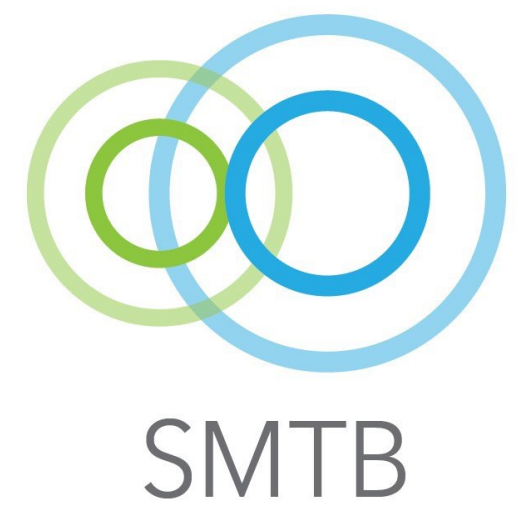
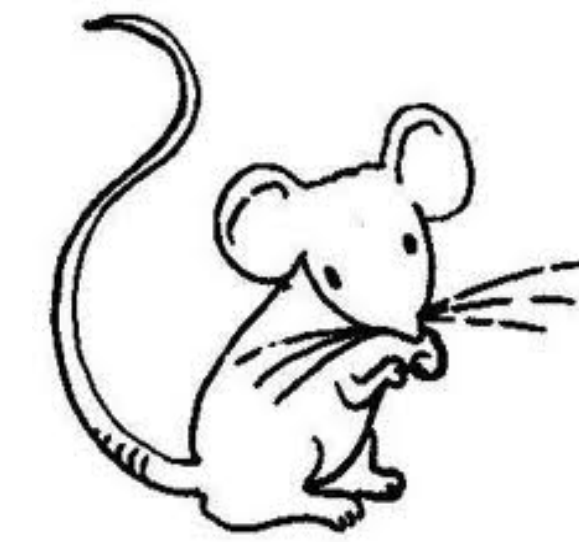


# Исследование локализации ABC клеток в селезёнке старых и подверженных аутоиммунным заболеваниям мышей



Бородина Виктория, Воронина Дарья, Гилева Рита, Гублер Арсений, Долгая Мария, Санчез Эрика, Хворова Ирина, Чангалиди Антон, Шубина Мария, Рубцов Толя, Рубцова Кира



## Введение

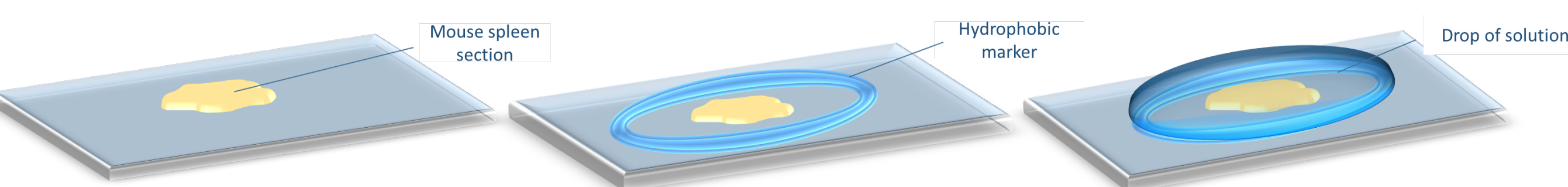
В 2011 году Кира и Анатолий Рубцовы опубликовали статью, в которой описали определенную популяцию В-лимфоцитов, названных ABC. Известно, что данная популяция клеток накапливается в селезенке стареющих мышей, а также у мышей, подверженных аутоиммунным заболеваниям, в развитии которых ABC клетки принимают непосредственное участие.

На данный момент установлено, что селезенка состоит из фолликулов, разделённых на В и Т клеточные зоны, а также включающих в себя герминальные центры - места взаимодействия В и Т клеток во время активного иммунного ответа. Нами была выдвинута гипотеза о том, что именно там будет располагаться большинство ABC клеток, поэтому цель нашего исследования - изучить вопрос их локализации и на основании полученных данных сделать вывод об их функциях.

## Методы

Для наших экспериментов были использованы слайды, на которых находились тонкие срезы селезенки в геле толщиной 8 микрон.

Мы обводили водоотталкивающим маркером зону вокруг селезенки, что помогало удерживать капли жидкостей на необходимой части слайда.



Далее мы проводили инкубацию буфером в PBS в течение 15 минут. После этого добавлялся блок для уничтожения не специфических связей на 1,5 часа, с последующим промыванием буфером в PBS 3 раза по 5 минут. После чего на 20 мин мы добавляли белки авидин и биотин для предотвращения неспецифического связывания биотинилированных антител. Затем промывали 3 раза по 5 минут. Далее мы добавили раствор с флуоресцентными антителами на срез селезенки на ночь при температуре 4 для распознавания интересующих нас клеток.

На второй день эксперимента мы промывали 5 раз по 5 минут. Потом мы проводили вторичное окрашивание на 1,5 часа для прикрепления флуоресцентных антител к белкам изучаемых нами клеток. Далее снова промывали 5 раз по 5 минут. Затем мы добавляли mounting media для предотвращения разрушения флуоресцентных белков, накрыли покровным стеклом и закрепили с помощью лака. Слайды были проанализированы с помощью флуоресцентного микроскопа с использованием увеличения 10x и 40x.

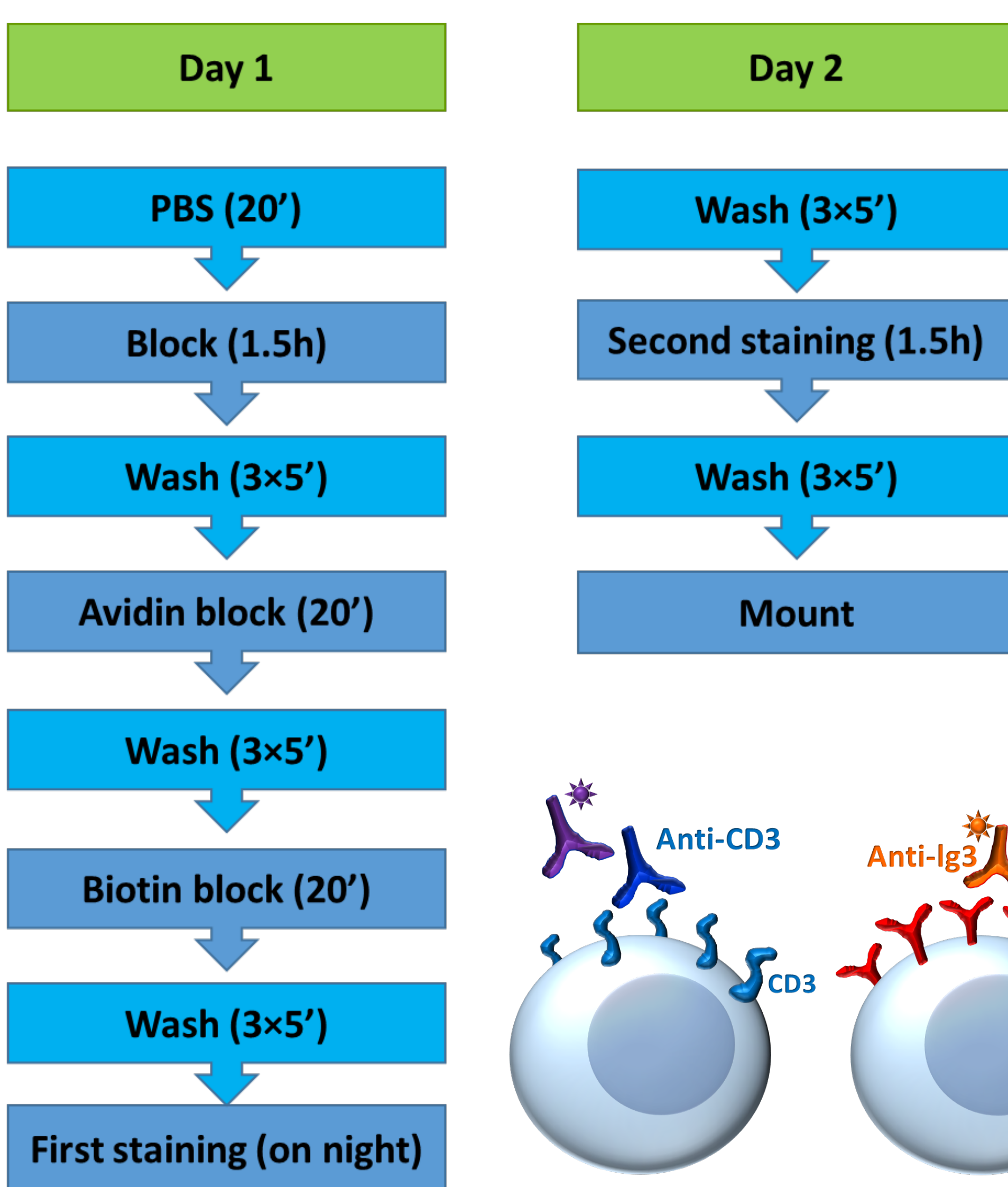


Figure 1. Methods.

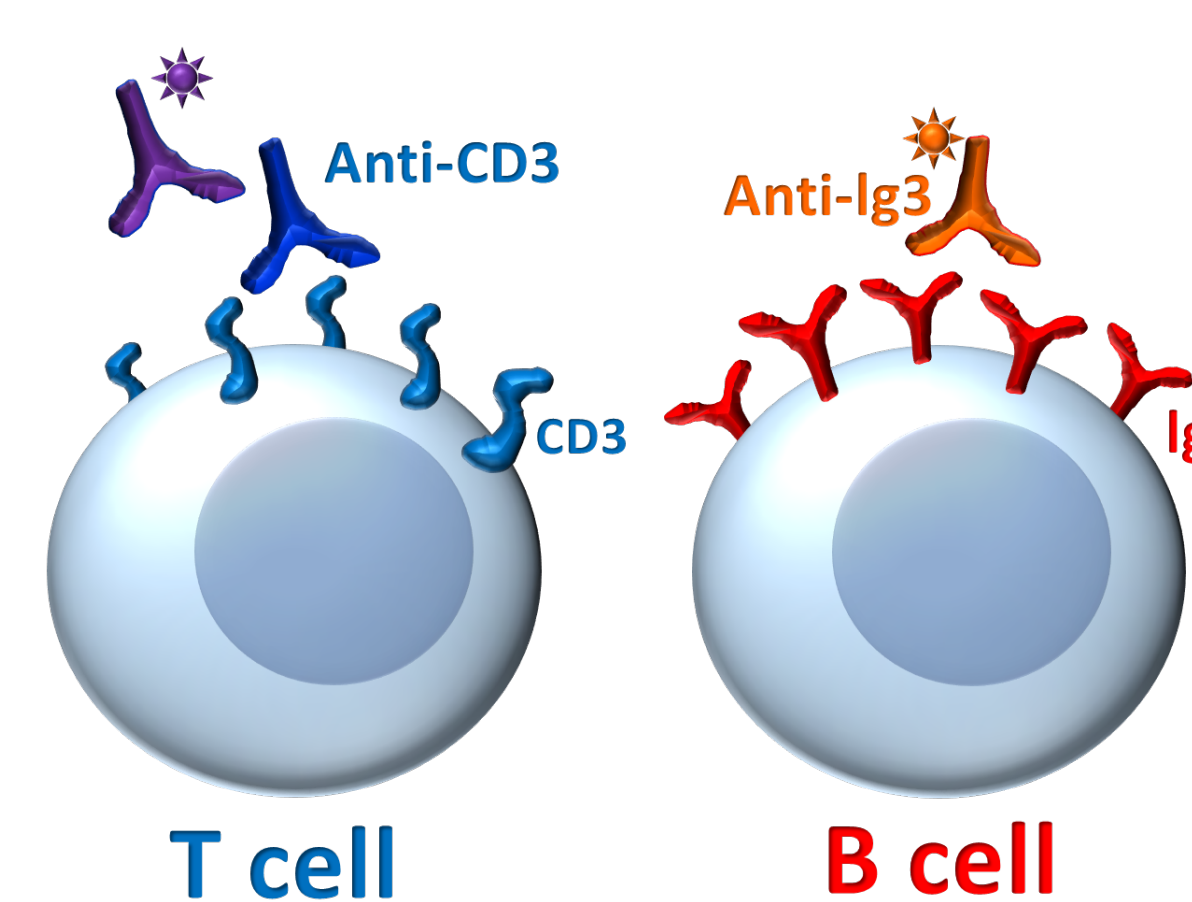


Figure 2. Schematic of staining with fluorescently labeled antibodies against B and T cells.

## Эксперимент

Для нашего эксперимента мы использовали 3 типа мышей: молодых здоровых, старых здоровых и мышей, подверженных аутоиммунным заболеваниям типа волчанки. Интересующие нас иммунные клетки располагаются в фолликулах селезенки, поэтому именно этот орган стал объектом нашего исследования. Конкретно, нас интересовала локализация клеток ABC относительно В- и Т-клеточных зон в лимфоидных фолликулах.

Все мыши были генетически модифицированы так, что в клетки ABC был встроены зеленый флуоресцентный белок, с помощью которого интересующие нас клетки были обнаружены на микроскопе.

Клетки в В- и Т-зонах были окрашены в красный (с помощью антител IgD) и синий (с помощью антител CD3) цвета соответственно.

Во второй части нашего эксперимента мы определяли расположение ABC относительно герминальных центров фолликула - местах взаимодействия В и Т клеток во время активного иммунного ответа. Для установления локализации герминальных центров, образцы были покрашены реагентом PNA.

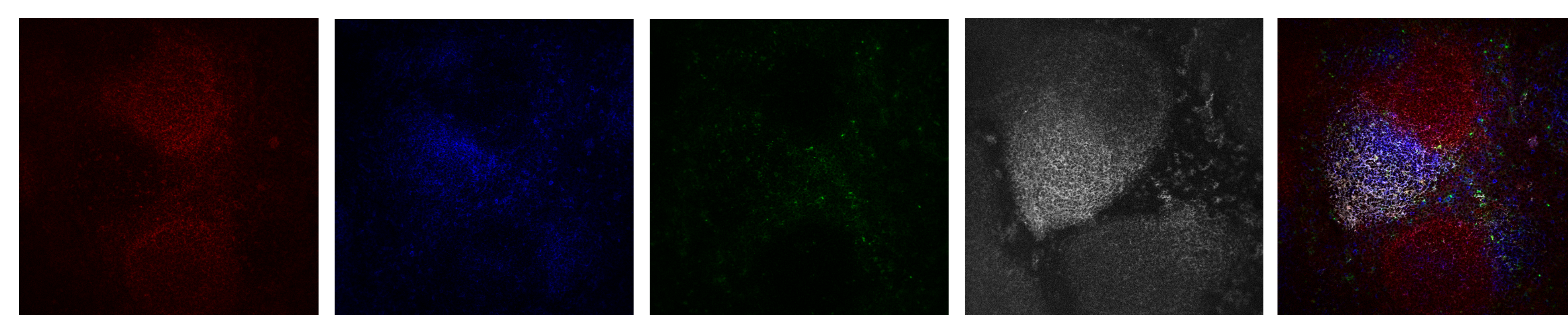
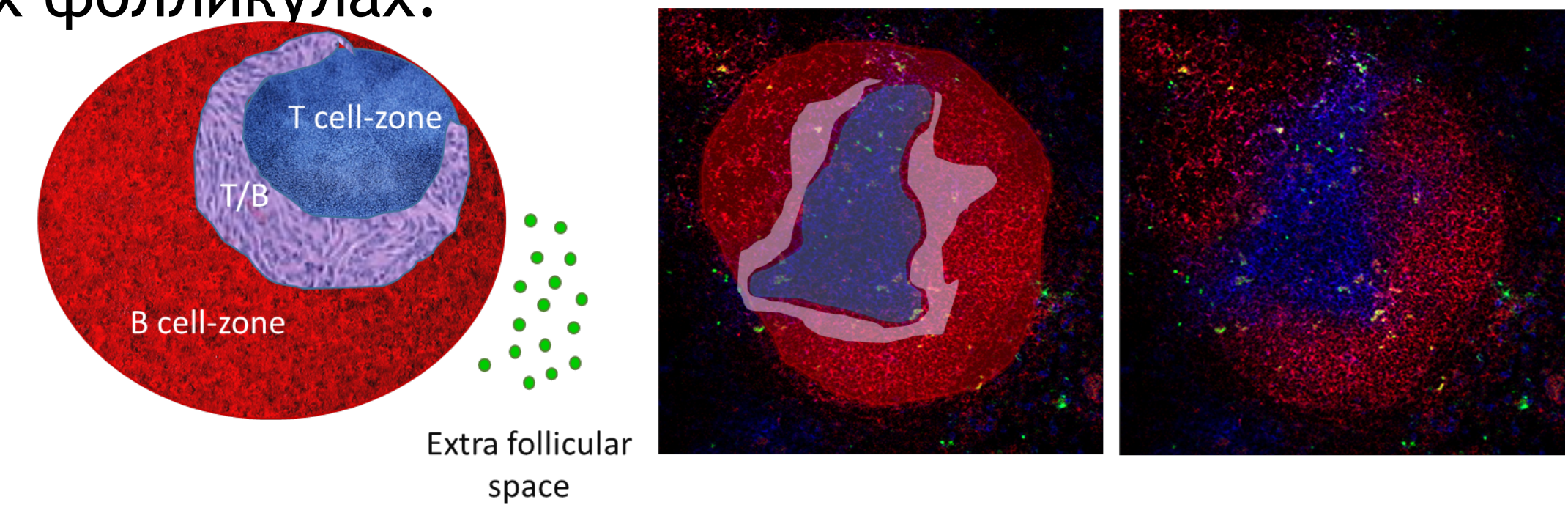


Figure 3. Staining of spleen section with individual fluorescence

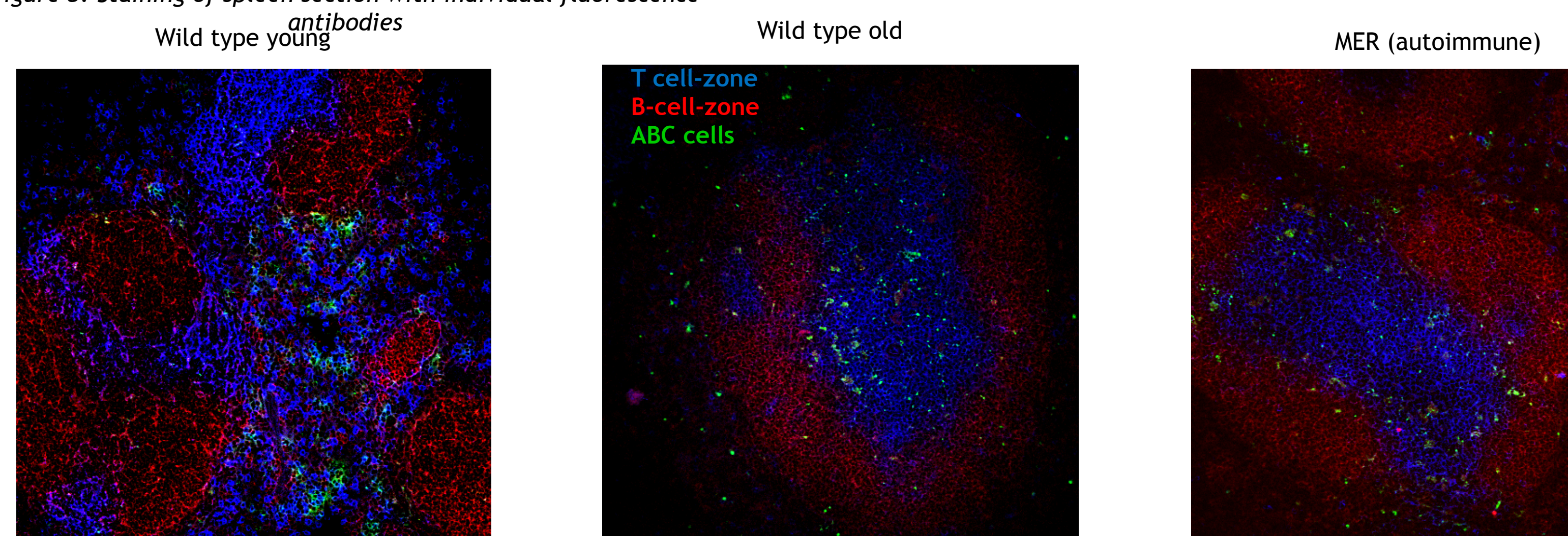
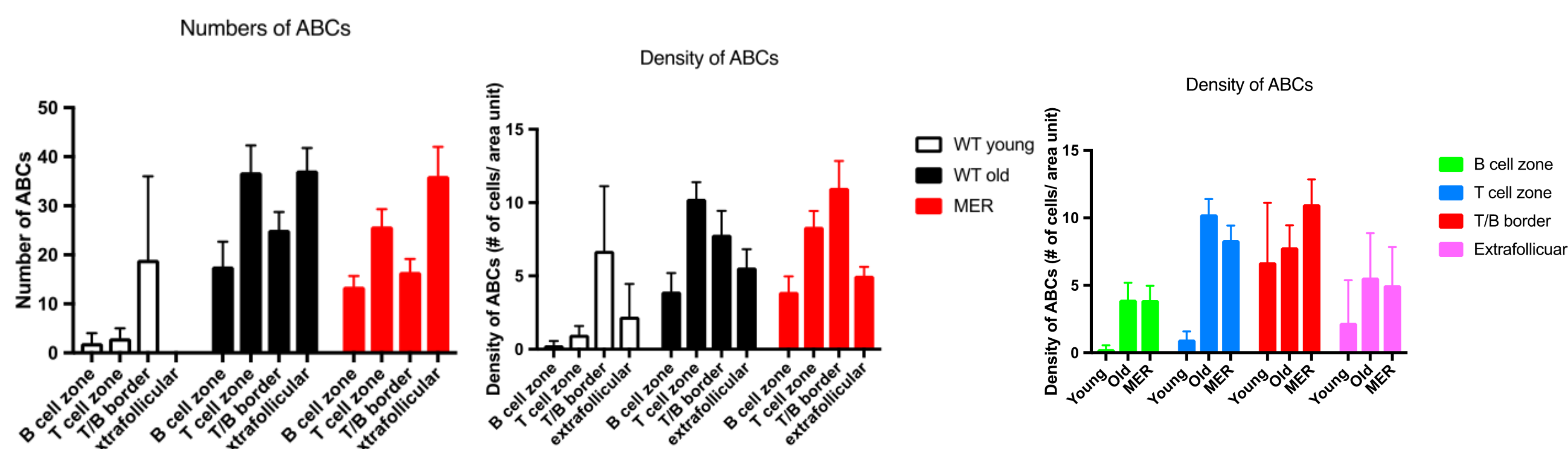


Figure 4. Fluorescent microscopy staining of spleen sections obtained from wild type young, wild type old and MER (autoimmune) mice



## Результаты и выводы

В ходе нашего исследования мы обнаружили, что плотность ABC клеток у больных аутоиммунными заболеваниями и старых мышей увеличивается в Т-клеточной зоне, и у всех рассматриваемых мышей ABC-клетки преимущественно располагаются на пересечении Т и В-клеточных зон. Также мы увидели существенное преобладание ABC-клеток в экстрафолликулярном пространстве у старых и больных мышей.

В герминальном центре фолликулов ABC-клеток не было обнаружено, но в дальнейшем необходимо провести ещё серию экспериментов для получения более точных результатов. На основании полученных данных мы можем сделать вывод о том, что количество ABC клеток в Т-клеточной зоне возрастает в ходе развития аутоиммунного заболевания, что может быть связано с их активным взаимодействием с Т-клетками в этот период.

Также, плотность ABC-клеток увеличивается в экстрафолликулярном пространстве, предположительно, в связи с началом активной выработки антител и направленного воздействия на развитие аутоиммунитета.