [47]. Другое объяснение селективности эффекта поллютанта в отношении накопления

зрелых плазматических клеток и клеток фенотипа герминальных центров именно в селезенке может объясняться наличием там особых субпопуляций цитокин-продуцирующих и антиген-презентирующих клеток. Так, в условиях воспалительной реакции в селезенке могут формироваться особые $CD11b^+Gr1^+$ миелоидные клетки, которые стимулируют формирование долгоживущих плазматических клеток [49], в свою очередь, способных стимулировать дифференцировку Т-фолликулярных хелперов [50] и, следовательно, герминальных центров. Однако пока это описано только в условиях аутоиммунной патологии. Имеют ли данные процессы место в настоящей модели, предстоит выяснить в дальнейших работах.

С другой стороны, имеются также данные о том, что антиген из легких в селезенку могут доставлять и дендритные клетки [51]. Роль В-лимфоцитов и дендритных клеток в переносе антигена в селезенку также еще предстоит выяснить в следующих работах.

Исходя из данных нашей работы, эффект ВаР мог быть связан как с накоплением В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров (селезенка), так и с экстрафолликулярной активацией (легкие). Однако, поскольку эффект ВаР в первом случае проявлялся как на раннем, так и на позднем сроке и имел место в отношении двух субпопуляций, а не одной, первое предположение более достоверно. Под действием антигена в отсутствие ВаР происходило накопление как $CD38^-CD95^+B220^-$, так и $CD38^+CD95^+B220^+$ плазмбластов, а ВаР на 21-е сутки усиливал их содержание в селезенке. Все же влияние на их количество на позднем сроке (63-и сутки) в центральных лимфоидных органах, когда непосредственно происходила достоверная продукция IgE, поллютант не оказывал. Поэтому исходя из кинетики продукции антител логичнее предположить, что действие ВаР на экстрафолликулярную активацию В-лимфоцитов было скорее связано с его адьювантным воздействием на продукцию специфического IgG₁ на раннем сроке. Такая точка зрения косвенно подтверждалась стимулирующим влиянием ВаР преимущественно на накопление зрелых плазматических клеток, формирующихся в герминальном центре [14], но не незрелых плазмбластов экстрафолликулярного ответа. Связь ВаР с некоторым накоплением на позднем сроке экстра-

фолликулярно активированных плазмбластов в легких, но не в других органах, выглядит сомнительно еще и в связи с отсутствием связанного с этим накопления в ткани легких плазматических клеток. Надо полагать, что условия для их формирования и(или) персистенции в легких были неблагоприятны.

Полученные результаты согласуются с рядом литературных данных, согласно которым формирование продукции IgE так или иначе связано с реакцией герминальных центров [28, 29, 31], и вступают в противоречие с рядом клинических работ и с нашими собственными данными, полученными ранее на модели с использованием иммунизации в область холки, подкожная жировая клетчатка которой богата тканеассоциированными лимфоидными кластерами [22–24]. В той работе нами был показан преимущественно локальный характер ранних стадий аллергического иммунного ответа и его связь с экстрафолликулярной В- и Т-клеточной активацией [40]. Однако, поскольку модели в этих двух работах были существенно разные как по методике (в настоящей работе интраназально, в предыдущей подкожно), так и по использованию адьюванта (в настоящей работе BaP, в прошлой – без адьюванта), прямого противоречия между этими двумя работами нет. Различия легко объяснить, принимая во внимание особое адьювантное воздействие BaP на иммунный ответ [11–13]. Также важно, что именно при интраназальном, но не подкожном, способе введения, уже на ранних этапах осуществляется доставка антигена в селезенку [46], что, вероятно, обусловлено особыми свойствами легочных В-лимфоцитов и свойствами самого альвеолярного барьера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали самок мышей линии BALB/c 7–8-недельного возраста, вес 18–22 г. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий (Андреевка, Россия). Животных содержали при 12-часовом цикле свет–темнота и кормили *ad libitum*, в качестве подстилки использовали древесные опилки. Общее число животных составило 30, по 6 в опытных группах и интактной.

Иммунизация и забор образцов. В качестве модельного антигена использовали овальбумин, OVA (>98% чистоты, Art. A5503, фракция V; Sigma-

Aldrich, Германия). Содержание LPS в пересчете на 10 мкг антигена составляло 0.04 EU согласно LAL-тесту. Антиген вводили интраназально в физиологическом растворе в объеме 50 мкл, в количестве 0.3 мкг на введение. Части животным также вводили BaP в дозе 4 нг в смеси с антигеном интраназально в общем объеме 50 мкл. В опыте участвовало по две группы животных, забитых на разные сроки, которым вводили антиген без BaP, и две группы животных, которым вводили антиген и BaP, $n = 6$ в каждой группе. Результаты сопоставляли с параметрами интактной группы неиммунизированных мышей. Введение OVA и BaP осуществляли под изофлурановой анестезией 3 раза в неделю в течение первых двух недель и по 2 раза в неделю в течение последующих 7 недель. Максимальная продолжительность протокола составляла 9 недель (63 дня). Часть животных умерщвляли через 3 недели (21 день) после начала иммунизации, оставшуюся часть – в конце протокола.

У животных брали образцы крови для получения сыворотки из подглазничного синуса. Полученные образцы инкубировали при 20°C, затем центрифугировали при 600 *g* для отделения тромба и хранили при –20°C до дальнейшего использования.

Для взятия органов – ткани легких, региональных лимфатических узлов, селезенки – животных забивали методом цервикальной дислокации. Порезанные на небольшие кусочки образцы ткани легких инкубировали 30 мин с раствором, содержащим 1% коллагеназы D и 0.1 ед. ДНКазы I (Sigma-Aldrich, Германия). Далее осуществляли гомогенизацию перетиранием с помощью пестика в лунке 24-луночного планшета. Образцы региональных лимфоузлов и селезенки гомогенизировали без использования ферментов.

Иммуноферментный анализ. Для иммуноферментного анализа использовали 96-луночные планшеты (Costrar, США). Для формирования подложки при определении продукции специфического IgE в лунки вносили раствор OVA в PBS (pH 7.2) в концентрации 20 мкг/мл, далее инкубировали планшеты в течение ночи при 4°C. Между стадиями осуществляли трехкратную отмывку буфером PBS, содержащим в составе 0.05% Tween-20. Блокирование осуществляли в течение часа 5%-ным раствором БСА в PBS, который вносили в объеме 100 мкл. Затем на-

носили сыворотки в разных разведениях в том же блокирующем буфере. Инкубацию с сыворотками осуществляли в течение суток при 4°C. На следующей стадии наносили конъюгат антител к мышинным IgE (клон 23G3, Abcam, США), меченный пероксидазой хрена (ПХ), в разведении 1 : 2000. Реакцию проявляли с использованием субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в концентрации 1 мМ и перекиси водорода в концентрации 4 мМ. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм, вычитая из нее значение оптической плотности при 620 нм как фоновое. В качестве отрицательного контроля в каждом планшете в восемь лунок не вносили сыворотки (фон). За титр сыворотки принимали то ее наибольшее разведение, при котором соответствующая ей оптическая плотность в реакции становилась равной фоновой плюс три стандартных отклонения.

Продукцию специфического IgG₁ оценивали в целом аналогично, но со следующими отличиями: при формировании подложки вносили раствор OVA с концентрацией 5 мкг/мл, для детекции использовали первичный конъюгат – антитела к мышинным IgG₁ (клон RMG1-1, BioLegend, США) в разведении 1 : 5000 и вторичный конъюгат стрептавидин-ПХ (BioLegend, США) в разведении 1 : 7000.

Проточная цитометрия. Гомогенизированные образцы органов и тканей использовали для проточной цитометрии. Образцы вначале отмывали в PBS центрифугированием при 300 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали и окрашивали красителем Zombie Aqua (BioLegend, США) в разведении 1 : 1000 согласно рекомендации производителя (20 мин при комнатной температуре). Краситель селективно окрашивал мертвые клетки, что было необходимо для их отсеки в процессе последующего анализа. Затем образцы вновь центрифугировали и ресуспендировали в FACS-буфере (PBS с добавлением 0.5% БСА и 0.01% азида натрия). Суспензию клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 80 мкм, затем окрашивали антителами (BioLegend, США) в разведениях, рекомендованных производителем. Использовали следующие антитела: антитела к мышинным CD138, меченные BV421 (клон 281-2); антитела к мышинным CD38, меченные FITC (клон 90); антитела к мышинным CD95,

меченные PE (клон SA367H8); антитела к мышинным B220, меченные PECy7 (клон RA3-6B2); антитела к мышинным CD19, меченные APC (клон 6B5). Проточную цитометрию проводили на приборе MACS Quant Tyto (Miltenyi Biotec, Гладбах, Германия). Данные обрабатывали в программе FlowJo V10 (BD Biosciences, США).

Анализ клеточных субпопуляций осуществляли так, как показано на рис. 2. В-лимфоциты определяли как CD19⁺CD138⁻, зрелые плазматические клетки как CD19⁻CD138⁺, незрелые плазматические как CD19⁺CD138⁺. Плазмабласты экстрафолликулярного ответа определяли как CD19⁺B220⁻ [33], они различались по экспрессии CD38 и CD95. В-лимфоциты типичных герминальных центров определяли как CD19⁺B220⁺CD38⁻CD95⁺ [34], В-лимфоциты – предшественники герминального центра – как CD19⁺B220⁺CD38⁺CD95⁺ [35].

Статистическая обработка полученных данных. Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандартного отклонения. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием ANOVA-теста с поправкой на множественное сравнение. Значения *p* по данному тесту, эквивалентные *p* < 0.05 с поправкой на множественное сравнение, считали статистически достоверными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адьювантное воздействие BaP на синтез IgE в низкодозовой модели аллергии оказался связанным со стимуляцией дифференцировки В-лимфоцитов в сторону В-клеток фенотипа герминального центра в селезенке, но не в региональных лимфатических узлах или ткани легких. Локальная активация В-лимфоцитов в легких была сопряжена с индукцией экстрафолликулярного ответа под действием поллютанта в ткани легких. При этом происходила стимуляция формирования зрелых плазматических клеток, но не незрелых плазмабластов, в селезенке. Механизмы, связанные с продукцией IgE в данной модели, таким образом, существенно отличаются от механизмов, описанных нами ранее для безадьювантной модели с подкожным введением антигена.

Таким образом, в настоящей работе была продемонстрирована модель аллергического воспаления, индуцируемого BaP, которую можно ис-

пользовать для дальнейшего изучения механизмов действия аэрополлютантов на иммунную систему. Практическая значимость результатов настоящей работы заключается в том, что они показывают необходимость разработки таких лекарственных средств для предотвращения формирования IgE-продуцирующих В-лимфоцитов, которые блокировали бы переключение на синтез IgE как в В-лимфоцитах экстрафолликулярных фокусов, так и в В-лимфоцитах герминальных центров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН за помощь при работе на приборе – проточном цитометре MACS Quant Tyto.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-10044) за 2023–2024 гг. и поддержке бюджета города Москвы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе использовали лабораторных животных – самок мышей линии BALB/c. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 147/2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ДБЧ, МАС участвовали в проведении экспериментов с лабораторными животными, ИФА и измерениях методом проточной цитометрии; авторы ОАШ, ГВФ и ААГ участвовали в отборе проб и подготовке клеток для проточной цитометрии; авторы РАВ и ОДК участвовали в анализе исходных данных, статистической обработке данных; автор ДБЧ также участвовал в подготовке гистограмм и рисунков данных, общем планировании работы, подготовке исходного варианта статьи; автор ГВФ участвовал в редактировании и корректировке окончательного варианта статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pouslen L.K., Hummelshoj L. // *Ann. Med.* 2007. V. 39. P. 440–456.
<https://doi.org/10.1080/07853890701449354>
2. Pandya R.J., Solomon G., Kinner A., Balmes J.R. // *Environ. Health Prospect.* 2002. V. 10 (S1). P. 103–112.
<https://doi.org/10.1289/ehp.02110s1103>
3. Munoz X., Barreiro E., Bustamante V., Lopez-Campos J.L., Gonzalez-Barcala F.J., Cruz M.J. // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 652. P. 1129–1138.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.188>
4. Грачев В.А., Ишков А.Г., Романов К.В., Куряшева Н.И. // *Вестник НИЦ МИСИ. Актуальные вопросы современной науки.* 2019. № 18. С. 142–155.
5. Wang X., Wang Y., Bai Y., Wang P., Zhao Y. // *J. Energy Inst.* 2019. V. 92. P. 1864–1888.
<https://doi.org/10.1016/j.joei.2018.11.006>
6. Balmes J.R. // *Thorax.* 2011. V. 66. P. 4–6.
<https://doi.org/10.1136/thx.2010.145391>
7. Yanagisawa R., Takano H., Inoue K.-I., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T., Hayakawa K. // *Clin. Exp. Allergy.* 2006. V. 36. P. 386–395.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02452.x>
8. Канило П.М., Костенко К.В. // *Проблемы машиностроения.* 2011. Т. 14. № 6. С. 73–80.
9. Ткачева М.В. // *Сб. матер. конф. “Актуальные вопросы радиационной и экологической медицины, лучевой диагностики и лучевой терапии”*, Гродно, 2022. С. 349–354.
10. Малыгина Д.А., Роговская Н.Ю., Бельтюков П.П., Бабаков В.Н. // *Токсикологич. вестник.* 2022. Т. 30. № 3. С. 158–166.
11. Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H. // *J. Appl. Toxicol.* 2016. V. 36. P. 1496–1504.
<https://doi.org/10.1002/jat.3308>
12. Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H. // *J. Immunotoxicol.* 2018. V. 15. P. 31–40.
<https://doi.org/10.1080/1547691X.2018.1442379>
13. Wang E., Liu X., Tu W., Do D.C., Yu H., Yang L., Zhou Y., Xu D., Huang S.-K., Yang P., Ran P., Gao P.-S., Liu Z. // *Allergy.* 2019. V. 74. P. 1675–1690.
<https://doi.org/10.1111/all.13784>
14. Gatto D., Brink R. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. V. 126. P. 898–907.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.007>
15. Talay O., Yan D., Brightbill H.D., Straney E.E.M., Zhou M., Ladi E., Lee W.P., Egen J.G., Austin C.D., Xu M., Wu L.C. // *Nat. Immunol.* 2012. V. 13. P. 396–404.
<https://doi.org/10.1038/ni.2256>
16. Yang Z., Sullivan B.M., Allen C.D.C. // *Immunity.* 2012. V. 36. P. 857–872.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.009>

17. Basso K., Dalla-Favera R. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 247. P. 172–183.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>
18. Kitayama D., Sakamoto A., Arima M., Hatano M., Miyazaki M., Tokuhisa T. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. P. 1337–1345.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.007>
19. Barnett B.E., Ciocca M.L., Goenka R., Barnett L.G., Wu J., Laufer T.M., Burkhardt J.K., Cancro M.P., Reinher S.L. // *Science*. 2012. V. 335. P. 342–344.
<https://doi.org/10.1126/science.1213495>
20. Roco J.A., Mesin L., Binder S.C., Nefzger C., Gonzalez-Figueroa P., Canete P.F., Ellyard J., Shen Q., Robert P.A., Cappello J., Vohra H., Zhang Y., Nowosad C.R., Schiepers A., Corcoran L.M., Toellner K.-M., Polo J.M., Meyer-Hermann M., Victoria G.D., Vinuesa C.G. // *Immunity*. 2019. V. 51. P. 337–350.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>
21. Marshall J.R., Zhang Y., Pallan L., Hsu M.-C., Khan M., Cunningham A.F., MacLennan I.C.M., Toellner K.M. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. P. 3506–3512.
<https://doi.org/10.1002/eji.201141762>
22. Feldman S., Kasjanski R., Poposki J., Hernandez D., Chen J.N., Norton J.E., Suh L., Carter R.G., Stewens W.W., Peters A.T., Kern R.C., Conley D.B., Tan B.K., Shintani-Smith S., Welch K.C., Grammer L.C., Harris K.E., Kato A., Schleimer R.P., Husle K.E. // *Clin. Exp. Allergy*. 2017. V. 47. P. 457–466.
<https://doi.org/10.1111/cea.12878>
23. Corrado A., Ramonell R.P., Woodruff M.C., Tipton C., Wise S., Levy J., DelGaudio J., Kuruvilla M.E., Magliocca K.R., Tomar D., Garimalla S., Scharer C.D., Boss J.M., Wu H., Gumber S., Fulice C., Gibson G., Rosenberg A., Sanz I., Lee F.E.-H. // *Mucosal Immunol.* 2021. V. 14. P. 1144–1159.
<https://doi.org/10.1038/s41385-021-00410-w>
24. Wang Z.-C., Yao Y., Chen C.-L., Guo C.-L., Ding H.-X., Song J., Wang Z.-Z., Wang N., Li X.-L., Liao B., Yang Y., Yu D., Liu Z. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2022. V. 149. P. 610–623.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.06.023>
25. Ramadani F., Bowen H., Gould H.J., Fear D.J. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 402.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00402>
26. Wu L.C., Zarrin A.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. P. 247–259.
<https://doi.org/10.1038/nri3632>
27. He S.-J., Subramaniam S., Narang V., Srinivasan K., Saunders S.P., Carbajo D., Wen-Shan T., Hamadee N.H., Lurn J., Lee A., Chen J., Poidinger M., Zolezzi F., Lafaille J.J., de Lafaille M.A.C. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 641.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>
28. Ramadani F., Upton N., Hobson P., Chan Y.-C., Mzinza D., Bowen H., Kerridge C., Sutton B.J., Fear D.J., Gould H.J. // *Allergy*. 2015. V. 70. P. 1269–1277.
<https://doi.org/10.1111/all.12679>
29. Chen Q., Liu H., Luling N., Reinke J., Dent A.L. // *J. Immunol.* 2023. V. 210. P. 905–915.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200521>
30. Croote D., Darmanis S., Nadeau K.C., Quake S.R. // *Science*. 2018. V. 362. P. 1306–1309.
<https://doi.org/10.1126/science.aau2599>
31. Gowthaman U., Chen J.S., Zhang B., Flynn W.F., Lu Y., Song W., Joseph J., Gertie J.A., Xu L., Collet M.A., Grassmann J.D.S., Simoneau T., Chiang D., Berin M.C., Craft J.E., Weinstein J.S., Williams A., Eisenbarth S.C. // *Science*. 2019. V. 365. P. eaaw6433.
<https://doi.org/10.1126/science.aaw6433>
32. Asrat S., Kaur N., Liu X., Ben L.-H., Kajimura D., Murphy A.J., Sleeman M.A., Limnander A., Orenge J.M. // *Sci. Immunol.* 2020. V. 5. P. eaav8402.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav8402>
33. Robinson M.J., Ding Z., Pitt C., Brodie E.J., Quast I., Tarlinton D.M., Zotos D. // *Cell Rep.* 2020. V. 30. P. 1530–1541.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.009>
34. Ardavin C., Martin P., Ferrero I., Azcoitia I., Anjuere F., Diggelmann H., Luthi F., Luther S., Acha-Orbea H. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. P. 2538–2545.
35. Underhill G.H., Kolji K.P., Kansas G.S. // *Blood*. 2003. V. 102. P. 4076–4083.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0947>
36. Koike T., Fujii K., Kometani K., Butler N.S., Funakoshi K., Yari S., Kikuta J., Ishii M., Kurosaki T., Ise W. // *J. Exp. Med.* 2023. V. 220. P. e20221717.
<https://doi.org/10.1084/jem.20221717>
37. Pracht K., Meizinger J., Daum P., Schulz S.R., Reimer D., Hauke M., Roth E., Meilenz D., Berek C., Corte-Real J., Jack H.-M., Schuh W. // *Eur. J. Immunol.* 2017. V. 47. P. 1389–1392.
<https://doi.org/10.1002/eji.201747019>
38. Chudakov D.B., Konvalova M.V., Kashirina E.I., Kotsareva O.D., Schevchenko M.A., Tsaregorodtseva D.S., Fattakhova G.V. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022. V. 19. P. 13063.
<https://doi.org/10.3390/ijerph192013063>
39. Блоцкий А.А., Валова Н.В., Чапленко Т.Н. // *Российская ринология*. Т. 21. № 2. С. 71–72.
40. Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Konvalova M.V., Tsaregorodtseva D.S., Schevchenko M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V. // *Vaccines (Basel)*. 2022. V. 10. P. 969.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10060969>
41. de Toter D., Montera M., Rosoo O., Clavio M., Balleari E., Foa R., Gobbi M. // *Hematol. J.* 2004. V. 5. P. 152–160.
<https://doi.org/10.1038/sj.thj.6200362>
42. Vences-Catalan F., Santos-Argumedo L. // *IUBMB Life*. 2010. V. 63. P. 840–856.
<https://doi.org/10.1002/iub.549>
43. Freitag T.L., Fagerlund R., Karam N.L., Leppanen V.-M., Ugurlu H., Kant R., Makinen P., Tavfak A., Jha S.K., Strandin T., Leskinen K., Hepojoki J., Kesti T., Kareinen L., Kuivanen S., Koivulehto E., Sormunen A., Laidinen S., Khattab A., Saavalainen P., Meri S., Kipar A., Sironen T., Vapalahti O., Alitalo K., Yla-Herttuala S., Saksella K. // *Vaccine*. 2023. V. 41. P. 3233–3246.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.020>

44. Ciabattini A., Pettini E., Fiorino F., Prota G., Pozzi G., Medaglioni D. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e19346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019346>
45. Rayamajhi M., Delgado C., Condon T.V., Riches D.W., Lenz L.L. // Mucosal Immunol. 2012. V. 5. P. 444–454. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.21>
46. Bessa J., Zabel F., Link A., Jegerlehner A., Hinton H.J., Schmitz N., Bauer M., Kundig T.M., Saudan P., Bachmann M.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 20566–20571. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206970109>
47. Dullaers M., Schuijs M.J., Willart M., Fierens K., van Moorleghem J., Hammad H., Lambrecht B.N. // J. Allergy Clin. Immunol. 2017. V. 140. P. 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.020>
48. Samitas K., Malmhall C., Radinger M., Ramos-Ramirez P., Lu Y., Deak T., Semitekolou M., Gaga M., Sjostrand M., Lotvall J., Bossios A. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0161161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161161>
49. Jang E., Cho S., Pyo S., Nam J.-W., Youn J. // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 631472. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631472>
50. Jang E., Cho W.S., Oh Y.-K., Cho M.-L., Kim J.M., Paik D.-J., Youn J. // J. Immunol. 2016. V. 196. P. 1026–1032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401059>
51. Jenkins M.M., Bachus H., Botta D., Schultz M.D., Rosenberg A.F., Leon B., Ballesteros-Tato A. // Sci. Immunol. 2021. V. 6. P. eabg6895. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg6895>

The Adjuvant Effect of Benzo(a)pyrene on Specific IgE Production is Linked with the Accumulation of Germinal Center B Cells within the Spleen and Extrafollicular B-Cells Activation within the Lungs

D. B. Chudakov^{*,#}, O. A. Shustova^{*}, M. A. Streltsova^{*}, A. A. Generalov^{*}, R. A. Velichinskii^{*}, O. D. Kotsareva^{*}, and G. V. Fattakhova^{*}

[#] Phone: +7 (495) 330-40-11; e-mail: boris-chudakov@yandex.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Despite a large number of works focused on the search for the mechanisms of formation of IgE-producing B cells, the question of the relative contribution of germinal centers and extrafollicular foci B cells in this process still remains controversial. Of particular interest is the study of the mechanisms of stimulation of the allergic immune response under the influence of air pollutants. The aim of the work was to study the connection between the adjuvant effect of benzo(a)pyrene (BaP) on the production of specific IgE in a novel low-dose allergy model with changes in the subpopulation composition of B-cells in the tissue of the immunization site and secondary lymphoid organs. Antigen without any stimuli was administrated to one group of BALB/c mice for 9 weeks in a low (0.3 µg) dose. BaP was administrated to another group of mice along with antigens at a dose of 4 ng. B-cell subpopulations were analyzed by flow cytometry. BaP significantly stimulated the production of allergen-specific IgG₁ at early (3 weeks) time point, and allergen-specific IgE at late (9 weeks) time point. The aeropollutant increased the content of CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ germinal center B-cells with the phenotype and their precursors (CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺) with the phenotype in the spleen at early and late time points, but not in the lungs or regional lymph nodes. Under its influence, the content of CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ and CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ extrafollicular plasmablasts in the spleen at an early time point and in lung tissue at a later time point also increases. In the spleen, BaP increased the content of CD138⁺CD19⁺B220⁺ and CD138⁺CD19⁺B220⁺ mature plasma cells, and in regional lymph nodes the content of CD138⁺CD19⁺B220⁺ immature plasma cells at a later time point. The adjuvant effect of BaP on the production of specific IgE was largely associated with stimulation of the formation of germinal centers in the spleen and with extrafollicular activation of B cells in lung tissue.

Keywords: IgE, benzo(a)pyrene, humoral immune response, germinal centers, extrafollicular foci, plasma cells