

Комплексный анализ субпопуляций В-клеток и фолликулярных Т-клеток в небных миндалинах человека

А.А. Кухарчук¹, <https://orcid.org/0009-0003-7962-2389>, kuharchukartem@yandex.ru

С.Р. Соколова¹, <https://orcid.org/0000-0003-1699-9237>, sophiya.sokolova@gmail.com

Д.З. Халифаева^{1,3}, <https://orcid.org/0009-0004-4397-9404>, Khalifaeva96@mail.ru

А.В. Гуров^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-9811-8397>, Alex9999@inbox.ru

И.Л. Григорова^{1✉}, <https://orcid.org/0000-0002-4963-7403>, grig76@gmail.com

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии имени Л.И. Свержевского; 117152, Россия, Москва, Загородное шоссе, д. 18а, стр. 2

³ Городская клиническая больница №1 имени Н.И. Пирогова; 117049, Россия, Москва, Ленинский проспект д. 8

Резюме

Введение. Небные миндалины играют ключевую роль в защите организма человека от многочисленных патогенов, попадающих через верхние дыхательные пути и пищеварительный тракт. Одной из основных функций небных миндалин является формирование гуморального иммунитета, который возникает в результате В-клеточного ответа на чужеродные антигены при участии и под контролем фолликулярных Т-клеток. Нарушения в вовлечении В- и Т-клеток в иммунный ответ в миндалинах могут быть связаны с различными патологиями, хроническими инфекциями, иммунодефицитами или лимфопролиферативными заболеваниями.

Цель. Провести методический анализ различных субпопуляций В-клеток и Т-фолликулярных клеток в миндалинах с помощью проточной цитометрии. Оценить различные компоненты локального иммунного ответа.

Материалы и методы. Отбор пациентов для исследования проводили в оториноларингологическом отделении городской клинической больницы №1 им. Н.И. Пирогова г. Москвы с 2024 по 2025 г. В качестве материала использовали миндалины, полученные в ходе тонзиллэктомии. Выделенные из органов мононуклеарные клетки (МНК) окрашивали смесью поверхностных маркеров В-клеток и Т-фолликулярных клеток, а также проводили внутриклеточное окрашивание транскрипционных факторов Bcl6 и FoxP3 для дальнейшего анализа методом проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение. На основе полученных данных была предложена стратегия выделения основных субпопуляций В-клеток (наивных, двойных негативных В-клеток, клеток памяти, В-клеток герминативных центров (ГЦ)), реализующих гуморальный иммунный ответ в миндалинах. Кроме этого, был разработан подход для анализа Т-фолликулярных клеток в миндалинах с выделением субпопуляций Т-фолликулярных хелперных (Тфх), регуляторных (Тфр) клеток, а также CD25⁺⁺ Тфх, которые необходимы для контроля и регуляции В-клеточных ответов.

Выводы. Разработанный анализ может быть использован как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической практике для диагностики и мониторинга иммунопатологических состояний.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоцитов, парафарингеальный абсцесс, герминативный центр, гуморальный иммунитет, иммунный ответ

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00545).

Для цитирования: Кухарчук АА, Соколова СР, Халифаева ДЗ, Гуров АВ, Григорова ИЛ. Комплексный анализ субпопуляций В-клеток и фолликулярных Т-клеток в небных миндалинах человека. *Медицинский совет*. 2025;19(13):289–297. <https://doi.org/10.21518/ms2025-271>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comprehensive analysis of B cell and follicular T cell subpopulations in human palatine tonsils

Artem A. Kuharchuk¹, <https://orcid.org/0009-0003-7962-2389>, kuharchukartem@yandex.ru

Sofia R. Sokolova¹, <https://orcid.org/0000-0003-1699-9237>, sophiya.sokolova@gmail.com

Jamilya Z. Khalifaeva^{1,3}, <https://orcid.org/0009-0004-4397-9404>, Khalifaeva96@mail.ru

Alexander V. Gurov^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0001-9811-8397>, Alex9999@inbox.ru

Irina L. Grigorova^{1✉}, <https://orcid.org/0000-0002-4963-7403>, grig76@gmail.com

¹ Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia

² Sverzhovsky Scientific Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology; 18a, Bldg. 2, Zagorodnoe Shosse, Moscow, 117152, Russia

³ City Clinical Hospital No. 1 named after N.I. Pirogov; 8, Leninsky Ave., Moscow, 117049, Russia

Abstract

Introduction. Palatine tonsils play an important role in protecting the human body from numerous pathogens entering through the upper respiratory and digestive tracts. One of the main components of the protective function of the palatine tonsils is the formation of humoral immunity, which occurs as a result of a B-cell response to foreign antigens with the participation and under the control of follicular T cells. Disorders in the involvement of B and T cells in the immune response in the tonsils may be associated with various pathologies, chronic infections, immunodeficiency or lymphoproliferative diseases.

Aim. To perform a methodical analysis of various subpopulations of B and follicular T cells in tonsils using flow cytometry. To evaluate various components of the local immune response.

Materials and methods. The selection of patients for the study was carried out in the otorhinolaryngological department of the City Clinical Hospital No. 1 named after N. I. Pirogov, Moscow from 2024 to 2025. Fresh tonsils were obtained from patients undergoing tonsillectomy or tonsillotomy. Mononuclear cells (MNCs) isolated from the organs were stained with a mixture of surface markers for B- and T-follicular cells, followed by intracellular staining of the transcription factors Bcl6 and FoxP3 for subsequent flow cytometry analysis.

Results and discussion. Based on the obtained data, a strategy was proposed for identifying key B-cell subpopulations (naïve, double-negative B cells, memory B cells, and germinal center (GC) B cells) involved in the humoral immune response in tonsils. Additionally, an approach was developed for analyzing T-follicular cells in tonsils, distinguishing subpopulations of T-follicular helper (Tfh) cells, T-follicular regulatory (Tfr) cells, and CD25⁺ Tfh cells, which are essential for the control and regulation of B-cell responses.

Conclusions. The developed analysis can be used both in basic research and in clinical practice for the diagnosis and monitoring of immunopathological conditions.

Keywords: lymphocyte subpopulations, parapharyngeal abscess, germinal center, humoral immunity, immune response

Acknowledgments. The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00545).

For citation: Kuharchuk AA, Sokolova SR, Khalifaeva DZ, Grigorova IL. Comprehensive analysis of B cell and follicular T cell subpopulations in human palatine tonsils. *Meditsinskiy Sovet*. 2025;19(13):289–297. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/ms2025-271>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Небные миндалины (НМ) являются первым барьером на пути патогенов, проникающих через верхние дыхательные пути и пищеварительный тракт, и играют ключевую роль в защите от них [1]. Анализ различных популяций В- и Т-лимфоцитов в НМ может быть важен для понимания механизмов гуморального иммунного ответа, процессов продукции антител, формирования иммунологической памяти и регуляции воспалительных процессов, а также для выявления маркеров патологических состояний, ассоциированных с аутоиммунными реакциями, иммунодефицитами или лимфопролиферативными заболеваниями.

Известно, что В-клетки играют важную роль в различных заболеваниях благодаря продукции антител [2] и цитокинов [3], а также презентации антигенов [4]. Для оценки активности гуморального иммунитета и регуляции иммунных процессов следует анализировать ключевые В-клеточные популяции, отражающие различные этапы дифференцировки и функциональной специализации В-лимфоцитов. Кроме этого, необходимо проводить анализ фолликулярных Т-клеток, включающих в себя Т-фолликулярные хелперные (Тфх) и регуляторные (Тфр) клетки. Данные клеточные популяции играют важную роль в регуляции В-клеточных и антительных ответов [5, 6].

Предлагаемый протокол анализа ключевых В-клеточных популяций и Т-клеток, регулирующих В-клеточный ответ в миндалинах, предоставляет проводить детальную

и комплексную оценку иммунного статуса. Этот подход может быть использован как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической практике для диагностики и мониторинга иммунопатологических состояний. Совокупный анализ этих популяций выявляет дисбаланс в регуляции иммунных процессов, что может быть связано с различными патологиями, включая аутоиммунные заболевания, иммунодефициты, хронические инфекции и лимфопролиферативные нарушения [7–9].

Цель – провести методический анализ различных субпопуляций В-клеток и фолликулярных Т-клеток в НМ с помощью проточной цитометрии с последующей оценкой различных компонентов локального иммунного ответа.

МАТЕРИАЛЫ**Антитела**

1. Anti-Human CD4 V450 (клон: RPA-T4, BD Biosciences, кат. №560345, RRID: AB_1645572).
2. Anti-Human CD19-BV510 (клон: SJ25C1, BD Biosciences, кат. №562947, RRID: AB_2737914).
3. Anti-Human CD25-PE-Cy7 (клон: M-T271, BD Biosciences, кат. №356408, RRID: AB_2561906).
4. Anti-Human CD38-APC-A700 (клон: HIT2, BD Biosciences, кат. №564979, RRID: AB_2744373).
5. Anti-Human CD45RA-APC-H7 (клон: HI100, BD Biosciences, кат. №560674, RRID: AB_1727497).
6. Anti-Human CXCR5- Alexa Fluor 647 (клон: RF8B2, BD Biosciences, кат. №558113, RRID: AB_2737606).

7. Anti-Human PD-1 PE-Cy7 (клон: EH12.1, BD Biosciences, кат. № 561272, RRID: AB_10611585).

8. Anti-Human CD3-PE Dazzle594 (клон: OKT3, BioLegend, кат. №317346, RRID: AB_2565851).

9. Anti-Human CD24-BV650 (клон: ML5, BD Biosciences, кат. №563720, RRID: AB_2632388).

10. Anti-Human CD27-PerCP-Cy5.5 (клон: M-T271, BioLegend, кат. №356408, RRID: AB_2561906).

11. Anti-Human CD95-PE (клон: DX2, BioLegend, кат. №305608, RRID: AB_314546).

12. Anti-Human IgD-APC (клон: IA6-2, BioLegend, кат. №348222, RRID: AB_2561595).

13. Anti-Human IgM-BV421 (клон: MHM-88, BioLegend, кат. №314516, RRID: AB_2561443).

14. Anti-Human FoxP3 Alexa Fluor 488 (клон: 259D/C7, BD Biosciences, кат. №560047, RRID: AB_1645349).

15. Anti-Human Bcl-6 Alexa Fluor 488 (клон: K112-91, BD Biosciences, кат. № 561524, RRID: AB_10716202).

Пластик

1. Центрифужные пробирки объемом 15 мл (NEST, кат. №601001).

2. Фильтры для клеток 70 мкм (SPL, кат. №93040).

3. Чашки Петри 60 мм (SPL Lifesciences, кат. №20060).

4. Шприцы (SFM, кат. № Рm073-3/534 203).

5. U-образный 96-луночный планшет (Greiner, кат. №650161).

6. Пробирки для цитометрии объемом 5 мл (SPL Lifesciences, кат. №41005).

Растворы

1. Среда RPMI-1640 без глутамина (ПанЭко, кат. № C330п) с добавлением 1%-ной фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Corning, кат. №35-081-CV), 2 mM глутамина (ПанЭко, Ф031), 10 mM натрия пирувата (ПанЭко, кат. №Ф023), 100 U/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, кат. № A065п).

2. 0,9%-ный раствор натрия хлорида для инфузий (физ. раствор) (Гротекс).

3. Фиколл 1,077 г/мл (ПанЭко, кат. № P050E).

4. Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (ДПБС) без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ПанЭко, кат. № P060).

5. Буфер для проточной цитометрии: ДПБС без Ca^{2+} и Mg^{2+} , 2% ФБС, 1 mM ЭДТА, 0,1% NaN_3 .

6. Блокатор Fc-рецепторов человека (Human Fc-block, клон K112-91, BD Biosciences, кат. №564220, RRID: AB_10716202).

7. True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, кат. №424401).

Оборудование

1. Центрифуга Eppendorf 5804 (Eppendorf, RRID: SCR_019866).

2. Центрифуга Eppendorf 5424 (Eppendorf, RRID: SCR_019848).

3. Автоматический счетчик клеток TC20 (BioRad, кат. № 1450102, RRID: SCR_025462).

4. Проточный цитофлуориметр с функцией сортировки BD FACS Aria™ III (BD Biosciences, RRID: SCR_016695).

МЕТОДЫ

Выделение мононуклеарных клеток из небных миндалин

Удаление НМ проводилось пациентам с хроническим тонзиллитом с рецидивами ангины, паратонзиллярным абсцессом, а также пациентам с паратонзиллярным абсцессом, осложнившимся парафарингеальным абсцессом, на базе оториноларингологического отделения Городской клинической больницы №1 им. Н.И. Пирогова согласно показаниям. Каждый орган помещали в физиологический раствор сразу после удаления и хранили при 4 °C до анализа. С момента операции до начала процессинга органов проходило менее 2 ч. Одобрение на работу с пациентскими образцами органов (НМ) было получено от локального этического комитета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНМУ им. Н.И. Пирогова) для проведения исследования (№240).

1. НМ промывали в RPMI-1640, помещали в чашку Петри и разделяли ножницами и пинцетом на фрагменты размером до 1 см³, удаляя соединительную, рубцовую, хрящевую, жировую и мышечную ткани. Также фрагменты очищали от участков некроза, геморрагий, капсул и соединительнотканых септ.

2. Очищенные фрагменты лимфоидной ткани промывали RPMI-1640 и переносили в клеточное сито с размером ячеек 70 мкм. Ткань перетирали шприцевым поршнем, после чего сито промывали 1 мл RPMI-1640.

3. Полученную клеточную суспензию собирали в пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл RPMI-1640.

4. Для очистки мононуклеарных клеток от мертвых клеток и клеточного дебриса в новую пробирку объемом 15 мл вносили 5 мл фиколла комнатной температуры и сверху осторожно наслаивали 5 мл клеточной суспензии.

5. Пробирку центрифугировали при 400 g в течение 30 мин с выключенным торможением.

6. После центрифугирования интерфазное кольцо клеток аккуратно собирали пипеткой и переносили в чистую пробирку.

7. Клетки дважды отмывали в ДПБС, центрифугируя при 300 g в течение 10 минут, после чего ресуспендировали в 2 мл RPMI-1640.

8. Клеточную суспензию подсчитывали на автоматическом счетчике клеток TC20 с трипановым синим для оценки жизнеспособности, которая обычно составляла более 90%.

Окрашивание поверхностных маркеров

Для окрашивания каждой панелью антител использовали по 2 млн клеток и следующие смеси:

I. Блокирующий раствор (Фц-блок):

3 мкл Human Fc-block разбавляется буфером для проточной цитометрии до 25 мкл.

II. Смеси антител для анализа.

Смеси антител доводились до конечного объема 25 мкл буфером для проточной цитометрии.

- **Таблица 1.** Смесь антител №1 для анализа В-клеток
 ● **Table 1.** Antibody mix No. 1 for the B cell analysis

Антитело	Необходимое разведение	Объем раствора антитела, мкл
αCD3-PE Dazzle594	1:50	1
αCD19-BV510	1:50	1
αCD24-BV650	1:25	2
αCD27-PerCP-Cy5.5	1:50	1
αCD38-APC-A700	1:50	1
αCD95-PE	1:50	1
αIgD-APC	1:100	0,5
αIgM-BV421	1:50	1

1. Приготовленные смеси антител (табл. 1, 2) открывали на 12000 g в течение 10 мин на +4 °C для осаждения агрегатов антител. До окрашивания клеток смеси антител хранили при +4 °C в темноте.

2. Окрашивание МНК проводили на льду (при +4 °C), ограничивая пребывание окрашиваемых клеток на свету.

3. Суспензию МНК помещали в лунки U-образного 96-луночного планшета по 2 млн в лунку и осаждали центрифугированием при 300 g при +4 °C в течение 2 мин.

4. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в блокирующем растворе (Фц-блок) и оставляли инкубироваться при +4 °C в течение 10 мин.

5. После этого, не промывая клетки, добавляли 25 мкл соответствующей готовой смеси антител и оставляли инкубироваться при +4 °C в темноте в течение 30 мин.

6. После окрашивания клетки два раза ресуспендировали в 200 мкл буфера, каждый раз центрифугируя при 300 g в течение 2 мин и удаляя супернатант.

Внутриклеточное окрашивание транскрипционных факторов FoxP3 и Bcl6

1. После поверхностного окрашивания клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл фиксирующего буфера (1X) (True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set) и инкубировали 1 ч в темноте при +4 °C.

2. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 мин и удаляли супернатант.

3. Для пермеабиллизации осадок дважды ресуспендировали в 200 мкл пермеабиллизующего буфера (1X) (True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set), каждый раз центрифугируя при 400 g в течение 5 мин и удаляя супернатант.

4. Клетки ресуспендировали в 50 мкл соответствующего раствора антител для внутриклеточного окрашивания (табл. 3, 4) и инкубировали ночь при +4 °C в темноте.

5. После инкубации клетки два раза ресуспендировали в 200 мкл пермеабиллизующего буфера, каждый раз центрифугируя при 400 g в течение 5 мин и удаляя супернатант.

6. После окрашивания клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для проточной цитометрии, хранили

при +4 °C до анализа методом проточной цитометрии на сортере клеток FACSARIA™ III с помощью программного обеспечения FACSDiva™ (BD, RRID: SCR_001456).

7. Для компенсации использовались одноцветные клеточные красители. Для каждого флуорофора было взято по 100 тыс. клеток, которые окрашивались раствором одного антитела в объеме 25 мкл аналогично протоколу выше. После окрашивания клетки также ресуспендировали в 200 мкл буфера для проточной цитометрии и хранили при +4 °C до анализа.

8. Анализ проточной цитометрии проводился с использованием FlowJo 10.8.1 (FlowJo, RRID: SCR_008520).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ В-клеточного ответа в НМ человека методом проточной цитометрии МНК из миндалин, окрашенных вышеуказанными антителами (смесь антител №1) к поверхностным маркерам и внутриклеточному транскрипционному фактору Bcl6, позволяет провести идентификацию и количественный анализ следующих субпопуляций

- **Таблица 2.** Смесь антител №2 для анализа Т-фолликулярных клеток
 ● **Table 2.** Antibody Mix No. 2 for the T follicular cell analysis

Антитело	Необходимое разведение	Объем раствора антитела, мкл
αCD4-V450	1:50	1
αCD19-BV510	1:50	1
αCD25-PE	1:20	2,5
αCD38-APC-A700	1:50	1
αCD45RA-APC-H7	1:50	1
αCD127-BV605	1:50	1
αCXCR5-A647	1:50	1
αPD-1-PE-Cy7	1:50	1

- **Таблица 3.** Раствор антитела для внутриклеточного окрашивания для анализа В-клеточного ответа
 ● **Table 3.** Intracellular staining antibody solution for B cell response analysis

Антитело	Разведение	Объем раствора антитела, мкл	Объем пермеабиллизующего буфера, мкл
αBcl6-Alexa Fluor 488	1:50	1	49

- **Таблица 4.** Раствор антитела для внутриклеточного окрашивания для анализа Т-фолликулярных клеток
 ● **Table 4.** Intracellular staining antibody solution for T-follicular cell analysis

Антитело	Разведение	Объем раствора антитела, мкл	Объем пермеабиллизующего буфера, мкл
αFoxP3-Alexa Fluor 488	1:20	2,5	47,5

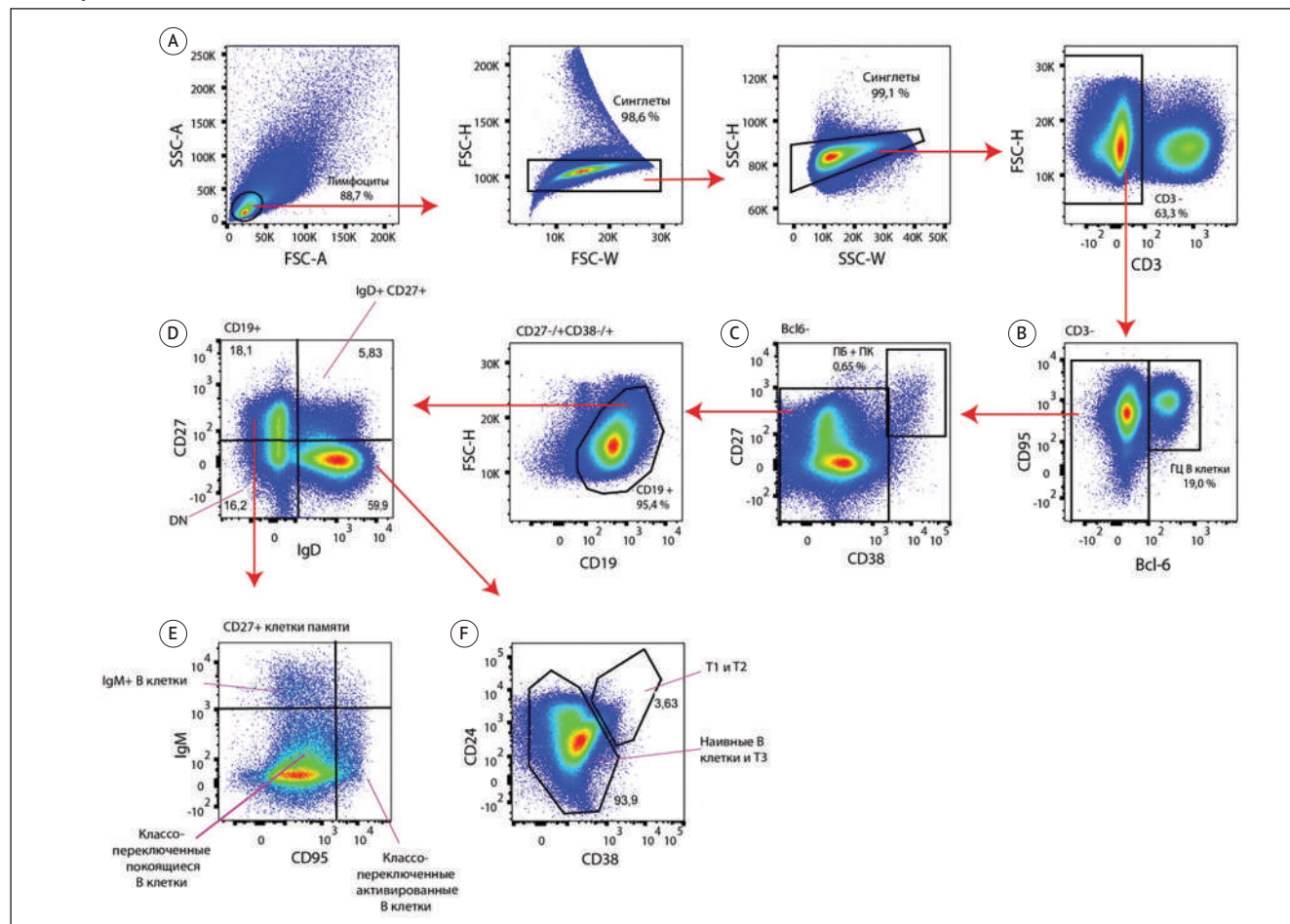
В-клеток (рис. 1, табл. 5). В-клетки ГЦ идентифицируются как $CD3^+CD19^+Bcl6^+$ -клетки (рис. 1B). Среди $CD3^+Bcl6^+$ -клеток можно выделить $CD27^{++}CD38^{++}$ -субпопуляцию, включающую антитела-секретирующие плазматические клетки и плазмобласты (рис. 1C). Оставшиеся $CD19^+$ -клетки, которые не включают В-клетки ГЦ и плазматические клетки, можно разделить по экспрессии IgD и CD27 на 4 субпопуляции: IgD^+CD27^- , двойные отрицательные (DN) IgD^+CD27^- В-клетки, IgD^+CD27^+ В-клетки и IgD^-CD27^+ В-клетки памяти (рис. 1D) [10]. IgD^+CD27^- -клетки включают в себя субпопуляцию зрелых наивных В-клеток и переходных (между незрелыми и зрелыми В-клетками) субпопуляции транзитных клеток (T1, T2, T3) (рис. 1E). IgD^-CD27^+ В-клетки памяти можно разделить на 4 субпопуляции по экспрессии CD95 и IgM: неактивированные ($CD95^-$) и активированные ($CD95^+$) В-клетки, а также экспрессирующие IgM (без переключения класса) и класс-переключенные (IgM^+) (рис. 1F). Согласно литературным данным, IgD^+CD27^+ В-клетки могут включать IgM^+IgD^+ В-клетки памяти, а также В-клетки

маргинальной зоны и В1-клетки, относящиеся к В-лимфоцитам врожденного иммунитета [11–13].

Для анализа фолликулярного и регуляторного Т-клеточного ответа в НМ человека МНК были окрашены антителами (смесь антител №2) к поверхностным маркерам и внутриклеточному транскрипционному фактору регуляторных Т-клеток FoxP3 (рис. 2, табл. 6). Цитометрический анализ $CD4^+$ Т-клеток позволяет выделить 3 основные субпопуляции фолликулярных Т-клеток: $CXCR5^{++}PD1^{++}$ фолликулярные Т-клетки ГЦ (I), $CXCR5^+PD1^+$ (II) и $CXCR5^+PD1^-$ (III) фолликулярные Т-клетки, не заходящие в ГЦ, а также $CXCR5^-PD1^-$ нефолликулярные Т-клетки (IV) (рис. 2B). Анализ $CD25^{++}FoxP3^+$ субпопуляций позволяет выделить фолликулярные регуляторные Т-клетки (Тфр) в субпопуляциях I–III, которые обогащены среди $CXCR5^+PD1^+$ -клеток, как было описано ранее (рис. 2C) [14]. FoxP3-клетки в субпопуляциях I, II являются фолликулярными хелперными Т-клетками (Тфх). Согласно литературным данным, Тфх, заходящие в ГЦ и активно участвующие в поддержании

● **Рисунок 1.** Анализ В-клеточного звена МНК миндалин методом проточной цитометрии. Стратегия гейтирования для последовательного определения: А) лимфоцитов, синглетов и $CD3^+$ -клеток, В) В-клеток ГЦ, С) плазмобластов (ПБ) и плазматических клеток (ПК), D) двойных отрицательных (DN) В-клеток, Е) наивных и T1, T2 и T3 В-клеток, а также F) различных субпопуляций В-клеток памяти

● **Figure 1.** Flow cytometry-based characterization of the B-cell component of mononuclear cells from tonsils (MNC-Ts) Gating strategy for the sequential identification of: A) lymphocytes, singlets and $CD3^+$ cells, B) B cells in germinal centers (GC), C) plasmablasts (PB) and plasma cells (PC), D) double negative (DN) B cells, E) naïve and T1, T2 and T3 B cells, and F) different memory B cell subsets



и селекции В-клеток ГЦ, имеют повышенную экспрессию CXCR5 и PD1 (субпопуляция I). При этом субпопуляции CXCR5⁺PD1⁺ Тфх-клеток в основном присутствуют в В-клеточных фолликулах вокруг ГЦ и могут включать как предшественников Тфх ГЦ, так и клетки памяти Тфх-клеток [15]. Среди нефолликулярных Т-клеток (IV) можно отдельно выделить CD25⁺FoxP3⁺ и более редкую

CD25⁻ FoxP3⁺ субпопуляцию регуляторных Т-клеток (рис. 2С). Отдельно надо отметить субпопуляцию CD25⁺Тфх-клеток (CXCR5⁺FoxP3⁺ CD25⁺ CD38⁺, рис. 2D), которые в основном состоят из CXCR5⁺PD1⁺ и CXCR5⁺PD1⁻-клеток. Согласно последним исследованиям, CD25⁺ Тфх человека секретируют как IL-21, так и IL-10, могут подавлять переключение класса В-клеток

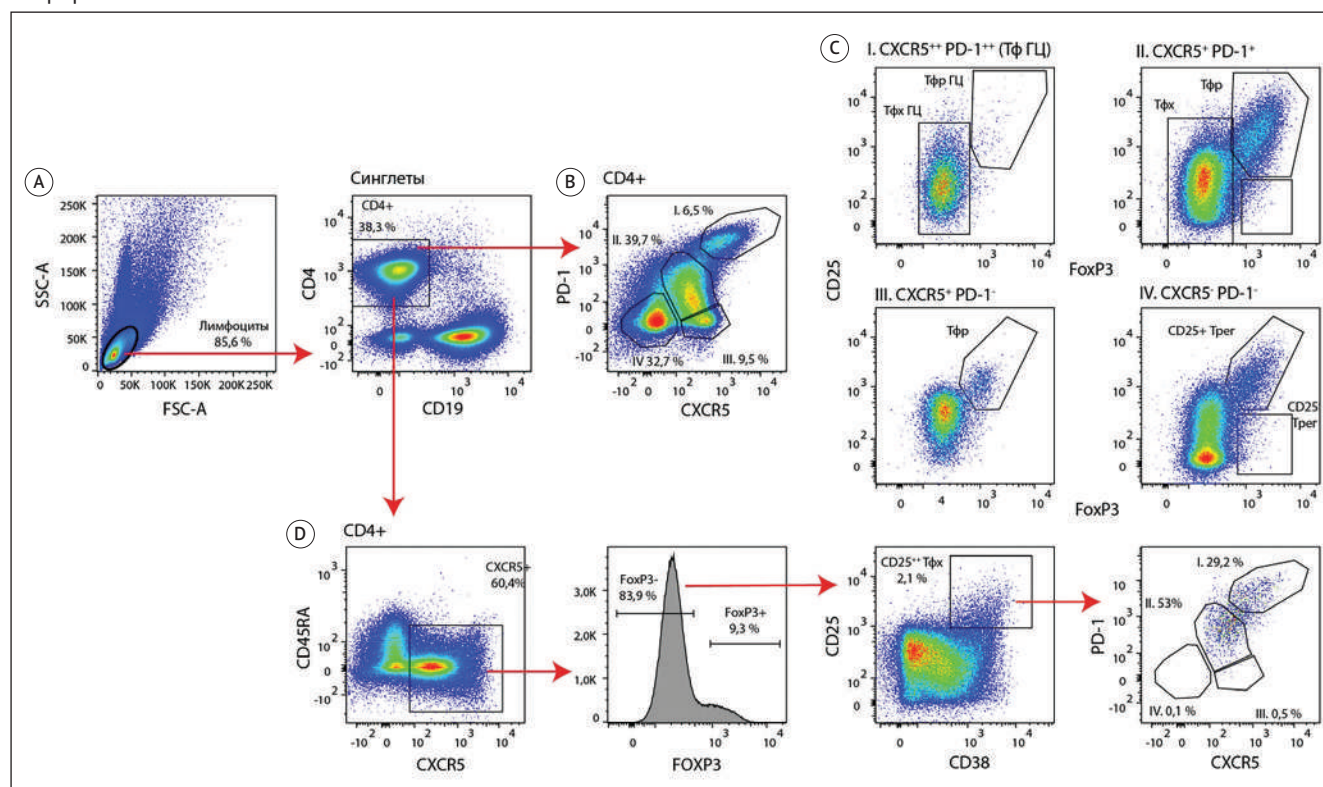
● **Таблица 5.** Субпопуляции В-клеток в миндалинах

● **Table 5.** Tonsil B cell subpopulations

Популяция	Фенотип
В-клетки герминативных центров	CD3 ⁺ CD19 ⁺ Bcl6 ⁺ CD95 ⁺ CD38 ⁻
Антитела-секретирующие плазматические клетки и плазмобласты	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺
Наивные и транзиторные (Т3) клетки	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺
Транзиторные (Т1 и Т2) клетки	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺
Двойные отрицательные (DN) В-клетки	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻
Неактивированные IgM-положительные В-клетки памяти	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ CD95 ⁻
Активированные IgM-положительные В-клетки памяти	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgM ⁺ CD95 ⁺
Неактивированные класс-переключенные В-клетки памяти	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺ CD95 ⁻
Активированные класс-переключенные В-клетки памяти	CD3 ⁺ Bcl6 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺ CD95 ⁺

● **Рисунок 2.** Анализ фолликулярных Т-клеток из МНК миндалин методом проточной цитометрии. Стратегия гейтирования для последовательного определения: А) лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток, В) различных субпопуляций фолликулярных Т-клеток (I–III) и нефолликулярных Т-клеток (IV), включая FoxP3⁺ Тфр (I–III) и Трег- (IV) клетки, и FoxP3⁺ Тфх-клетки (I, II), С) выделение субпопуляции CD25⁺ Тфх-клеток

● **Figure 2.** Flow cytometry-based characterization of T follicular cells in mononuclear cells from tonsils (MNC-Ts) Gating strategy for the sequential identification of: A) lymphocytes and CD4⁺ T cells, B) different subpopulations of T follicular cells (I–III) and T non-follicular cells (IV), including FoxP3⁺ Tfr (I–III) and Treg (IV) cells, and FoxP3⁺ Tfh cells (I, II), C) isolation of CD25⁺ Tfh cell subpopulation



● **Таблица 6.** Субпопуляции Т-фолликулярных клеток в миндалинах
 ● **Table 6.** Tonsil T follicular cell subpopulations

Популяция	Фенотип
Тфх герминативных центров	CD4 ⁺ CD19 ⁻ CXCR5 ⁺⁺ PD1 ⁺⁺ FoxP3 ⁻
Тфр	CD4 ⁺ CD19 ⁻ CXCR5 ^{+/++} PD1 ^{+/++} FoxP3 ⁺
CD25 ⁺⁺ Тфх	CD4 ⁺ CD19 ⁻ CXCR5 ^{+/++} PD1 ^{+/++} FoxP3 ⁻ CD25 ⁺⁺ CD38 ⁻
Нефолликулярные CD25 ⁺ Т-регуляторные клетки	CD4 ⁺ CD19 ⁻ CXCR5 ⁻ FoxP3 ⁺ CD25 ⁺⁺
Нефолликулярные CD25 ⁺ Т-регуляторные клетки	CD4 ⁺ CD19 ⁻ CXCR5 ⁻ FoxP3 ⁺ CD25 ⁺

на IgE и, как предполагается, являются важными регуляторами В-клеточного ответа [14, 16].

Стратегия гейтирования для последовательного определения: А) лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток, В) различных субпопуляций фолликулярных Т-клеток (I–III) и нефолликулярных Т-клеток (IV), включая FoxP3⁺ Тфр (I–III) и Трег (IV) клетки, и FoxP3⁻ Тфх-клетки (I, II), С), выделение субпопуляции CD25⁺⁺ Тфх-клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предлагаемый в данной работе анализ МНК миндалин методом проточной цитометрии позволяет оценить представленность всех ключевых субпопуляций В-клеток (наивных и переходных В-клеток, В-клеток ГЦ и клеток памяти, двойных негативных В-клеток и антитело-секретирующих клеток), а также фолликулярных Т-клеток (Тфх, Тфр и CD25⁺⁺Тфх), участвующих в регуляции В-клеточных иммунных ответов.

Наивные В-клетки представляют собой пул зрелых лимфоцитов, не встречавшихся со своим специфическим антигеном. Они коэкспрессируют поверхностные IgM и IgD и не имеют маркера памяти CD27. Эти клетки циркулируют в крови и накапливаются в лимфоидных органах, включая миндалины, где ожидают активации. Снижение их доли указывает на ослабление иммунитета в целом и на возможное развитие иммунодефицита [9]. При попадании антигена в миндалины специфически распознающие его В-клетки могут активироваться и дифференцироваться в короткоживущие антитело-секретирующие плазмобласты (пролиферирующие предшественники плазматических клеток) и плазматические клетки, а также В-клетки герминативных центров (ГЦ), которые пролиферируют и подвергаются переключению классов иммуноглобулинов, соматическому гипермутагенезу и созреванию аффинности [9]. Формирование ГЦ необходимо для образования класс-переключенных В-клеток памяти, играющих ключевую роль в формировании долговременного иммунитета и долгоживущих плазматических клеток, секретирующих высокоаффинные антитела [17–19]. Нарушения формирования В-клеток ГЦ или клеток памяти могут быть связаны с иммунодефицитами [20], а их избыток может свидетельствовать о хронической антигенной стимуляции (например, при аутоиммунных процессах) [21, 22]. В то же время повышение локального количества плазмобластов

и плазматических клеток характерно для острых инфекций (например, инфекционного мононуклеоза), хронических воспалительных процессов и аутоиммунных заболеваний (например, системная красная волчанка) [23].

Двойные негативные (DN) В-клетки представляют собой популяцию В-лимфоцитов, не экспрессирующую IgD и маркер памяти CD27. У пожилых людей количество этих клеток возрастает [24], однако увеличение их количества также характерно для пациентов с аутоиммунными [25, 26] и инфекционными заболеваниями [27]. Функции DN В-клеток могут различаться в зависимости от патологического состояния, что, вероятно, связано с гетерогенностью самой популяции. Например, при ВИЧ-инфекции они демонстрируют признаки истощения [28], а при системной красной волчанке способны дифференцироваться в антитело-секретирующие клетки и служить прямым источником аутоантител во время обострений болезни [29].

Особый интерес представляет изучение Т-клеточных популяций, регулирующих В-клеточные ответы в ГЦ. Т-фолликулярные хелперы (Тфх) способствуют селекции высокоаффинных В-клеток и их дифференцировке в плазматические клетки и В-клетки памяти, тогда как Т-фолликулярные регуляторные (Тфр) клетки подавляют избыточный иммунный ответ, предотвращая развитие аутоиммунных реакций и хронического воспаления [8, 9]. Популяция CD25⁺⁺ Тфх представляет собой активированную субпопуляцию фолликулярных хелперов, секретирующую IL10 и играющую особую роль при хронических иммунных реакциях [14, 16].

ВЫВОДЫ

Предлагаемый в данном исследовании анализ мононуклеарных клеток миндалин методом проточной цитометрии позволяет оценить представленность всех ключевых субпопуляций В-клеток и фолликулярных Т-клеток, участвующих в регуляции В-клеточных и гуморальных иммунных ответов. Данный подход может быть использован для выявления нарушений иммунного статуса миндалин, ассоциированных с различными патологическими состояниями, диагностики иммунопатологий, а также для фундаментальных исследований механизмов иммунной регуляции.

Поступила / Received 05.06.2025
 Поступила после рецензирования / Revised 25.06.2025
 Принята в печать / Accepted 27.06.2025

Список литературы / References

1. Nave H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol.* 2001;204(5):367–373. <https://doi.org/10.1007/s004290100210>.
2. Xiao ZX, Miller JS, Zheng SG. An updated advance of autoantibodies in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2021;20(2):102743. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102743>.
3. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol.* 2004;172(6):3422–3427. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3422>.
4. Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol.* 2021;70:129–137. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.06.003>.
5. Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity.* 2019;50(5):1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.
6. Xie MM, Dent AL. Follicular regulatory T cell subsets in mice and humans: origins, antigen specificity and function. *Int Immunol.* 2023;35(12):583–594. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxad031>.
7. Mintz MA, Cyster JG. T follicular helper cells in germinal center B cell selection and lymphomagenesis. *Immunol Rev.* 2020;296(1):48–61. <https://doi.org/10.1111/imr.12860>.
8. Qi J, Liu C, Bai Z, Li X, Yao G. T follicular helper cells and T follicular regulatory cells in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1178792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1178792>.
9. Gutiérrez-Melo N, Baumjohann D. T follicular helper cells in cancer. *Trends Cancer.* 2023;9(2):91–101. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.11.005>.
10. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 2012;3:302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302>.
11. Takizawa M, Sugane K, Agematsu K. Role of tonsillar IgD⁺CD27⁺ memory B cells in humoral immunity against pneumococcal infection. *Hum Immunol.* 2006;67(12):966–975. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.10.008>.
12. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Front Immunol.* 2019;10:2458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>.
13. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188(9):1679–1689. <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1679>.
14. Le Coz C, Oldridge DA, Herati RS, De Luna N, Liu Y, Klocperk A et al. Human T follicular helper clones seed the germinal center–resident regulatory pool. *Sci Immunol.* 2023;8(82):eade8162. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade8162>.
15. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan ICM. Follicular helper T cells. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:335–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055605>.
16. Le Coz C, Oldridge DA, Herati RS, De Luna N, Liu Y, Klocperk A et al. Human T follicular helper clones seed the germinal center–resident regulatory pool. *Sci Immunol.* 2023;8(82):eade8162. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade8162>.
17. MacLennan ICM. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>.
18. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>.
19. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>.
20. Ahn S, Cunningham-Rundles C. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert Rev Clin Immunol.* 2009;5(5):557–564. <https://doi.org/10.1586/eci.09.43>.
21. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):172–184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>.
22. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells. *Leukemia.* 2016;30(12):2283–2292. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.226>.
23. Liu Z, Zou Y, Davidson A. Plasma cells in systemic lupus erythematosus: the long and short of it all. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):588–591. <https://doi.org/10.1002/eji.201041354>.
24. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Lio D, Candore G, Caruso C. A double-negative (IgD⁺CD27⁺) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(10):681–690. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.08.003>.
25. Wei C, Anolik JH, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard AE, Brooks J et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007;178(10):6624–6633. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6624>.
26. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008;50(6):1762–1773. <https://doi.org/10.1002/art.23498>.
27. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(10):1506–1516. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>.
28. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med.* 2008;205(8):1797–1805. <https://doi.org/10.1084/jem.20072683>.
29. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, Marigorta UM, Patel AV, Wang X et al. Distinct effector B cells induced by unregulated Toll-like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2018;49(4):725–739. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.015>.

Вклад авторов:

Концепция статьи – А.В. Гуров, И.Л. Григорова

Написание текста – А.А. Кухарчук, И.Л. Григорова

Сбор и обработка материала – С.Р. Соколова, Д.З. Халифаева, А.В. Гуров

Обзор литературы – А.А. Кухарчук

Анализ материала – А.А. Кухарчук, С.Р. Соколова, А.В. Гуров, И.Л. Григорова

Редактирование – С.Р. Соколова, А.В. Гуров, И.Л. Григорова

Утверждение окончательного варианта статьи – А.В. Гуров, И.Л. Григорова

Contribution of authors:

Concept of the article – Alexander V. Gurov, Irina L. Grigорова

Text development – Artem A. Kuharchuk, Irina L. Grigорова

Collection and processing of material – Sofia R. Sokolova, Jamilya Z. Khalifaeva, Alexander V. Gurov

Literature review – Artem A. Kuharchuk

Material analysis – Artem A. Kuharchuk, Sofia R. Sokolova, Alexander V. Gurov, Irina L. Grigорова

Editing – Sofia R. Sokolova, Alexander V. Gurov, Irina L. Grigорова

Approval of the final version of the article – Alexander V. Gurov, Irina L. Grigорова

Информация об авторах:

Кухарчук Артем Алексеевич, лаборант-исследователь отдела молекулярных технологий Научно-исследовательского института трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; kuharchukartem@yandex.ru

Соколова София Романовна, младший научный сотрудник отдела молекулярных технологий Научно-исследовательского института трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; sophiya.sokolova@gmail.com

Халифаева Джамиля Зияидиновна, аспирант кафедры оториноларингологии имени академика Б.С. Преображенского Института хирургии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; врач-оториноларинголог оториноларингологического отделения, Городская клиническая больница №1 имени Н.И. Пирогова; 117049, Россия, Москва, Ленинский проспект д. 8; Khalifaieva96@mail.ru

Гуров Александр Владимирович, д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии имени академика Б.С. Преображенского Института хирургии, профессор кафедры микробиологии и вирусологии Института профилактической медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; старший научный сотрудник, Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии имени Л.И. Свержевского; 117152, Россия, Москва, Загородное шоссе, д. 18а, стр. 2; alex9999@inbox.ru

Григорова Ирина Леонидовна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярных технологий Научно-исследовательского института трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; grig76@gmail.com

Information about the authors:

Artem A. Kuharchuk, Laboratory Assistant Researcher at the Department of Molecular Technologies at the Translational Medicine Research Institute, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; kuharchukartem@yandex.ru

Sofia R. Sokolova, Researcher of Molecular Technologies Department of Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; sophiya.sokolova@gmail.com

Jamilya Z. Khalifaeva, Postgraduate Student of the Department of Otorhinolaryngology named after Academician B.S. Preobrazhensky Institute of Surgery, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; Otorhinolaryngologist of the Otorhinolaryngological Department, City Clinical Hospital No. 1 named after N.I. Pirogov; 8, Leninsky Ave., Moscow, 117049, Russia; Khalifaieva96@mail.ru

Alexander V. Gurov, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Otorhinolaryngology named after Academician B.S. Preobrazhensky Institute of Surgery, Professor of the Department of Microbiology and Virology of the Institute of Preventive Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; Senior Researcher, Sverzhnevsky Scientific Research Clinical Institute of Otorhinolaryngology; 18a, Bldg. 2, Zagorodnoe Shosse, Moscow, 117152, Russia; alex9999@inbox.ru

Irina L. Grigorova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of Molecular Technologies Department of Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; grig76@gmail.com