

На правах рукописи

Абишева Надежда Николаевна

**ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
АУТОРЕАКТИВНОСТИ. ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
МОДЕЛИ АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У
МЫШЕЙ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Челябинск – 2020

Работа выполнена на кафедре иммунологии и клеточной биологии института естественных наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Удмуртский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Меньшиков Игорь Викторович

Официальные оппоненты:

Селедцова Галина Викторовна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, лаборатория клеточных биотехнологий, заведующий.

Четина Елена Васильевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, лаборатория иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 года в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.117.03 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте <http://www.chelsma.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Юлия Сергеевна Шишкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Одним из ключевых вопросов современной иммунологии является вопрос о механизмах регуляции аутоиммунитета. Согласно существующим представлениям о механизмах формирования естественной толерантности, ареактивность иммунной системы по отношению к аутоантигенам формируется по механизму клональной делеции аутореактивных Т-лимфоцитов в тимусе и анергии В-лимфоцитов (Mackay, I.R. Autoimmunity since the 1957 clonal selection theory: a little acorn to a large oak / I.R. Mackay // Immunology and Cell Biology. 2008. Vol. 86. P. 67–71; Ramsdell, F. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance / F. Ramsdell // Science. 1990. Vol. 15. P. 1342-1348). В то же время, в эти представления не укладываются многие современные факты, в частности, они не объясняют существование аутореактивных лимфоцитов и аутоантител ко многим аутоантигенам у здоровых людей. Более того, аутореактивные клоны и аутоантитела называемые «естественными аутоантителами» сегодня рассматриваются как норма (Coutinho, A. Natural autoantibodies / A. Coutinho, M. Kazatchkine, S. Avrameas // Current opinion in immunology. 1995. Vol. 7. P. 812-818; Lacroix-Desmazes, S. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals / S. Lacroix-Desmazes, S. Kaveri, L. Mouthon // J Immunol Methods. 1998. Vol. 216. P. 117-137). Уровень «естественных аутоантител» в норме поддерживается на относительно низком уровне, и не приводит к повреждению клеток и тканей собственного организма, их уровень может повышаться временно до повреждающего уровня во время иммунного ответа на инфекцию или вакцинацию (Sinclair, N. B cell/antibody tolerance to our own antigens / N. Sinclair // Front Biosci. 2004. Vol. 9. P. 3019-3028).

Существование аутореактивных лимфоцитов и аутоантител ко многим аутоантигенам в норме предполагает, что аутореактивные клетки должны находиться под негативным контролем. Сегодня это широко обсуждается, в частности, роль в этом Т-регуляторных клеток (Groux, H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses / H. Groux // Transplantation. 2003. Vol. 75. P. 8-12). Несмотря на успех в изучении этих субпопуляций клеток, механизмы специфической регуляции аутоиммунитета все еще остаются неизвестными. Одной из гипотез, которая позволяет непротиворечиво объяснить механизмы избирательного, специфического контроля механизмов регуляции аутоиммунитета, является гипотеза об идиотип-антиидиотипических (ИИИ) взаимодействиях между лимфоцитами, лежащих в основе

формирования иммунной сети и их роли в регуляции аутоиммунитета (Behn, U. Idiotypic networks: toward a renaissance? / U. Behn // Immunol Rev. 2007. Vol. 216. P. 142-152; Rodkey, L.S. Autoregulation of immune responses via idiotypic network interactions / L.S. Rodkey // Microbiol Rev. 1980. Vol. 44. P. 631-659).

Впервые идею об идиотипических взаимодействиях выдвинул N. Jerne в 1974 г. (Jerne, N. Towards a network theory of the immune system / N. Jerne // Ann Immunol. 1974. Vol. 125. P. 373-389). После публикации работы N. Jerne было получено много фактов в пользу существования иммунной сети, но, к сожалению, осталось не раскрытым, как эта сеть организована и как она работает. В настоящее время эта гипотеза остается привлекательной для исследователей, особенно в отношении механизмов контроля аутоиммунитета. На данный момент нет ясных представлений о функционировании иммунной сети, и ее роли в механизмах иммунорегуляции.

Для исследования идиотипических механизмов регуляции аутореактивности была выбрана экспериментальная модель аутоиммунной гемолитической анемии (АГА) у мышей, вызванная введением эритроцитов крысы (ЭК) и модель АГА у мышей, вызванная введением аллогенных эритроцитов.

Ранее на модели АГА у мышей, индуцированной введением ЭК, было показано, что ИАИ взаимодействия являются механизмом индукции аутоиммунной реакции (Menshikov, I. Evidence in favor of a role of idiotypic network in autoimmune hemolytic anemia induction: theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva // Int Immunol. 2008. Vol. 20. P. 193-198). Существование в норме аутореактивных клонов, которые могут быть активированы посредством ИАИ взаимодействий между лимфоцитами, делает привлекательной идею о том, что идиотипические взаимодействия могут быть механизмом специфической регуляции аутоиммунитета.

Известно, что одним из факторов, влияющих на кинетику иммунного ответа, является доза и природа вводимого антигена. Поэтому одним из подходов, для изучения идиотипических механизмов регуляции аутоиммунных реакций в данной работе, стало исследование кинетики аутоантител к ЭМ и антител к ЭК при разных дозах и природе вводимого антигена в модели АГА у мышей.

Кроме экспериментальных исследований, одним из подходов, направленных на выяснение механизмов организации и функционирования иммунной сети является математическое моделирование. За последние десятилетия вышло много работ посвященных теоретическим исследованиям иммунной сети, математическому

моделированию ее организации и функционирования (Bartolucci, S. The role of idiotypic interactions in the adaptive immune system: a belief-propagation approach / S. Bartolucci, A. Mozeika, A. Annibale // Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment. 2016. Vol. 2016), в том числе, и в отношении регуляции аутоиммунитета (Root-Bernstein, R. Towards an integration of mathematical models, theories and observations concerning autoimmune diseases / R. Root-Bernstein // Journal of Theoretical Biology. 2015. Vol. 375. P. 1-3).

Поэтому, с целью изучения идиотипических механизмов регуляции аутоиммунитета были проведены компьютерные исследования математической модели иммунной сети. Математическая модель была разработана на кафедре иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «УдГУ» (Меньшиков, И.В. Математическая модель идиотипической сети / И.В. Меньшиков, В.В. Иванов, В.П. Бовин // Иммунология. 2004. № 5. С. 275-279). Математическая модель иммунной сети была использована для моделирования экспериментальных условий аутоиммунной гемолитической анемии. В исследованиях имитировали введение разных доз гетерологичного и аллогенного антигена и наблюдали кинетику изменения активности клонов лимфоцитов в фрагменте иммунной сети с аутореактивным клоном.

Цель исследования

Изучить идиотипические механизмы регуляции аутоиммунных реакций на экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей.

Задачи исследования

1. Исследовать кинетику иммунного ответа, вызванного введением разных доз гетерологичного антигена (эритроциты крысы) в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей.
2. Провести компьютерные исследования кинетики иммунного ответа при разных дозах вводимого чужеродного антигена на математической модели иммунной сети, содержащей аутоклон.
3. Исследовать кинетику иммунного ответа, вызванного введением ауто- и аллогенных эритроцитов в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей.
4. Провести компьютерные исследования математической модели иммунной сети, в имитационном моделировании иммунного ответа, вызванного введением аутологичных и аллогенных антигенов.

5. Исследовать влияние дополнительной иммунизации мышей аллогенными эритроцитами на кинетику аутоиммунной реакции в модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, индуцированной введением гетерологичного антигена (эритроциты крысы).

Методология и методы исследования

Были проведены экспериментальные и теоретические (компьютерные) исследования. Экспериментальные исследования проводили на модели АГА мышей, у которых аутоиммунную реакцию на собственные эритроциты индуцировали введением антигена различной природы (ауто-, алло- и гетерологичные эритроциты) и в разных дозах. В работе использованы иммунологические, иммунохимические и статистические методы исследования. Теоретические (компьютерные) исследования были проведены на математической модели иммунной сети, которая представляет собой систему дискретных уравнений, описывающих ИАИ взаимодействия между лимфоцитами. Для моделирования аутоиммунной реакции в состав иммунной сети включили аутореактивный клон. Это было сделано посредством постоянной нагрузки одного из клонов аутоантигеном.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Результаты получены на хорошо изученной, адекватной и широко используемой экспериментальной модели. Экспериментальная модель АГА мышей по многим параметрам имеет сходство с аутоиммунной гемолитической анемией человека, которая протекает по тепловому типу. Результаты получены с помощью стандартизованных методов, воспроизведены в нескольких сериях экспериментов. Для оценки достоверности выявленных различий использованы адекватные статистические критерии. Используемая для теоретических исследований математическая модель иммунной сети отражает свойства реальной иммунной системы, так как она воспроизводит в рамках критичных значений параметров основные типы иммунореактивности. Математическая модель иммунной сети является адекватной, так как полученная в модели кинетика идиотипа и антиидиотипа в ответ на введение антигена хорошо согласуется с экспериментальными кинетиками идиотипических и антиидиотипических антител.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на VI конференции иммунологов Урала «Актуальные проблемы фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии» (Ижевск, 2007); Объединенном

иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию Красноярского Краевого Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями «Дни иммунологии в Сибири» (Красноярск, 2010); VIII Конференции иммунологов Урала (Сыктывкар, 2010); XXI съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга, 2010); Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции» посвященной 40-летию ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России (Санкт-Петербург, 2014); III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Формулировка основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии диссертационного исследования, а также интерпретация и анализ полученных результатов, представление результатов в научных публикациях проводились диссертантом совместно с научным руководителем. Цель, задачи, дизайн исследования, анализ, систематизация и обобщение литературы по изучаемой проблеме проведены диссертантом самостоятельно. Экспериментальные исследования на животных, имитационное моделирование в компьютерных исследованиях на математической модели иммунной сети осуществлялись соискателем лично. Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, оформление рукописи диссертации, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия лежат в основе концентрационной зависимости кинетики антител и аутоантител в ходе иммунного ответа мышей на введение крысиных эритроцитов в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии.

2. Антиидиотипические лимфоциты по отношению к аутореактивным (идиотипическим) лимфоцитам к эритроцитам мыши являются фактором специфической регуляции аутореактивных клонов лимфоцитов к эритроцитам мыши.

Научная новизна

Впервые в экспериментальных и теоретических исследованиях на экспериментальной модели АГА у мышей, вызванной введением гетерологичных эритроцитов показана и раскрыта роль ИАИ взаимодействий в регуляции аутореактивных лимфоцитов. Впервые описан феномен концентрационной зависимости очередности продукции аутоантител и антител на «чужое» в ходе иммунного ответа и роль ИАИ взаимодействий в его объяснении.

Впервые в данном исследовании была разработана и поставлена экспериментальная модель АГА у мышей, индуцированная введением аллогенных эритроцитов. На данной модели было показано, что введение аллогенных эритроцитов мышам приводит к развитию у последних транзиторной аутоиммунной гемолитической анемии, что проявилось в снижении количества эритроцитов в крови и росте уровня аутоантител против ЭМ. Впервые исследованы особенности кинетики иммунного ответа, вызванного разными дозами вводимых аллогенных эритроцитов, показана роль ИАИ взаимодействий в их проявлении.

Впервые обнаружено, что введение относительно малых доз аллогенных эритроцитов мышам вызывает быструю (на пятый день после иммунизации) клеточную иммунную реакцию на аутоэритроциты, сопровождающуюся развитием анемии. При увеличении дозы вводимых аллогенных эритроцитов уменьшается, или даже отсутствует данный феномен. Проявление феномена обратно зависит от роста количества антител в крови на ЭК (антиидиотипических) в ходе иммунного ответа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическое значение результатов исследования заключается в том, что они глубже раскрывают идиотипические механизмы иммунорегуляции и их ведущую роль в контроле аутоиммунности. Результаты теоретических и экспериментальных исследований, по существу, направлены на выяснение механизмов организации и функционирования иммунной сети. Результаты исследования также имеют важное практическое значение, они определяют новые мишени для специфической терапии и открывают перспективу для разработки принципиально новых лекарственных средств.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс в курсы для магистрантов - «Экспериментальные модели иммунопатологий», «Иммунология», «Фундаментальные проблемы клинической иммунологии», курсы для бакалавров - «Экспериментальные

модели в биологии», в темы дипломных, курсовых работ, а также в тематику НИОКР кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», в НИР научной лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет». Работа частично поддержана Научным проектом, выполняемым коллективами научных лабораторий образовательных организаций высшего образования, подведомственных Минобрнауки России, проект № 0827-2020-0012, государственное задание № 075-00232-20-01, тема «Разработка терапевтической вакцины, на основе конформеров Fc фрагментов IgG человека для лечения аутоиммунных заболеваний», 02.09.19-01.09.23.

Публикации по теме диссертации

Соискатель имеет 23 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 11 работ (общим объёмом 2,8 печатных листов): 8 работ в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов, и изданиях для опубликования основных научных результатов диссертации (из них 5 работ в международных базах Scopus, WoS, Pubmed, 3 в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК по специальности клиническая иммунология, аллергология), 3 работы опубликованы в материалах региональных и Всероссийских конференций.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 97 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания организации и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов. Список литературы включает 123 источника, среди которых 19 отечественных и 104 иностранных. Работа проиллюстрирована 16 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Были проведены экспериментальные и теоретические (компьютерные) исследования. Экспериментальные исследования проводили на экспериментальной модели АГА у мышей. Для индукции АГА у мышей использовали антиген различной природы (ауто-, алло- и гетерологичные эритроциты), а также варьировали дозами антигена.

Для индукции АГА, вызванной введением гетерологичного антигена (ЭК, полученные от крыс популяции Wistar), экспериментальные животные (белые нелинейные мыши) были поделены на две группы в зависимости от дозы вводимого антигена. Первую группу (n=40) иммунизировали ЭК в дозе $3,9 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5

мл ЗФР (относительно низкая доза), вторую группу (n=40) – в дозе $4,5 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5 мл ЗФР (относительно высокая доза). Иммунизацию проводили однократно, внутрибрюшинно.

Для индукции АГА, вызванной введением аллогенными эритроцитами (аллогенные эритроциты были получены от белых нелинейных мышей), экспериментальные животные (белые нелинейные мыши) были поделены на три группы в зависимости от дозы вводимого антигена. Первую группу (n=30) иммунизировали аллогенными эритроцитами в ЗФР в дозе $1,5 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5 мл ЗФР (относительно низкая доза), вторую группу (n=30) – в дозе $2,8 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5 мл ЗФР (средняя доза), третью группу (n=30) – в дозе $5,7 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5 мл ЗФР (относительно высокая доза). Иммунизацию проводили однократно, внутрибрюшинно.

Для индукции АГА, вызванной введением аутологичных эритроцитов (аутологичные эритроциты были получены от мышей линии СВА), экспериментальных животных (мыши линии СВА) (n=35) иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением эритроцитов в дозе $8 \cdot 10^8$ клеток в объеме 0,5 мл ЗФР.

Кровь на анализ забирали до иммунизации и через каждые 5 дней в течение 25-35 дней после начала эксперимента. Кровь забирали с антикоагулянтом (ЭДТА натрия), методом декапитации. Перед забором крови мышей умертвляли передозировкой эфирного наркоза. В крови немедленно подсчитывали концентрацию эритроцитов. Плазму собирали и замораживали для дальнейшего анализа. Проводили определение уровня аутоантител к ЭМ в непрямой пробе Кумбса, антител к ЭК – методом прямой гемагглютинации. Для подсчета концентрации эритроцитов в крови мышей использовали камеру Горяева.

Теоретические (компьютерные) исследования были проведены на математической модели иммунной сети, которая представляет собой систему дискретных уравнений, описывающих ИАИ взаимодействия между лимфоцитами (Меньшиков, И.В. Математическая модель идиотипической сети / И.В. Меньшиков, В.В. Иванов, В.П. Бовин // Иммунология. 2004. № 5. С. 275-279). Компьютерные исследования проводили на математической модели, включающей шесть идиотипически связанных клонов, последний по нумерации клон связан с первым клоном, замыкая цепочку в кольцо. Все клоны участвовали в идиотипических взаимодействиях, на каждый идиотипический клон приходилось два антиидиотипических. Нечетные клоны 1, 3, 5 приняли считать

идиотипическими, а четные клоны 2, 4, 6 – антиидиотипическими. Аутоклон может быть задан путем подачи постоянного стимулирующего сигнала на любой клон в цепи.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 5.0 для Windows и Microsoft Excel (Microsoft). Результаты выражали как среднее $\pm$ SD – выборочное стандартное отклонение.

Результаты собственных исследований

Экспериментальные исследования развития аутоиммунной реакции в модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей в ответ на введение разных доз эритроцитов крысы

Однократная иммунизация мышей относительно низкой дозой ЭК ($3,9 \cdot 10^8$ клеток) приводит к развитию транзиторной аутоиммунной реакции к собственным эритроцитам. Минимальное содержание эритроцитов в крови мыши, как и максимальная продукция аутоантител к ЭМ (антиидиотипических антител), отмечена на 5 день после начала иммунизации. Пик продукции антител к ЭК (идиотипических антител) наблюдается на 10 день эксперимента (рисунок 1А). Однократная иммунизация мышей относительно высокой дозой ЭК ($4,5 \cdot 10^8$ клеток) приводит к развитию транзиторной аутоиммунной реакции к собственным эритроцитам. Максимум продукции аутоантител к ЭМ совпадает с минимальной концентрации эритроцитов в крови и наблюдается на 25 день после иммунизации ЭК. Пик продукции антител к ЭК наблюдается с 5 по 10 дни после иммунизации ЭК (рисунок 1Б).

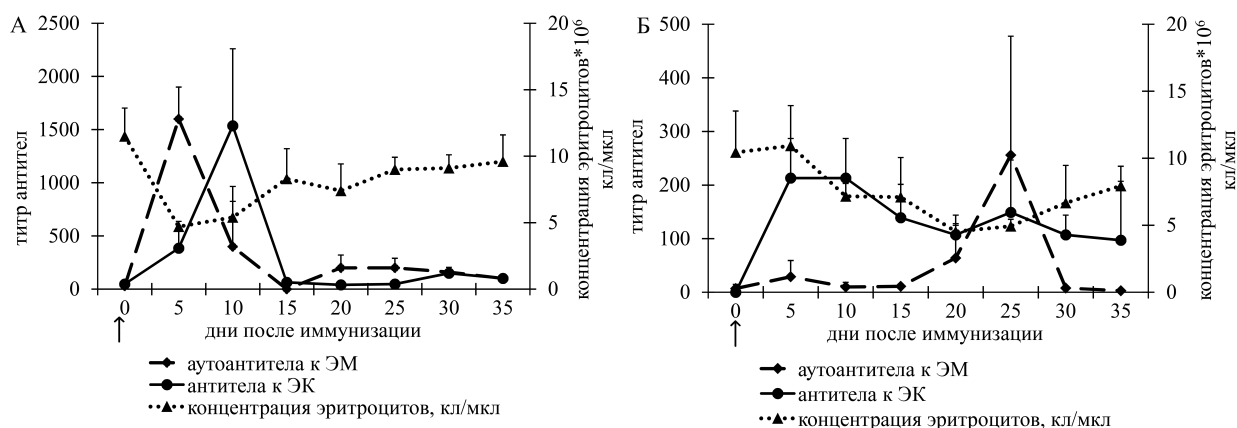


Рисунок 1 – Кинетика антител к ЭК, аутоантител к ЭМ, изменение концентрации эритроцитов в крови у мышей, иммунизированных относительно низкой дозой ЭК ($3,9 \cdot 10^8$ клеток) (А) и относительно высокой дозой ЭК ($4,5 \cdot 10^8$ клеток) (Б). Каждая точка представлена средним от 5 животных $\pm$ SD. Стрелкой показан момент введения эритроцитов крысы

Таким образом, в ответ на введение ЭК в относительно низкой дозе ($3,9 \cdot 10^8$ клеток) аутоантитела против ЭМ (антиидиотипические по отношению к антителам

против ЭК) появляются раньше, чем антитела против ЭК (идиотипические антитела). Пик продукции аутоантител к ЭМ и анемия наблюдаются на 5 день, а пик продукции антител к ЭК наблюдается на 10 день после иммунизации ЭК (рисунок 1А). В ответ на введение относительно высокой дозы гетерологичного антигена (ЭК) наблюдается инверсия в последовательности появления максимумов исследуемых антител – антитела к ЭК (идиотипические) появляются раньше, чем аутоантитела к ЭМ (антиидиотипические). Следует отметить, что продукция аутоантител к эритроцитам мыши в ответ на иммунизацию относительно высокой дозой ЭК отставлена во времени. Максимум аутоантител к эритроцитам мыши и развития анемии наблюдается только на 25 день после введения ЭК (рисунок 1Б). Таким образом, продукция антиидиотипических антител (аутоантител к ЭМ) предшествует продукции идиотипических (антител к ЭК), только в ответ на относительно низкую дозу гетерологичного антигена (ЭК). Относительно высокие дозы гетерологичного антигена вызывают последовательную продукцию идиотипических антител (антител к ЭК), за которой следует продукция антиидиотипических антител (аутоантител к ЭМ) [3, 4, 5].

Имитационное моделирование развития аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной введением различных доз гетерологичного антигена в компьютерных исследованиях математической модели иммунной сети

В экспериментальных исследованиях было показано, что очередность появления антиидиотипических антител (аутоантитела к ЭМ) и идиотипических (антитела к ЭК) антител зависит от дозы вводимого гетерологичного антигена (ЭК). Поэтому, в компьютерной модели иммунной сети исследовали кинетику идиотипических и антиидиотипических клонов в ответ на подачу чужеродного сигнала разной интенсивности. Для имитации разной дозы вводимого чужеродного антигена-индуктора варьировали интенсивность однократного сигнала, подаваемого на клоны 1 и 3 (идиотипические клоны). Однократный относительно слабый сигнал интенсивностью 1,5 с.у., $k_{ag} 0,5$, одновременно подаваемый на идиотипические клоны 1 и 3, вызывает в начале активацию антиидиотипических клонов, за которой следует активация идиотипических клонов (рисунок 2А). Одновременная подача однократного относительно сильного сигнала на идиотипические клоны клоны 1 и 3 интенсивностью 3 с.у., $k_{ag} 0,5$, приводит к последовательной активации идиотипических клонов, а затем антиидиотипических клонов (рисунок 2Б).

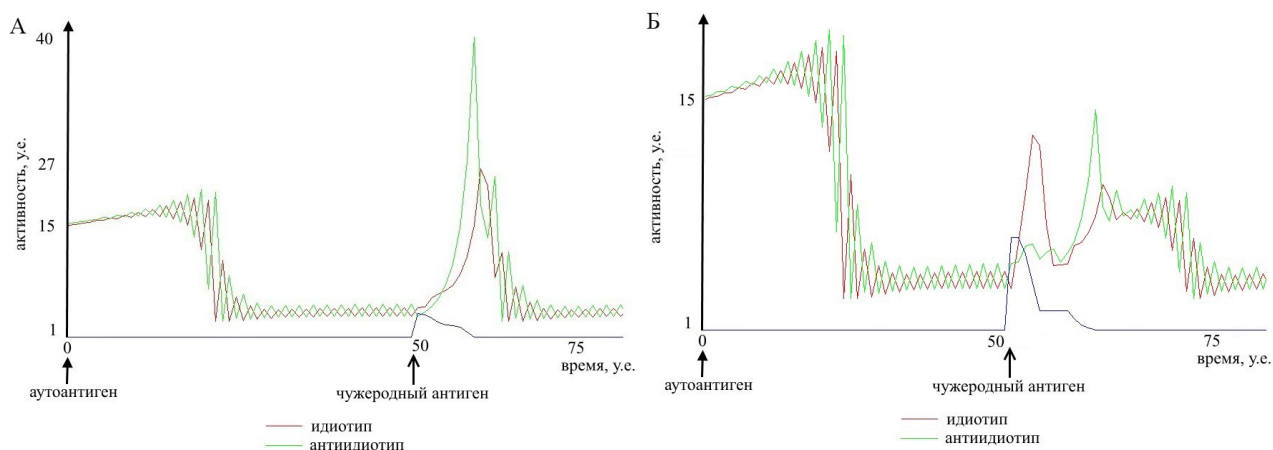


Рисунок 2 – Теоретическая кинетика уровня активности антиидиотипических и идиотипических клонов лимфоцитов в ответ на одновременную стимуляцию идиотипических клонов 1 и 3. Относительно слабый сигнал (А), относительно сильный сигнал (Б)

Таким образом, проведенное имитационное моделирование развития АГА у мышей, вызванной введением различных доз гетерологичного антигена, в компьютерных исследованиях математической модели иммунной сети, воспроизводит особенность опережающей продукции антиидиотипических антител (аутоантител к ЭМ) в ответ на стимуляцию идиотипических лимфоцитов антигеном. Обнаружено, что последовательность активации идиотипических и антиидиотипических клонов в ответ на стимуляцию идиотипических клонов зависит от интенсивности сигнала, подаваемого на идиотипические клоны (клон 1 и 3). Активация антиидиотипических клонов опережает активацию идиотипических клонов, если сигнал, подаваемый на идиотипические клоны, является относительно слабым. Относительно сильный сигнал, подаваемый на идиотипические клоны, вызывает последовательную активацию идиотипических, а затем антиидиотипических клонов. Выявлено не только качественное, но количественное совпадение результатов теоретического исследования математической модели иммунной сети и экспериментальных данных. Количественное совпадение выражается в том, что уровень продукции антител животных и активность лимфоцитов в математической модели выше в ответ на относительно низкую дозу [4, 8].

Таким образом, соответствие результатов теоретических и экспериментальных, с одной стороны, свидетельствуют об адекватности математической модели и положенных в ее основу принципов организации и функционирования иммунной сети, с другой стороны, служит экспериментальным доказательством существования идиотипических механизмов специфического контроля аутореактивности.

Кинетика иммунного ответа, вызванного введением аутологичных и аллогенных эритроцитов в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей

Иммунизация мышей аутологичными эритроцитами приводит к повышению уровня аутоантител к ЭМ с максимумом на 10 день после иммунизации. Повышение уровня аутоантител к ЭМ не сопровождается снижением эритроцитов в крови мышей. В ответ на иммунизацию аутологичными эритроцитами появляются антитела к ЭК с максимумом на 25 день (рисунок 3Г).

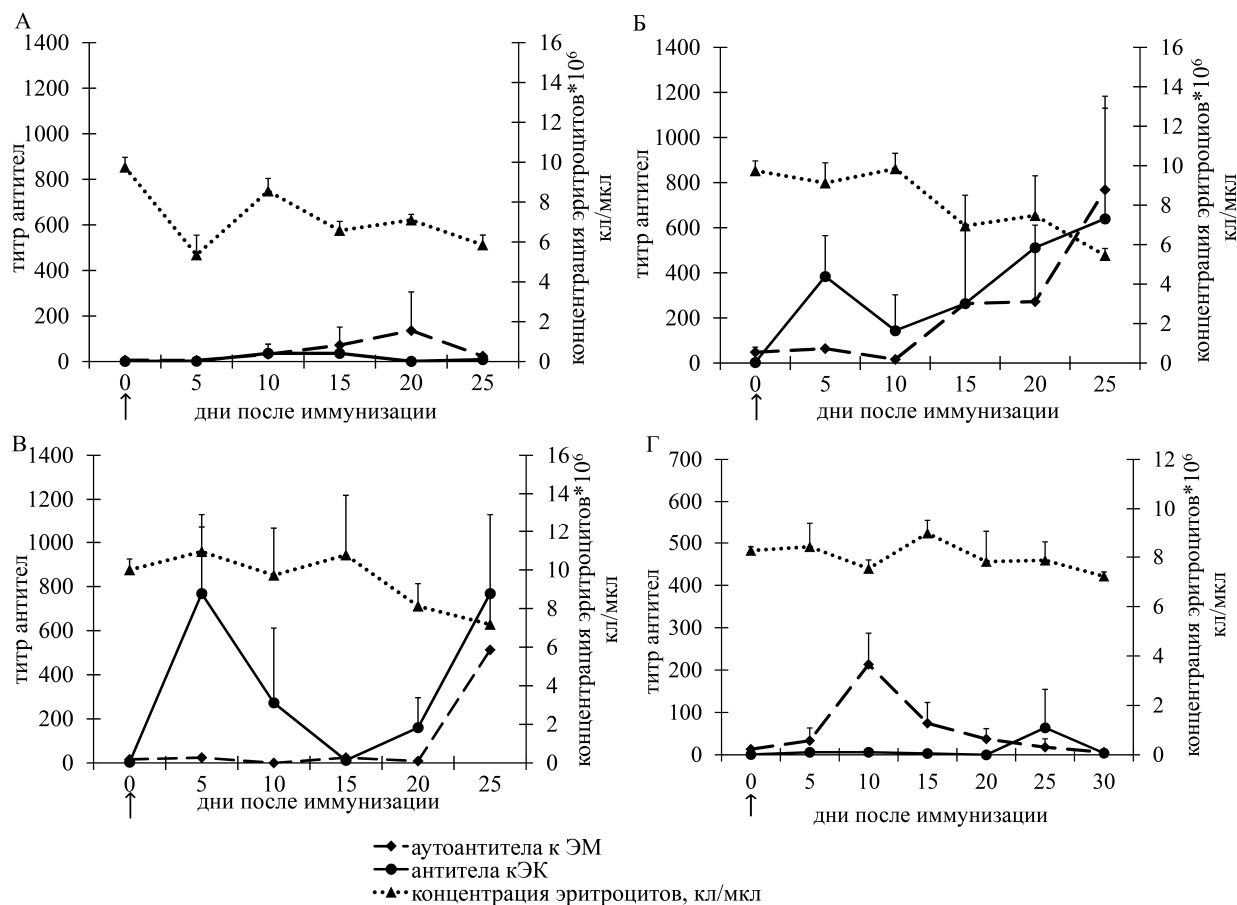


Рисунок 3 – Кинетика антител к ЭК, аутоантител к ЭМ, а также изменение концентрации эритроцитов в крови у мышей, иммунизированных аллогенными эритроцитами (А) – в дозе ($1,5 \times 10^5$ клеток), (Б) – в дозе ($2,8 \times 10^8$ клеток), (В) – в дозе ($5,7 \times 10^8$ клеток), (Г) аутологичными эритроцитами (доза 8×10^8 клеток). Каждая точка представлена средним от 5 животных $\pm$ SD. Стрелкой показан момент введения аутологичных и аллогенных эритроцитов

Иммунизация мышей аллогенными эритроцитами приводит к появлению аутоантител к ЭМ и развитию анемии в ходе иммунного ответа, а также к появлению антиидиотипических антител специфичных к ЭК (рисунок 3А, Б, В). Так как аутореактивные антиэритроцитарные лимфоциты связаны с лимфоцитами

специфичными к ЭК ИАИ взаимодействиями, то появление антител к ЭК в ответ на иммунизацию аутологичными и аллогенными эритроцитами ожидаемо, так как стимуляция аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов, может вызывать последующую активацию лимфоцитов специфичных к ЭК. Появление антител к ЭК служит еще одним фактом в пользу существования ИАИ взаимодействий между аутореактивными антиэритроцитарными лимфоцитами и лимфоцитами специфичными к ЭК [1, 2, 6].

Обращает на себя внимание различие в иммунном ответе и развитие анемии у мышей на 5 день, после иммунизации разными дозами аллогенных эритроцитов. Иммунизация мышей относительно низкой дозой ($1,5 \times 10^5$ клеток) аллогенных эритроцитов привела к развитию анемии уже на 5 день после начала иммунизации на фоне отсутствия изменений в уровне аутоантител к ЭМ (рисунок 3А). Тогда как при введении средней и относительно высокой дозы анемия у мышей на 5 день не развивается, при этом наблюдается повышение уровня антиидиотипических антител специфичных к ЭК (рисунок 3Б и В). При средней дозе ($2,8 \times 10^8$ клеток) с 10 дня, после введения аллогенных эритроцитов, наблюдается развитие анемии, которое ассоциировано с продукцией аутоантител к ЭМ (рисунок 3Б). При введении относительно высокой дозы ($5,7 \times 10^8$ клеток) аллогенных эритроцитов анемия и рост уровня аутоантител к ЭМ наблюдается с 15 дня после начала иммунизации (рисунок 3В) [9, 10].

Причиной развития анемии, вызванной иммунизацией относительно низкой дозой аллогенных эритроцитов, при отсутствии свободных аутоантител в крови может быть развитие иммунного ответа на эритроциты по клеточному типу. В пользу этого свидетельствуют исследования Р.А. Bretscher с соавт. (Bretscher, P.A. On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases / P.A. Bretscher // Scand J Immunol. 2014. Vol. 79. P. 361-376) в которых показано, что доза вводимого антигена-индуктора влияет на тип иммунного ответа. Низкие дозы антигена приводят к развитию иммунного ответа по клеточному типу, а высокие дозы приводят к развитию гуморального иммунного ответа (Bretscher, P.A. On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases / P.A. Bretscher // Scand J Immunol. 2014. Vol. 79. P. 361-376). Повышение уровня антиидиотипических антител

специфичных к ЭК на 5 день после введения средней и относительно высокой дозы аллогенных эритроцитов приводит к тому, что у мышей не наблюдается развития анемии на 5 день, по сравнению с мышами, которым была введена относительно низкая доза аллогенных эритроцитов. Данный факт указывает на то, что антиидиотипические антитела дозозависимо блокируют развитие аутоиммунного ответа на ЭМ при иммунизации их аллогенными эритроцитами. При введении средней и относительно высокой дозы аллогенных эритроцитов, с 10 по 25 день иммунного ответа, развитие анемии ассоциировано с ростом аутоантител к ЭМ, т.е. развитием гуморального иммунного ответа. Особенностью кинетики иммунного ответа при иммунизации аллогенными эритроцитами, в отличие от иммунизации ЭК является то, что на позднем этапе развития иммунного ответа наблюдается отсутствие реципрокности и прогрессивный совместный рост продукции аутоантител к ЭМ и антител к эритроцитам крысы.

В отличие от гетерологичных эритроцитов (ЭК), аллогенные эритроциты в относительно низкой дозе способны индуцировать клеточный тип реакции, а не гуморальный. Аллогенные эритроциты отличаются от гетерологичных эритроцитов (ЭК) соотношением на их поверхности аутологичных и чужеродных эпитопов. Аллогенные эритроциты несут меньше, чем гетерологичные эритроциты (ЭК), чужеродных эпитопов. Поэтому при введении относительно низкой дозы аллогенных эритроцитов доза чужеродного антигена является очень низкой, а наличие достаточного количества аутологичных эпитопов повышает дозу аутоантигена в организме, возможно эти обстоятельства индуцируют клеточный иммунный ответ на малые дозы аллогенных эритроцитов. Более высокие дозы аллогенных эритроцитов увеличивают вклад чужеродного антигена в иммунный ответ, что в свою очередь индуцирует образование антиидиотипических антител (специфичных к ЭК), которые являются антиидиотипическими антителами по отношению к аутоантителам к ЭМ. Увеличение продукции антиидиотипических антител, как фактора негативной регуляции идиотипических аутореактивных лимфоцитов приводит к снижению гемолиза, вызванного клеточной реакцией. В последующий период наблюдения развитие анемии в ходе иммунного ответа ассоциировано с продукцией аутоантител к ЭМ. Что не противоречит фактам, полученными P.A. Bretscher (Bretscher, P.A. On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases / P.A. Bretscher // Scand J

Immunol. 2014. Vol. 79. P. 361-376), о зависимости перехода от Th1 к Th2 фенотипу в ходе иммунного ответа, от концентрации антигена.

Компьютерные исследования кинетики иммунного ответа, вызываемого введением ауто- и аллоантигенов

Введение аутоантигена имитировали однократной подачей сигнала интенсивностью 3 с.у., k_{ag} 0,5 в некоторый момент времени на аутореактивный клон 2 (рисунок 4А), введение аллоантигена имитировали однократной подачей сигнала интенсивностью 5 с.у., k_{ag} 0,5 на клон 5 (рисунок 4Б)

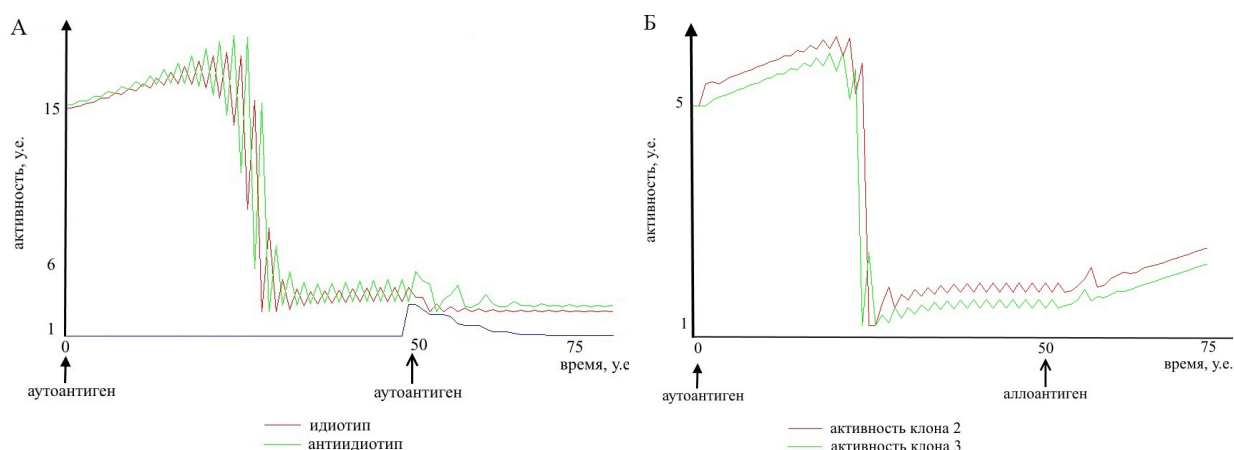


Рисунок 4 – Теоретическая кинетика уровня активности антиидиотипических и идиотипических клонов лимфоцитов в ответ на однократную стимуляцию клона 2 (А) и клона 5 (Б)

Однократная подача сигнала на аутореактивный клон 2 интенсивностью 3 с.у., k_{ag} 0,5 приводит к незначительному повышению активности идиотипических и антиидиотипических клонов. Результаты компьютерного исследования, имитирующие введение аутоантигена-индуктора, однократной подачей сигнала на аутореактивный клон 2, показали хорошую сходимость с результатами, полученными в эксперименте (рисунок 3Г).

В компьютерных исследованиях введение аллоантигена имитировали подачей стимулирующего сигнала на разные клоны моделируемого фрагмента иммунной сети за исключением клона, связанного с аутореактивным клоном, так как этот клон в реальной системе соответствовал лимфоцитам специфичным к ЭК. Сходства теоретической и экспериментальной кинетики иммунного ответа, вызванного введением аллоантигена, удалось добиться подачей сигнала на клон (клон 5) максимально удаленный от аутореактивного клона в исследуемом фрагменте иммунной сети. Это не противоречит

классическим представлениям об идиотипических взаимодействиях лимфоцитов в ходе иммунного ответа. За счет разветвления сети, идиотипы 1 и 3 клонов будут отличаться друг от друга. Как следствие, чем больше сходство антигена и аутоантигена, тем дальше распространяется сигнал в иммунной сети, для отбора рецептора с большим сродством. Этим же объясняется феномен созревания аффинности антител в ходе иммунного ответа [10, 11].

Результаты компьютерных исследований показали, что активация клона (клона 5), максимально удаленного от аутореактивного клона (клона 2) в исследуемом фрагменте иммунной сети приводит к активации всего исследуемого фрагмента иммунной сети. При этом все клоны фрагмента иммунной сети демонстрируют прогрессивный, не завершающийся рост активности, что свидетельствует о срыве состояния толерантности. Этот факт может служить основанием для предположения о том, что возникновение системных хронических аутоиммунных процессов может быть следствием иммунного ответа на антигены, активирующие лимфоциты, специфичность которых сходна, но не идентична специфичности лимфоцитов, распознающих аутоантигены. Для проверки этого предположения необходимы дополнительные экспериментальные исследования.

Влияние дополнительной иммунизации мышей аллогенными эритроцитами на кинетику аутоиммунной реакции в модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, индуцированной введением эритроцитов крысы

Дополнительная иммунизация аллогенными эритроцитами экспериментальных животных на 10 день показала, что в отличие от контроля (животные без дополнительной иммунизации) у опытных животных развивается относительно быстрый, непродолжительный рост уровня аутоантител к ЭМ без развития анемии у животных. Тогда как у контрольных животных развивается анемия на фоне роста аутоантител к ЭМ. Этот факт может иметь важное клиническое значение для разработки и совершенствования методов иммунокоррекции при аутоиммунных патологиях [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты экспериментальных и теоретических исследований иммунного ответа у мышей, вызванного введением эритроцитов крысы в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей показали, что в основе феномена концентрационной зависимости последовательности продукции аутоантител к эритроцитам мыши (идиотипические антитела) и антител к эритроцитам

крысы (антиидиотипические антитела) в ходе иммунного ответа, лежат идиотип-антиидиотипические взаимодействия. У мышей, иммунизированных аутологичными эритроцитами, иммунный ответ не развивается. Введение мышам аллогенных эритроцитов привело к развитию у них аутоиммунной гемолитической анемии, что проявилось в снижении количества эритроцитов в крови (на 30-50%). Кроме того, введение аллогенных эритроцитов вызывает продукцию антиидиотипических антител специфичных к эритроцитам крысы.

Иммунизация мышей относительно малыми дозами аллогенных эритроцитов вызывает у них быструю аутоиммунную реакцию, протекающую по клеточному типу и сопровождающуюся развитием анемии. При увеличении дозы вводимых аллогенных эритроцитов уменьшается, или даже отсутствует развитие аутоиммунной реакции по клеточному типу, которая обратно зависит от роста в крови антиидиотипических по отношению к аутореактивным антител, специфичных к эритроцитам крысы, в ходе иммунного ответа.

Дополнительная иммунизация аллогенными эритроцитами значительно сокращает период развития транзиторной аутоиммунной реакции у мышей, вызванной введением эритроцитов крысы.

Полученные результаты служат доказательством того, что между аутореактивными клонами лимфоцитов специфичных к эритроцитам мыши и клонами лимфоцитов специфичных к эритроцитам крысы существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия. Клоны лимфоцитов к эритроцитам крысы, являясь антиидиотипическими по отношению к аутореактивным, являются фактором их специфической, идиотипической регуляции.

Сравнительный анализ результатов экспериментальных и теоретических исследований показал их хорошую сходимость, что служит обоснованием того, что в основе специфической регуляции аутоиммуности лежат идиотип-антиидиотипические взаимодействия антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты проведенных теоретических и экспериментальных исследований глубже раскрывают идиотипические механизмы иммунорегуляции и их ведущую роль в контроле аутоиммунности. Дальнейшие исследования должны быть направлены на определение управляющих параметров (условий) и их значений при которых возникают патологические состояния в системе идиотипической регуляции аутоиммунности, а на

основе результатов этих исследований возможно будет определить мишени для терапии патологических аутоиммунных состояний и проверить эффективность воздействия на них в экспериментальных исследованиях на животных.

ВЫВОДЫ

1 Кинетика антител и аутоантител в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной введением эритроцитов крысы, зависит от дозы антигена. При относительно низкой дозе аутоантитела к эритроцитам мыши (антиидиотипические) появляются раньше, чем антитела к эритроцитам крысы (идиотипические), тогда как при относительно высокой дозе происходит инверсия в последовательности появления максимумов исследуемых антител – антитела к эритроцитам крысы (идиотипические) появляются раньше, чем аутоантитела к эритроцитам мыши (антиидиотипические).

2. В компьютерных исследованиях математической модели иммунной сети, содержащей аутоклон, определены параметры (условия), при которых проявляется дозозависимый характер кинетики антител и аутоантител в ходе иммунного ответа. Результаты теоретических исследований показали хорошую сходимость с результатами экспериментальных исследований при имитации введения разных доз антигена. При низкой дозе вводимого чужеродного антигена иммунный ответ антиидиотипических клонов опережал ответ идиотипических. При высокой дозе вводимого чужеродного антигена ответ идиотипических клонов опережал ответ антиидиотипических клонов.

3. Введение аутологичных эритроцитов приводит к незначительному росту аутоантител, который не сопровождается развитием анемии. Иммунизация мышей аллогенными эритроцитами приводит не только к росту аутоантител в крови к эритроцитам мыши и развитию анемии в ходе иммунного ответа, но и к появлению антител специфичных к эритроцитам крысы.

4. Обнаружено, что относительно малые дозы аллогенных эритроцитов индуцируют быстрый клеточный иммунный ответ, сопровождающийся развитием анемии. Проявление феномена зависит от дозы аллогенных эритроцитов и обратно коррелирует с ростом уровня антиидиотипических антител (антител к эритроцитам крысы). Данный факт указывает на существование негативного контроля аутореактивных лимфоцитов антиидиотипическими антителами специфичными к эритроцитам крысы.

5. Иммунизация аллогенными эритроцитами в ходе иммунного ответа у мышей,

вызванной введением эритроцитов крысы, модулирует развитие аутоиммунной реакции, способствуя ее более быстрому завершению.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные новые знания о механизмах идиотипической регуляции аутоиммунитета могут быть рекомендованы для использования в научных исследованиях, направленных на разработку новых средств терапии и профилактики аутоиммунных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лекомцева, Н.Н. Экспериментальная модель аутоиммунной гемолитической анемии, вызванной введением аллогенных эритроцитов мыши / Н.Н. Лекомцева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Актуальные проблемы фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии: материалы VI конференции иммунологов Урала. – 2007. – С. 15-16.

2. Лекомцева, Н.Н. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между аутоантителами к эритроцитам крысы / Н.Н. Лекомцева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, А.Е. Шмыков // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2(11), № 2-3. – С. 234-235.

3. Абишева, Н.Н. Влияние дозы вводимого антигена, индуцирующего аутоиммунную гемолитическую анемию у мышей, на кинетику аутоантител и антител к чужеродному антигену / Н.Н. Абишева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // XXI Съезд Физиологического общества имени И.П. Павлова. Тезисы докладов. – 2010. – С. 4-5.

4. Абишева, Н.Н. Исследование механизмов идиотипической регуляции иммунного ответа на экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей / Н.Н. Абишева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, В.В. Иванов // Иммунология. – 2010. – Т. 31, № 5. – С. 235-238.

5. Абишева, Н.Н. Особенности кинетики образования идиотипических и антиидиотипических антител в модели экспериментальной аутоиммунной гемолитической анемии у мышей при разных дозах вводимого антигена / Н.Н. Абишева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Дни иммунологии в Сибири: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2010. – С. 7-8.

6. Абишева, Н.Н. Идиотипические механизмы регуляции развития аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной иммунизацией

аллогенными эритроцитами / Н.Н. Абишева, И.В. Меньшиков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. - № 2/1. – С. 14.

7. Абишева, Н.Н. Влияние введения аутологичных эритроцитов на аутоиммунную гемолитическую анемию у мышей / Н.Н. Абишева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 85.

8. Menshikov, I. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov, N. Abisheva, T. Khramova, E. Stolyarova, K. Fomina // Journal of Theoretical Biology. – 2015. - Vol. 375. – P. 32-39. DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.10.003.

9. Абишева, Н.Н. Механизмы идиотипической регуляции аутоиммунной реакции, вызванной иммунизацией аллоантигеном. Теоретические и экспериментальные исследования / Н.Н. Абишева, И.В. Меньшиков // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 143-144.

10. Абишева, Н.Н. Компьютерное моделирование экспериментальных аутоиммунных реакций как способ выяснения механизмов идиотипической регуляции и активации аутореактивных лимфоцитов / Н.Н. Абишева, И.А Чалый, М.Л. Фролов // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № S. – С. 10.

11. Абишева, Н.Н. Экспериментальное и теоретическое исследование механизмов идиотипической регуляции аутоиммунной реакции, индуцированной аллоантигеном / Н.Н. Абишева, И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, И.А. Чалый // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11(20), № 2. – С. 234-235.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

ИАИ – идиотип-антиидиотип

ЭК – эритроциты крысы

ЭМ – эритроциты мыши

ЗФР – забуференный физиологический раствор

SD – стандартное отклонение

Абишева Надежда Николаевна

**ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
АУТОРЕАКТИВНОСТИ. ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
МОДЕЛИ АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У
МЫШЕЙ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Челябинск – 2020