

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ПОПУЛЯЦИЙ В1-ЛИМФОЦИТОВ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, Н.В. Грищенко¹, Д.А. Рябчиков¹,
Л.Ю. Гривцова³, И.С. Базин¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Калужская область, Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. В1-лимфоциты — субпопуляция В-клеток, на долю которой в селезенке приходится 5 % от общего числа В-клеток. В1-лимфоциты секретируют преимущественно IgM, который играет важную роль в индукции апоптоза опухолевых клеток. Спленэктомия с целью адекватной лимфодиссекции при раке желудка вызывает выраженные и длительные иммунологические нарушения. Это в первую очередь затрагивает субпопуляцию В1а-лимфоцитов, которая обеспечивает тимуснезависимый иммунный ответ.

Цель исследования — изучить особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка.

Материалы и методы. Проанализирован субпопуляционный состав В-лимфоцитов периферической крови больных раком желудка, подвергшихся хирургическому лечению методом проточной цитометрии (Facs Can, программа Lysys II и FacsCanto II, программа Facs Diva). Клетки окрашивались одномоментно тремя моноклональными антителами, меченными различными флуорохромами.

Результаты. Полученные данные демонстрируют нарушение состава субпопуляций В-клеток. В группе больных со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией на дооперационном этапе и спустя 3 мес после операции выявлена достоверная корреляция между относительным количеством В-лимфоцитов ($p = 0,018$), CD5+В-лимфоцитов ($p = 0,012$) и количеством CD19+CD38+ клеток ($p = 0,035$). Кроме того, после хирургического лечения значительно возрос процент CD5+В-лимфоцитов — с 12,9 до 21,8 %, тогда как суммарное количество CD19+ лимфоцитов и CD19+CD21+ клеток снижалось.

Заключение. У больных опытной группы может наблюдаться снижение антителопродукции, ослабление как общего, так и противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: В-лимфоциты, тимуснезависимые антигены, гуморальный иммунитет, рак желудка, спленэктомия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70

THE ROLE OF B-1 LYMPHOCYTES IN ANTITUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

S. V. Chulkova^{1,2}, E. N. Sholokhova¹, N. V. Grishchenko¹, D. A. Ryabchikov¹, L. Y. Grivtsova³, I. S. Bazin¹, N. N. Tupitsyn¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia;

³A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; 10 Marshal Zhukov St., Obninsk, Kaluga region, 249031, Russia

Introduction. B1-lymphocytes are a subpopulation of B-cells, the proportion of which in the spleen accounts for 5 % of the total number of B-cells. B1-lymphocytes predominantly secrete IgM, which plays an important role in the induction of tumor cell apoptosis. Splenectomy for the purpose of adequate lymph node dissection in gastric cancer causes marked and prolonged immunological disorders. It primarily affects the B1a-lymphocyte subpopulation, which provides a thymus-independent immune response.

Objective. To study the features of the B-cell component of immunity in patients with gastric cancer.

Materials and methods. The subpopulation composition of B-lymphocytes of peripheral blood of gastric cancer patients undergoing surgical treatment using flow cytometry (Facs Can, Lysys II and FacsCanto II programs, Facs Diva program) was analyzed. Cells were stained simultaneously with three monoclonal antibodies labeled with different fluorochromes.

Results. The data obtained demonstrate a violation of the composition of B-cell subpopulations. In the group of patients with standard D2 lymph node dissection and splenectomy at the preoperative stage and three months after surgery, a significant correlation was found between the relative number of B lymphocytes ($p = 0.018$), CD5 + B lymphocytes ($p = 0.012$) and the number of CD19 + CD38 + cells ($p = 0.035$). In addition, after surgical treatment, the percentage of CD5 + B-lymphocytes increased significantly from 12.9 to 21.8 %, while the total number of CD19 + lymphocytes and CD19 + CD21 + cells decreased.

Conclusion. In patients of the experimental group, a decrease in antibody production, weakening of both general and antitumor immunity can be observed.

Key words: B-lymphocytes, thymus-independent antigens, humoral immunity, gastric cancer, splenectomy

Введение

Селезенка является одним из важнейших периферических лимфоидных органов, обеспечивающих гуморальный иммунитет. В селезенке происходят сложные процессы селекции и активации В-клеток. Незрелые В-клетки поступают из костного мозга во вторичные лимфоидные органы (селезенку, лимфатические узлы, пейеровы бляшки кишечника), где происходят их дальнейшее созревание, презентация антигена, пролиферация и окончательная дифференцировка [1]. В результате созревания на их поверхности появляются молекулы IgD, CD21, CD22 (табл. 1). Антигены CD19, CD81 (иное название TAPA-1) и CD21 ассоциированы в комплекс, называемый В-клеточным корецептором. Связывание антигена с корецептором усиливает активационный сигнал, передаваемый через BCR [2, 3]. Процесс активации В-клеток может осуществляться в ответ на тимусзависимые антигены или без участия Т-лимфоцита [4]. Большинство зрелых В-клеток располагается в пределах лимфоидных фолликулов селезенки и лимфатических узлов, где они сталкиваются и реагируют на Т-зависимые антигены, связанные с CD23+ фолликулярными дендритными клетками, пролиферируют, либо дифференцируются в плазматические клетки. Направленность дифференцировки регулируется в апикальной зоне зародышевых центров [5]. Незрелые В-клетки реагируют на Т-клеточные независимые антигены 1-го типа, которые вызывают быстрый ответ антителопродукции.

При контакте В-лимфоцитов с тимусзависимыми антигенами происходит связывание специфического иммуноглобулинового рецептора В-клеток. Затем в фолликулах селезенки и лимфатических узлов запускается дифференцировка наивных В-лимфоцитов в ходе первичных иммунных ответов. При отсутствии антигенной стимуляции В-лимфоциты или мигрируют в лимфатические сосуды и продолжают циркулировать, или погибают [6].

При осуществлении вторичных иммунных ответов на тимусзависимые антигены отмечаются выраженная В-клеточная пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, что происходит в пределах наружной зоны периартериальных лимфоидных муфт [7, 8].

Селезенка является основным местом синтеза IgM [9–11]. Антитела класса М появляются на ранних стадиях фило- и онтогенеза, продуцируются активированными В-лимфоцитами в ходе первичных

иммунных ответов, осуществляемых в периферических лимфоидных органах [12]. Обладают высокими агглютинирующими свойствами и опсонизирующим эффектом. Данный иммуноглобулин представляет собой полимер из 5 мономеров, связанных друг с другом ковалентными связями, известными как дисульфидные связи, и составляют около 10 % всех иммуноглобулинов. Время полужизни IgM не более 5 дней. Примерно половина сывороточного IgM секретируется В1 летками. Антитела класса М играют ключевую роль в индукции апоптоза опухолевых клеток [13–15].

Таблица 1. Молекулы клеточной поверхности, экспрессируемые В-клетками

Название	Оригинальное имя	Экспрессия на клетках
CD19	B4	Пан-В-клеточный антиген, FDCs
CD20	B1	Зрелые В-клетки
CD21	B2, HB-5	Зрелые В-клетки, FDCs
CD22	BL–CAM, Lyb-8	Зрелые В-клетки
CD23	FcεRII	Активированные В-клетки, FDCs, s
CD24	BA-1, HB6	Пан-В-клеточный антиген, гранулоциты, эпителиальные клетки
CD40	Bp50	В-клетки, эпителиальные клетки, FDCs
CD72	Lyb-2	Пан-В-клеточный антиген
CD79a, b	Iga, β	Поверхностный Ig+ В-клеток
CD81	B2	Зрелые В-клетки

Объем хирургического вмешательства при раке желудка при выполнении гастрэктомии или проксимальной резекции включает проведение D2-лимфодиссекции, что подразумевает спленэктомию, которая выполняется для полного удаления лимфатических узлов ворот селезенки [16]. Многочисленные данные литературы сообщают о росте частоты послеоперационных осложнений и летальности в результате спленэктомий [17–21]. Подобные исходы являются результатом дисфункции различных компартментов иммунной системы, в числе которых нарушения пропорции популяций В-лимфоцитов и презентации макрофагами чужеродных антигенов Т- и В-лимфоцитам, снижения уровня секреции

иммуноглобулинов [22–24]. Но в первую очередь изменения затрагивают В-клеточный иммунный ответ, в том числе на тимуснезависимые антигены 2-го типа, который обеспечивается особой субпопуляцией В1а-лимфоцитов [25].

Популяция В1-лимфоцитов относится к древней ветви антителопродуцирующих клеток в филогенезе. Впервые популяция В1-лимфоцитов описана в 1983 г. Ли Херценбергом как CD5⁺-популяция, которая отличается от обычных В (В-2)-клеток фенотипом, анатомической локализацией, способностью к самовосстановлению и производством естественных антител. В-1-популяция лимфоцитов включает 2 субпопуляции: В1а и В1б [26, 27].

Цель исследования – оценить особенности В-клеточного звена у больных раком желудка.

Материалы и методы

Все больные раком желудка, принимавшие участие в исследовании, были разделены на 2 группы: 1-я группа больных получила хирургическое лечение в объеме гастрэктомии, D2-лимфодиссекции с сохранением селезенки; во 2-й группе больные прооперированы в объеме гастрэктомии согласно стандартам D2-лимфодиссекции, которая сопровождалась спленэктомией. Исследование субпопуляций В-лимфоцитов проводилось на дооперационном этапе и спустя 3 мес после хирургического вмешательства.

Всего в исследовании приняли участие 50 больных. Средний возраст больных составил 59 лет. В нашем исследовании преобладали женщины. У 16 больных установлена I стадия, у 12 больных – II стадия, у 18 больных – III стадия, у 4 больных – IV стадия. Иммунофенотипирование популяций В-лимфоцитов периферической крови до операции выполнено у 50 больных, спустя 3 мес после хирургического пособия – у 29 больных.

Субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови исследовались в реакции прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной флуоресцентной метки. В работе использованы моноклональные антитела, меченные следующими флуорохромами: FITC – флуоресцеин, PE – фикоэритрин, PerCR – пиридининхлорофил, двойной (тандемный) краситель, сочетающий фикоэритрин с цианином 5 (PE-cy5). Проведен анализ экспрессии мембранных антигенов: CD20, CD21, CD23, CD38, HLA-DR, CD71, CD10, CD95, CD25, CD5, CD56, легких цепей иммуноглобулинов IgG-λ и IgG-κ (табл. 2).

Сбор данных проводился на проточных цитометрах (Facs Can, программа Lysys II и FacsCanto II, программа Facs Diva), анализ данных – с использованием приложения WinMDI 2.8 и FCS 3.0. Экспрессия мембранных антигенов оценивалась в гейте CD19⁺В-клеток. При этом на первом этапе анализа

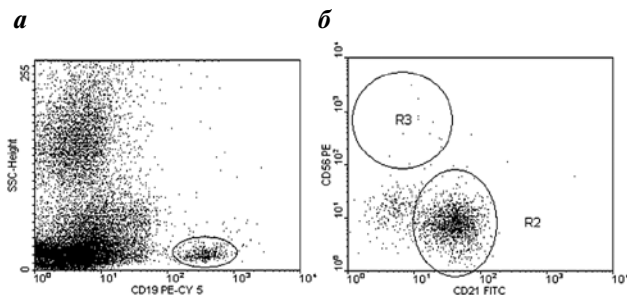


Рис. 1. По оси абсцисс – экспрессия пан-В-клеточного антигена CD19⁺; по оси ординат – параметр бокового светорассеяния лазерного луча, отражающий рабочее цитометрическое понятие – гранулярность клетки; а – оценка общего количества CD19⁺В-клеток в пределах лимфоцитов; б – оценка экспрессии 2 антигенов, ассоциированных с В-клетками в гейте CD19⁺CD56 и CD21

Таблица 2. Моноклональные антитела и антигены

Антиген	Клон антител	Изотип антител	Производитель	Флуорохром
CD19	4G7, H1B19	IgG1-κ	BD Biosciences	PerCP
CD20	2H7	IgG1-κ	BD Biosciences	PE
CD23	LT23	IgG1-κ	Сорбент, Россия	FITC
CD5	L17F12	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD21	BL13	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
CD10	HL10a	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD71	L01.1	IgG2a-κ	BD Biosciences	FITC
CD95	DX2	IgG1-κ	BD Biosciences	PE
CD25	2A3	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
CD56	NCAM 16.2	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD3	SK7	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
IgG- λ/ IgG-κ	–	–	BD Biosciences	PE\FITC

цитометрически оценивалось количество CD19⁺В-клеток в пределах лимфоцитов (рис. 1а). Далее, в пределах только В-клеток (гейт CD19⁺) (рис. 1б) проводился анализ экспрессии 2 антигенов, ассоциированных с В-клетками. В приведенных образцах это оценка антигенов CD56 одновременно с CD21 и CD20 одновременно с CD23 (см. рис. 1б). В 42 образцах периферической крови до операции и 23 после операции на гематологическом анализаторе Micros 60 была подсчитана гемограмма, что позволило оценить абсолютное количество В-клеток.

Результаты и обсуждение

На дооперационном этапе у 33 % больных раком желудка выявлено снижение относительного количества

В-клеток (менее 5 %) и у 38 % — снижение абсолютного количества. Через 3 мес после операции в 52 % случаев оказалось сниженным относительное количество В-клеток, у 31 % — абсолютное содержание В-лимфоцитов.

Среднее относительное количество В-клеток, так же как и их среднее абсолютное содержание в 1 мкл периферической крови, спустя 3 мес после оперативного вмешательства оказалось незначительно повышенным по сравнению с данными показателями при оценке до операции. Средний процент В-лимфоцитов крови после операции был несколько ниже, чем до оперативного вмешательства. Вместе с тем данные различия оказались статистически недостоверными (Т-тест при сопоставлении двух независимых переменных). Это может объясняться значительным разбросом анализируемых показателей у больных как до оперативного вмешательства, так и после.

При анализе популяций В-клеток у больных раком желудка отмечено наличие выраженной пропорции В1-лимфоцитов. В1 рассматриваются как ключевые игроки раннего гуморального ответа против патогенов и считаются первичными продуцентами антител в ответ на Т-клеточные независимые антигены типа 2 [28]. Специфический тимуснезависимый ответ реализуется двумя субпопуляциями В1-клеток: В1а и В1b.

Субпопуляции В1-лимфоцитов схожи между собой, но для субпопуляции В1b характерно отсутствие экспрессии CD5 [29]. Субпопуляция В1а-лимфоцитов имеет фенотип CD19+CD21lowCD23-CD5+IgM++. Число CD19+CD5+ В-клеток периферической крови у больных раком желудка в среднем составило 17,7 %.

В1а-лимфоциты — минорная популяция В-клеток, появляющаяся раньше других субпопуляций В-лимфоцитов, развивающаяся из клеток-предшественников в печени плода. На раннем этапе онтогенеза предшественники В1а-лимфоцитов мигрируют из эмбриональных кроветворных тканей (фетальной печени, оментума) в брюшную и плевральную полости. Важно то, что данная субпопуляция в пределах селезенки получает информацию об антигенах, не принимая участие в рециркуляции. В1b-лимфоциты тоже происходят из фетальных предшественников,

мигрирующих в эмбриональном периоде в серозные полости, где и остаются на протяжении всей жизни организма, а пул их у взрослых может частично пополняться за счет костного мозга [30, 31]. В целом пул В1-популяции поддерживается за счет активности клеток-предшественников, пролиферирующих довольно медленно.

В1-клетки характеризуются «активированным фенотипом»: на их поверхности экспрессируются ко-стимулирующие молекулы CD80 и CD86. Посредством такого фенотипа В1-лимфоциты осуществляют функции антигенпрезентирующих клеток. В1-лимфоциты осуществляют тимуснезависимый ответ и преимущественно продуцируют антитела класса М [32]. Антитела IgM являются наиболее ранними в иммуногенезе. Многие из антител полиспецифичны, имеют низкую аффинность и таким образом взаимодействуют с несколькими антигенами, включая аутоантигены. В1-клетки постоянно циркулируют между селезенкой и брюшной полостью, не поступая в фолликулы, поскольку не экспрессируют рецептор хемокина. Поэтому процессы «усовершенствования» гуморального иммунного ответа в виде переключения изотипов и повышения сродства к антигенам, не затрагивают или минимально затрагивают В1-клетки [33].

В норме В1а-субпопуляция лимфоцитов составляет не более 10 % от общего количества В-лимфоцитов периферической крови. Представляет интерес то, что в ходе исследования у 23 % больных раком желудка в периферической крови обнаружено значительное количество В1а-лимфоцитов, превышающих норму в 2 раза. Более того, следует обратить внимание на то, что у 3 больных наблюдалось более 40 % CD19+CD5+-лимфоцитов.

Изучение субпопуляции В1а-лимфоцитов у больных раком желудка, у которых наблюдалось их более 15 %, выявило выраженную экспрессию CD25+ и CD21+-антигенов (различия достоверны), CD38+-клеток при сравнении с группой, где количество В1а-лимфоцитов менее 15 % (табл. 3).

В группе больных, у которых субпопуляция В1а-клеток составила более 25 %, наблюдалось наличие выраженного числа клеток, экспрессирующих CD38+-

Таблица 3. Значительные популяции В-клеток в группах больных раком желудка с CD5+-лимфоцитами (1-я группа ≥ 15 %) и их нормальным содержанием (2-я группа < 15 %)

Популяция	1-я группа	2-я группа	Число, 1-я группа / 2-я группа	t-критерий	Значимость
CD21	85,3 \pm 1,6	79,1 \pm 1,9	13 / 27	2,436	0,02
CD25	3,9 \pm 2,0	0,7 \pm 0,1	11 / 26	2,435	0,02
CD38	27,7 \pm 6,5	16,1 \pm 2,9	16 / 38	1,858	0,07

и CD23+-антигены (достоверная корреляция для В-клеток с экспрессией CD38- и CD23-антигенов, $R = 0,885$; $p = 0,008$). Кроме того, наблюдалась высокая вероятность присутствия субпопуляции CD19+CD5+CD25+ ($R = 0,879$; $p = 0,05$). Однако в подавляющем большинстве случаев количество CD19+CD38+ В-клеток оказалось менее 15 %.

Таким образом, у 17,7 % больных раком желудка в периферической крови отмечается присутствие выраженной пропорции особой субпопуляции, обеспечивающей специфический ответ на тимуснезависимые антигены 2-го типа, который сопровождается преимущественно синтезом IgM – В1а-лимфоцитов. Для популяции В1а-лимфоцитов отмечен «активированный фенотип», что проявляется в экспрессии на их поверхности активационных антигенов CD38 и CD25.

В селезенке происходят сложные процессы дифференцировки, селекции В-лимфоцитов, пополнения пула рециркулирующих В-лимфоцитов. Чтобы оценить особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка после гастрэктомии со спленэктомией, проведено исследование субпопуляций В-лимфоцитов в динамике: до и после операции. Иммунофенотипический профиль В-клеток изучен у 14 больных раком желудка со спленосохранной D2-лимфодиссекцией и гастрэктомией и у 16 больных раком желудка после гастрэктомии и D2-лимфодиссекции со спленэктомией (рис. 2).

В 1-й группе больных при попарном сопоставлении (Т-критерий для парных переменных) средних величин до операции и после установлена достоверная корреляция между относительным (доля на лимфоциты и на лейкоциты) и абсолютным (клетки в 1 мкл крови) количеством CD19+ В-клеток ($p = 0,015$; $p = 0,04$ и $p = 0,05$ соответственно). Аналогичная корреляция выявлена для популяции CD19+CD21+-клеток ($p = 0,034$).



Рис. 2. Содержание В-лимфоцитов и их субпопуляций у больных со спленосохранной D2-лимфодиссекцией

Сравнительный анализ, проведенный во 2-й группе больных на дооперационном этапе и спустя 3 мес. после операции, выявил достоверную корреляцию между относительным количеством В-лимфоцитов ($p = 0,018$), CD5+В-лимфоцитов ($p = 0,012$) и количеством CD19+CD38+-клеток ($p = 0,035$). Показатели В-клеток в группе больных раком желудка после гастрэктомии со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией представлены на рис. 3.

Любопытные данные были получены в ходе изучения субпопуляции В1а-лимфоцитов в динамике у больных 2-й группы. После оперативного вмешательства отмечено значительное количество клеток, экспрессирующих CD5+антиген ($t = -6,015$, $\text{sig.} < 0,0001$, $p = 0,013$), а относительное количество CD19+ лимфоцитов снизилось. Вместе с тем выявлено снижение числа CD19+CD21+ В-лимфоцитов с 83,6 до 73,9 % ($p = 0,08$). Следует отметить, что наибольшее число зрелых CD19+CD21+ В-клеток



Рис. 3. Показатели В-клеток в группе больных раком желудка после гастрэктомии со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией

в организме аккумулировано в маргинальной зоне селезенки. При сравнении 1-й и 2-й групп больных раком желудка после проведенного оперативного вмешательства спустя 3 мес. обращает на себя внимание выраженное количество CD19+CD5+В-клеток у пациентов 2-й группы, достигающее 21,7 % ($p = 0,049$), которые являются предшественниками функционально более совершенных, клонально более разнообразных истинных В-клеток.

Заключение

Полученные результаты по изучению особенностей В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка демонстрируют нарушение состава субпопуляций В-лимфоцитов, которое затрагивает в первую очередь В1а-популяцию. На дооперационном этапе большинство В-клеток периферической крови больных раком желудка слабо экспрессировали антиген CD21, который ассоциирован с другими молекулами в комплексе, называемом В-клеточным

корцептором, связывание антигена с которым усиливает активационный сигнал, передаваемый через BCR. Вместе с тем у больных раком желудка отмечены присутствие выраженного количества CD23+В-клеток и случаи клональных В-клеток. После хирургического вмешательства в группе больных со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией значительно возрос процент CD5+ В-лимфоцитов с 12,9 до 21,8 %, тогда как суммарное количество CD19+-лимфоцитов и CD19+CD21+-клеток снизилось. Учитывая полученные данные и принимая во внимание, что В1-лимфоциты осуществляют преимущественно тимуснезависимый ответ и в основном продуцируют антитела класса М, у больных раком желудка после спленэктомии может наблюдаться иммунодепрессия, сопровождающаяся снижением образования антител, в том числе IgM, играющего важную роль в индукции апоптоза опухолевых клеток, поскольку подавляющий процент сывороточного IgM секретируется В1-клетками.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tupitsyn N.N. The structure and function of the human immune system. 2nd ed. M.: Medicine, 2007. Pp. 46–65.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cellular and molecular Immunology. W.B. Saunders company, 1996. Pp. 28–32.
3. Koiko R., Sunshine D., Benjamin E. Immunology. M.: Academy, 2008. 362 p.
4. Vos Q., Lees A., Wu Z.-Q. et al. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunological Reviews 2000;176:154–70. PMID: 11043775. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.00607.x.
5. Chulkova S.V. Stilidi I.S., Glukhov V.G. et al. The spleen as a peripheral immunity organ. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN 2014;25(1):21.
6. Rabons A., Roit A., Delz P. Basics of Medical Immunology. M.: Mir, 2006. 320 p.
7. Liu Y.J. Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen (review). J Exp Med 1997;186:625–9. PMID: 9312553. DOI: 10.1084/jem.186.5.625.
8. Mebius R., Kraal G. Structure and function of the spleen. Nature Rev Immunol 2005;5:606–16. DOI: 10.1038/nri1669.
9. Roit A., Brostoff J., Mail D. Immunology. Per. from English. M.: Mir, 2000. 581 p.
10. Kruetzmann S., Rosado M.M., Weber H. et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. J Exp Med 2003;197(7):939–45. PMID: 12682112. DOI: 10.1084/jem.20022020.
11. Di Sabatino A., Rosado M., Ciccocioppo R. et al. Depletion of immunoglobulin M memory B cells is associated with splenic hypofunction in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2005;100 (8):1788–95. PMID: 16086716. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41939.x.
12. Mikhaylenko A.A., Bazanov G.A., Pokrovsky V.I., Konenkov V.I. Prophylactic immunology. M.: Tver; Triad, 2004. 448 p.
13. Brandlein S., Lorenz J., Ruoff N. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. Hum Antibodies 2002;11(4):107–19. PMID: 12775891. DOI: 10.3233/HAB-2002-11401.
14. Varambally S., Bar-Dayan Y., Bayry J. Natural human polyreactive IgM induce apoptosis of lymphoid cell lines and human peripheral blood mononuclear cells. Intern Immunology 2004;16(3):517–24. PMID: 14978025. DOI: 10.1093/intimm/dxh053.
15. Piao X., Ozawa T., Hamana H. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. Oncoimmunology 2016;5(5):e1131380. PMID: 27467950. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1131380.
16. Glukhov E.V., Chulkova C.V., Grivtsova L.Yu. et al. The role of splenectomy in cancer of the body and proximal stomach. Bulletin of the Russian Scientific Center for X-ray Radiology of the Ministry of Health of Russia 2018; 1. 17 p.
17. Brady M.S., Rogatko A., Dent L.L., Shiu M.H. Effect of splenectomy on morbidity and survival following curative gastrectomy for carcinoma. Arch Surg 1991;126(3):359–64. PMID: 1998479. DOI: 10.1001/archsurg.1991.01410270105017.
18. Csendes A., Burdiles P., Rojas J. et al. A prospective randomized study comparing D2 total gastrectomy versus D2 total gastrectomy plus splenectomy in 187 patients with gastric carcinoma. Surgery 2002;131(4):401–7. PMID: 11935130. DOI: 10.1016/S0003-3944(02)00835-0.
19. Fatouros M., Roukos D.H., Lorenz M. et al. Impact of spleen preservation in patients with gastric cancer. Anticancer Res 2005;25(4):3023–30. PMID: 16080561.
20. Griffith J.P., Sue-Ling H.M., Martin I. et al. Preservation of the spleen improves survival after radical surgery for gastric cancer. Gut 1995;36(5):684–90. PMID: 7797117. DOI: 10.1136/gut.36.5.684.

21. Okuno K., Tanaka A., Shigeoka H. et al. Suppression of T-cell function in gastric cancer patients after total gastrectomy with splenectomy: implications of splenic autotransplantation. *Gastric Cancer* 1999;2(1):20–5. PMID: 11957066. DOI: 10.1007/s101200050016.
22. Vorobev A.A., Kiselevsky M.V., Titov K.S. et al. The concept of adoptive immunotherapy in patients with gastric cancer after radical surgical treatment. *Bulletin of RAMS* 2003;6:16–9.
23. Pavlova I.E., Bubnova L.N. Dynamics of indicators of cellular and humoral immunity in patients undergoing splenectomy in the late postoperative period by trauma. *Medline Express* 2007;3–4:26–31.
24. Tuguz A.R., Gromova E.G., Anisimova N.Yu. et al. Production of INF-alpha neutrophils, mononuclear cells and splenocytes of cancer patients with postoperative complications. *Herald intensive care* 2003;3:48–50.
25. Grivtsova L.Yu., Glukhov E.V., Chulkova S.V. et al. Role of splenectomy in peculiarities of peripheral blood B cell sub populations in patients with gastric cancer. *J Immunology* 2014;5:279–86.
26. Hardy R.R., Hayakawa K. B-cell development pathways. *Ann Rev Immunol* 2001;19:595–621. PMID: 11244048. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.595.
27. Hayakawa K., Hardy R.R., Parks D.R., Herzenberg L.A. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immuno-defective, and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983;157:202–18. PMID: 6600267. DOI: 10.1084/jem.157.1.202.
28. Martin F., Kearney J.F. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B-cells as part of a “natural immune memory”. *Immunol Rev* 2000;175:70–9. PMID: 10933592. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2000.imr017515.x.
29. Berland R., Wortis H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002;20:253–300. PMID: 11861604. DOI: 10.1155/2013/827254.
30. Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 2006;7:293–301. PMID: 16429139. DOI: 10.1038/ni1301.
31. Dorshkind K., Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 2007;7:213–9. PMID: 17318232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001173.
32. LeBien T. W., Tedder T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570–80. PMID: 18725575. DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071.
33. Burmester G.-R., Pecutto A. *Visual immunology*. M.: Binom. 3rd ed. 2014. 320 p.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.В. Чулкова/S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Н.В. Грищенко/N.V. Grishchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7515-8182>

Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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