

На правах рукописи

Иванов Павел Владимирович

**ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
АУТОРЕАКТИВНОСТИ К БЕЛКАМ МИЕЛИНА В МОДЕЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО
ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА КРЫС**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Челябинск– 2022

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:

Гущина Светлана Валентиновна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», кафедра цитологии, гистологии и эмбриологии с курсами медицинской биологии и молекулярной биологии клетки, профессор кафедры

Четина Елена Васильевна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», 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, Москва

Защита диссертации состоится «___»_____2022 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 (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64) и на сайте www.chelsma.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Юлия Сергеевна Шишкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Рассеянный склероз является тяжелым нейродегенеративным заболеванием, которое может приводить к инвалидизации молодых людей в возрасте 20-40 лет. В основе рассеянного склероза лежит аутоиммунная реакция, разрушающая миелиновые оболочки нервных волокон головного и спинного мозга (Pender M.P. Immunology of multiple sclerosis / M.P. Pender, J.M. Greer // Curr. Allergy Asthma Rep. 2007. Vol. 7. P. 285–92). Несмотря на большое количество проведенных исследований, причины развития аутоиммунной реакции и механизмы ее регуляции, во многом, не выяснены. Следствием этого является отсутствие эффективных средств терапии.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит крыс является воспалительным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы аутоиммунной природы, которое обнаруживает множество сходных признаков с рассеянным склерозом человека, и поэтому является признанной экспериментальной моделью этого заболевания (Glatigny S. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS) / Glatigny S, Bettelli E. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2018. Vol. 8(11): a028977). Показано, что аутоиммунное воспаление и повреждение миелиновых оболочек при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите вызвано активированными периферическими Т-лимфоцитами, проникающими в центральную нервную систему через гематоэнцефалический барьер (Cavallo S. Immune-mediated genesis of multiple sclerosis / Cavallo S. // J.Transl. Autoimmun. 2020. Vol.3. P.1000-39). Чаще всего в качестве причины активации аутореактивных лимфоцитов рассматривают наличие иммунного перекреста между аутологичными и гетерологичными антигенами. В частности, показано, что активацию периферических аутореактивных Т-клеток, специфичных к белкам миелина, могут вызывать белки микроорганизмов, структурно схожие с собственными компонентами миелина (Sospedra M. Molecular mimicry in multiple sclerosis / Sospedra M, Martin R. // Autoimmunity. 2006. Vol. 39(1). P. 3-8). Однако, как было показано, кроссреактивности между своими и чужими белками миелина недостаточно для запуска агрессивного аутоиммунного процесса. (Christen U. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry / U. Christen, M. von Herrath // Mol Immunol. 2004. Vol 40. P. 1113-1120).

На сегодняшний день факт существования аутореактивных лимфоцитов и аутоантител в организме в норме является общепризнанным. Исследования подтверждают, что в рамках физиологической нормы аутореактивные клоны находятся под негативным регуляторным контролем (Adib M. IgG-autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM / Adib M., Ragimbeau J., Avrameas S. et al. // J.Immunol. 1990. Vol. 145. P. 3807–3813), а его нарушение может быть причиной активации аутореактивных лимфоцитов и приводить к развитию аутоиммунных патологий (Hurez V. Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG-autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease., / Hurez V., Kazatchkine M.D., Vassilev, T. // Blood. 1997. Vol. 15. P. 4004–4013). Поэтому исследования, направленные на раскрытие механизмов регуляторного контроля аутореактивности, находятся сегодня в фокусе иммунологии. Одним из таких механизмов регуляции могут быть идиотип-антиидиотипические взаимодействия – специфические взаимодействия антигенраспознающих рецепторов лимфоцитов и антител на основе взаимного узнавания идиотипов (Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system / N. Jerne // Ann. Immunol. 1974. Vol. 125. P.373-389). Важное место в идиотипической регуляции аутореактивности может принадлежать антииммуноглобулиновым антителам, направленным против F(ab)₂, Fab, Fc фрагментов IgG, а также разных идиотипов антител. Кроме того, было показано, что антитела против Fab фрагментов, полученные от людей с ревматоидным артритом и без него, проявляли анти-Fc реактивность (ревматоидный фактор), демонстрируя существование антител с двойной специфичностью (Hunt Gerardo S. Human IgG anti-F(ab')₂ antibodies possess rheumatoid factor activity / S. Hunt Gerardo, J.E. Persselin, R.H. Stevens // Clin. Exp. Immunol. 1990. Vol. 81, No 2. P. 293-300.). Также показана роль ревматоидного фактора в регуляции иммунного ответа к коллагену и формированию резистентности к экспериментально вызванному артриту крыс (Beduleva L. Role of idiotypic-anti-idiotypic interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats / L. Beduleva, I. Menshikov // Immunobiology. 2010. Vol. 215(12). P. 963-70). Известно, что антииммуноглобулиновые антитела могут являться фактором регуляции антител к основному белку миелина в экспериментальных моделях энцефаломиелита кроликов (Lopez P.H. Time course of IgM antibodies which block anti-myelin basic protein IgG antibodies associated with development of experimental autoimmune encephalomyelitis in

rabbits / Lopez PH, Degano AL, Monferran CG et al. // J. Neuroimmunol. 2001. Vol. 119 (1). P. 30 - 6) и крыс (Vilcaes A.A. Antibodies which block anti-myelin basic protein antibodies associated with development of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats / AA Vilcaes AL Degano, PH López et al. // J Neuroimmunol. 2005. Vol. 164(1-2). P. 31-6).
Случаи ремиссии заболевания при рассеянном склерозе также ассоциированы с присутствием «блокирующих» антител (Warren, K.G. A myelin basic protein antibody cascade in purified IgG from cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients / K.G. Warren, I Catz. // J. Neurol. Sci. 1990. Vol. 96. P. 19–27). В то же время специфичность и механизм действия антииммуноглобулиновых антител при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите остаются невыясненными.

Антииммуноглобулиновые антитела, обладающие свойствами ревматоидного фактора, как было показано, также могут связываться с F(ab)₂ и Fab фрагментами IgG, из чего следует, что данные антитела могут являться антиидиотипическими по отношению к аутореактивным и могут быть вовлечены в механизмы идиотипической регуляции аутореактивных лимфоцитов.

Приведенные выше факты указывают на то, что идиотипические взаимодействия могут играть важную роль не только в индукции аутоиммунных реакций, но и в специфической регуляции аутоиммунной в норме. Полученные знания об этих механизмах могут открыть новые мишени для разработки специфических средств терапии аутоиммунных нейродегенеративных заболеваний. Поэтому исследования, направленные на выяснение специфических механизмов регуляции аутоиммунной, представляется актуальным.

Цель работы

Исследовать идиотипические механизмы регуляции аутореактивности к белкам миелина в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс.

Задачи исследования

1. Изучить кинетику антител к основному белку миелина морской свинки, антител к основному белку миелина быка, аутоантител к основному белку миелина крысы в плазме крови крыс, иммунизированных гетерологичными основным белком миелина морской свинки и основным белком миелина быка в ходе иммунного ответа.

2. Изучить кинетику регуляторного ревматоидного фактора в плазме крови крыс, иммунизированных гетерологичными основным белком миелина морской свинки и

основным белком миелина быка в ходе иммунного ответа.

3. Провести сравнительный анализ уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс с симптомами и без симптомов энцефаломиелита после иммунизации гетерологичными основными белками миелина.

4. Проверить гипотезу о том, что антитела к основному белку миелина морской свинки, аутоантитела к основному белку миелина крысы и регуляторный ревматоидный фактор могут взаимодействовать между собой как идиотип-антиидиотип.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования была теория иммунной сети Нильса Ерне. Исследование выполнено на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс – заболевания, сходного с рассеянным склерозом человека, и включало в себя анализ кинетики продукции антител в ходе иммунного ответа. Иммунизацию проводили двумя разными антигенами-индукторами аутоиммунной реакции – основным белком миелина морской свинки и основным белком миелина быка. Крысам Wistar вводили эмульсию антигена с адьювантом однократно подкожно в заднюю часть спины и основание хвоста. Кровь забирали методом кардиальной пункции под легкой эфирной анестезией один раз в неделю, на протяжении 10 недель. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Плазму крови замораживали и хранили до использования в анализах. Исследование выполнено с помощью иммунологических, биохимических, иммунохимических и статистических методов.

Степень достоверности, апробация результатов, личный вклад автора

Результаты исследований получены на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс, являющегося моделью рассеянного склероза человека, с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Исследования выполнены на группах животных достаточного количества, повторены в нескольких сериях экспериментов. Степень достоверности результатов исследования выявляли с помощью стандартных статистических методов.

Важнейшие пункты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на VIII конференции иммунологов Урала «Актуальные проблемы фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии» (Сыктывкар, 2010), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), 17-й Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука

XXI века» (Пущино, 2013), XXI, XXII съездах Физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга, 2010; Волгоград, 2013), XIV конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2017), 14th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus and 6th International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (LUPUS & CORA 2021).

Формулирование основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, проводились совместно с научным руководителем. Цель и задачи, дизайн исследования разработаны совместно с научным руководителем. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен лично диссертантом. Получение и интерпретация экспериментальных данных осуществлялись соискателем лично. Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, съездах и форумах осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Индукция аутоиммунных реакций в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс происходит опосредованно, через идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

2. Высокий уровень регуляторного ревматоидного фактора в плазме крови крыс в период индукции иммунного ответа ассоциирован с отсутствием клинических проявлений энцефаломиелита у животных, иммунизированных основным белком миелина морской свинки. Регуляторный ревматоидный фактор является важным звеном в механизмах идиотипической регуляции аутоиммунности в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс.

Научная новизна

Впервые на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс показано, что антитела к гетерологичному основному белку миелина и антитела к аутологичному белку миелина крыс являются разными антителами и, следовательно, продуцируются разными клонами лимфоцитов. Индукция аутоиммунной реакции при иммунизации гетерологичным основным белком миелина осуществляется посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами, специфичными к

аутологичному и гетерологичному основному белку миелина, и регуляторным ревматоидным фактором. Выявлена зависимость между высоким уровнем регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс на 7 день после иммунизации и отсутствием клинических проявлений энцефаломиелита у крыс, иммунизированных основным белком миелина морской свинки. Показано, что между антителами к гетерологичному основному белку миелина морской свинки и регуляторным ревматоидным фактором, а также между антителами к аутологичному основному белку миелина крысы и регуляторным ревматоидным фактором существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия. Обнаружено, что основной белок миелина морской свинки взаимодействует с неоантигенными детерминантами Fc фрагментов IgG крысы, распознаваемыми регуляторным ревматоидным фактором. Впервые на экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита у крыс показано, что идиотип-антиидиотипические взаимодействия являются важным механизмом регуляции аутоиммунитета.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования значительно расширяют знания о специфических механизмах иммунорегуляции аутореактивных лимфоцитов в норме и при патологии, являющейся причиной развития рассеянного склероза у человека. Развивают представления о механизмах индукции аутоиммунных реакций, в частности, роли идиотип-антиидиотипических взаимодействий в индукции аутоиммунной реакции в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита крыс. Результаты исследования углубляют знания о регуляции аутореактивности с участием регуляторного ревматоидного фактора, являющегося антиидиотипическими антителами к аутореактивным лимфоцитам.

Полученные знания раскрывают детали регуляции аутоиммунных реакций с участием антиидиотипических антител с дополнительной специфичностью регуляторного ревматоидного фактора и тем самым открывают перспективы поиска и разработки новых лекарственных средств для эффективной терапии рассеянного склероза. Обнаруженный фактор специфической регуляции – регуляторный ревматоидный фактор, уровень которого ассоциирован с отсутствием клинических проявлений аутоиммунного энцефаломиелита у экспериментальных животных, может иметь клинико-диагностическое значение и использоваться в клинической практике

лечения рассеянного склероза.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования используются в образовательных программах института естественных наук ФГБОУ ВО «Удмуртский Государственный Университет», в теоретических и прикладных дисциплинах «Экспериментальная иммунология», «Клиническая иммунология», «Экспериментальные модели иммунопатологий», «Иммунобиотехнология», в научно-исследовательских работах научной лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский Государственный Университет», включены в список приоритетных направлений научно-исследовательских работ кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский Государственный Университет» по поиску эффективного средства предотвращения и терапии аутоиммунных заболеваний.

Конкурсная поддержка исследования

Часть исследования выполнена в качестве научного проекта, выполняемого коллективами научных лабораторий образовательных организаций высшего образования, подведомственных Минобрнауки России, в рамках государственного задания в сфере науки – 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

Соискатель имеет 11 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 11 работ общим объемом 3,5 печатных листа : 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 4 работы в международных базах Scopus, Pubmed, 4 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 107 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания организации, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов. Список литературы включает 175 источников, среди которых 9 отечественных и 166 иностранных. Работа

иллюстрирована 11 рисунками, 2 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелимита (ЭАЭ) крыс в двух вариантах. В первом животных иммунизировали основным белком миелина (ОБМ) морской свинки, во втором использовали ОБМ быка.

В исследовании использовали разнополых крыс Wistar, массой 150-180 г., содержащихся на стандартном рационе и при стандартных условиях. Эксперименты были выполнены согласно Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Крыс иммунизировали однократно подкожно в заднюю часть спины и основание хвоста ОБМ морской свинки (Sigma) в дозе 25 мкг в ПАФ или ОБМ быка (Sigma) в дозе 200 мкг в НАФ соответственно, в объеме 50-100 мкл под легкой эфирной анестезией (Mannie M. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Rat / M. Mannie, R.H. Swanborg, J.A. Stepaniak // Curr. Protoc. Immunol. 2009. Chapter 15. Unit 15.2). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в том же объеме. Животные в ходе эксперимента на основании наличия или отсутствия клинических проявлений ЭАЭ были поделены на две группы: с симптомами ЭАЭ и устойчивые к развитию заболевания. Диагноз ЭАЭ ставился на основании наличия или отсутствия клинических проявлений согласно классификации (Lee M.J. Bee Venom Acupuncture Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Upregulating Regulatory T Cells and Suppressing Th1 and Th17 Responses / Lee M. J., J. Choi, G. Lee et al. // Mol. Neurobiol. 2016. V. 53(3). P. 1419-1445). После иммунизации у каждого животного еженедельно, в течение 10 недель, забирали кровь путем кардиальной пункции под легкой эфирной анестезией, с антикоагулянтом цитратом натрия. Плазму крови замораживали и хранили при -20° С до использования.

В плазме крови методом ИФА определяли уровни антител к ОБМ морской свинки или ОБМ быка, уровни аутоантител к ОБМ крысы. ОБМ крысы получали из головного мозга крыс по методике (Maatta J.A. Detection of myelin basic protein isoforms by organic concentration / J.A. Maatta, E.T. Coffey, J.A. Hermonen et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 238. P. 498–502). Уровень регуляторного ревматоидного фактора (регрФ) определяли в реакции пассивной гемагглютинации фиксированных

танизированных эритроцитов человека, нагруженных IgG крыс.

Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к ОБМ морской свинки и регРФ, а также между антителами к ОБМ крысы и регРФ определяли методом конкурентного ИФА, по способности плазмы, содержащей регРФ, конкурировать с антигенами (ОБМ морской свинки, ОБМ крысы) за связывание с соответствующими антителами, содержащимися в плазме иммунизированных животных. ОБМ морской свинки или ОБМ крысы сорбировали в планшетах. В лунки планшетов добавляли в разных разведениях плазму, содержащую антитела к ОБМ морской свинки или крысы, предварительно проинкубированную с плазмой, содержащей регРФ. В контроле вместо регРФ-содержащей плазмы вносили плазму, не содержащую регРФ. Для определения связавшихся антител использовали меченные пероксидазой хрена антитела козы к иммуноглобулинам крысы. Количественная оценка производилась по оптической плотности.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 5.0 для Windows. Результаты выражали как $\text{среднее} \pm \text{SD}$, или $\text{среднее} \pm \text{SE}$, где SD – выборочное стандартное отклонение, SE – стандартная ошибка среднего. Для оценки достоверности различий был использован критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс, иммунизированных ОБМ морской свинки в ПАФ, клинические признаки энцефаломиелита наблюдались у 35% животных. Симптомы проявлялись на 10-12 день после иммунизации в виде частичной или полной атонии хвоста и прогрессировали до парезов и параличей отдельных конечностей. У большинства животных наблюдалась полная спонтанная ремиссия на 6-8 день после возникновения клинических признаков заболевания [2]. В группе животных, иммунизированных ОБМ быка в НАФ, клинических признаков энцефаломиелита не выявлено.

Кинетика антител к ОБМ морской свинки, антител к ОБМ быка, аутоантител к ОБМ крысы в ходе иммунного ответа на гетерологичный основной белок миелина

В ответ на иммунизацию ОБМ морской свинки и ОБМ быка у всех животных, как с клиническими проявлениями, так и без них, наблюдался рост титра антител к введенному антигену, ОБМ морской свинки или ОБМ быка, а также появление аутоантител к ОБМ крысы, что свидетельствует о развитии аутоиммунной реакции у иммунизированных животных [1, 3].

Максимальные значения продукции антител к гетерологичному ОБМ и аутоантител против ОБМ крысы наблюдаются в разное время после иммунизации – 49 и 35 дни (рисунок 1А), 21 и 35 дни (рисунок 1Б, 1В) соответственно.

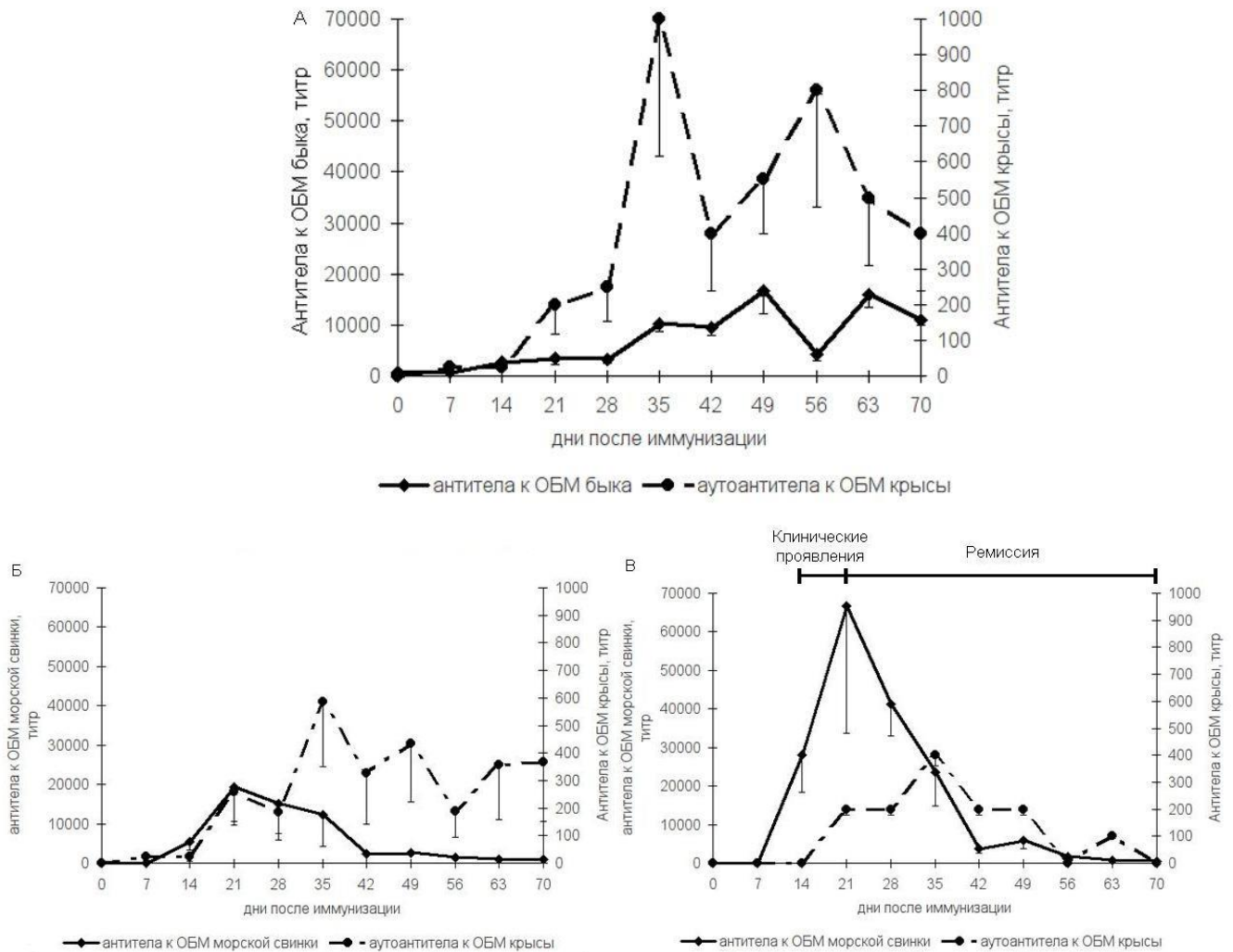


Рисунок 1 - Титр антител к ОБМ быка и аутоантител к ОБМ крысы ($M \pm SE$, $n=10$) в ходе иммунного ответа у животных, иммунизированных ОБМ быка (А). Титр антител к ОБМ морской свинки и аутоантител к ОБМ крысы у животных *без клинических проявлений* (Б) ($M \pm SE$, $n=13$), и у животных с *клиническими проявлениями* энцефаломиелимита (В) ($M \pm SE$, $n=7$), иммунизированных ОБМ морской свинки.

Животных, иммунизированных ОБМ морской свинки, разделили на две группы – крысы без клинических признаков энцефаломиелимита (рисунок 1Б) и животные, у которых развился энцефаломиелит (рисунок 1В). В обеих группах профили иммунного ответа качественно совпадают (максимумы продукции антител и аутоантител). Однако, они существенно отличаются по уровню антител к ОБМ морской свинки, у крыс без клинических проявлений гуморальный иммунный ответ к ОБМ морской свинки

выражен значительно слабее по сравнению с крысами с симптомами энцефаломиелита, средние титры антител отличаются в 2 - 5 раз – 1:5517 и 1:28133 на 14 день, 1:19277 и 1:66720 на 21 день, 1:15139 и 1:41280 на 28 день, 1:12169 и 1:23483 на 35 день. У всех экспериментальных животных рост титра аутоантител к основному белку миелина крысы отмечается только на 21 день и достигает максимального значения на 35 день после иммунизации.

Индукция аутоиммунной реакции по механизму иммунного перекреста предполагает, что одни и те же антитела взаимодействуют с разными антигенами. В таком случае мы бы получили качественно одинаковые кинетические кривые с совпадающими максимумами и минимумами продукции антител к ОБМ в ходе иммунного ответа. Однако, сравнительный анализ кинетики антител к гетерологичному основному белку миелина и аутоантител в наших исследованиях показал, что кинетики качественно различаются [2, 3]. Этот факт указывает на то, что аутоантитела к ОБМ крысы и антитела к гетерологичному ОБМ являются разными антителами и, следовательно, продуцируются разным клоном лимфоцитов. Это служит основанием для предположения о том, что индукция аутореактивных клонов лимфоцитов может быть опосредована идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями.

Кинетика регРФ у крыс, иммунизированных ОБМ быка и ОБМ морской свинки

У всех животных исходно наблюдался относительно низкий уровень регРФ, титры не превышали среднего значение 1:200. В ответ на иммунизацию гетерологичным ОБМ происходило изменение уровней регуляторного ревматоидного фактора (рисунок 2) [8]. У животных без симптомов энцефаломиелита (рисунок 2А, 2Б) регРФ в средних титрах 1:1028 и 1:1918 соответственно определяется уже на 7 день после иммунизации - раньше, чем антитела к антигенам-индукторам аутоиммунной реакции. В группе животных, иммунизированных ОБМ быка, в которой не выявлено ни одного случая проявления клинических признаков заболевания, титр регРФ достигает максимального среднего значения 1:2370 на 14 день после иммунизации.

У животных с клиническими проявлениями энцефаломиелита на 7 день после иммунизации титр регуляторного ревматоидного фактора резко снижался, по средним данным с 1:200 до 1:70, а его повышение в ходе иммунного ответа отмечалось только на 14 день. Первый максимум продукции регРФ достигался на 21 день после

иммунизации и совпадал с исчезновением клинических проявлений энцефаломиелита (рисунок 2Б) [9].

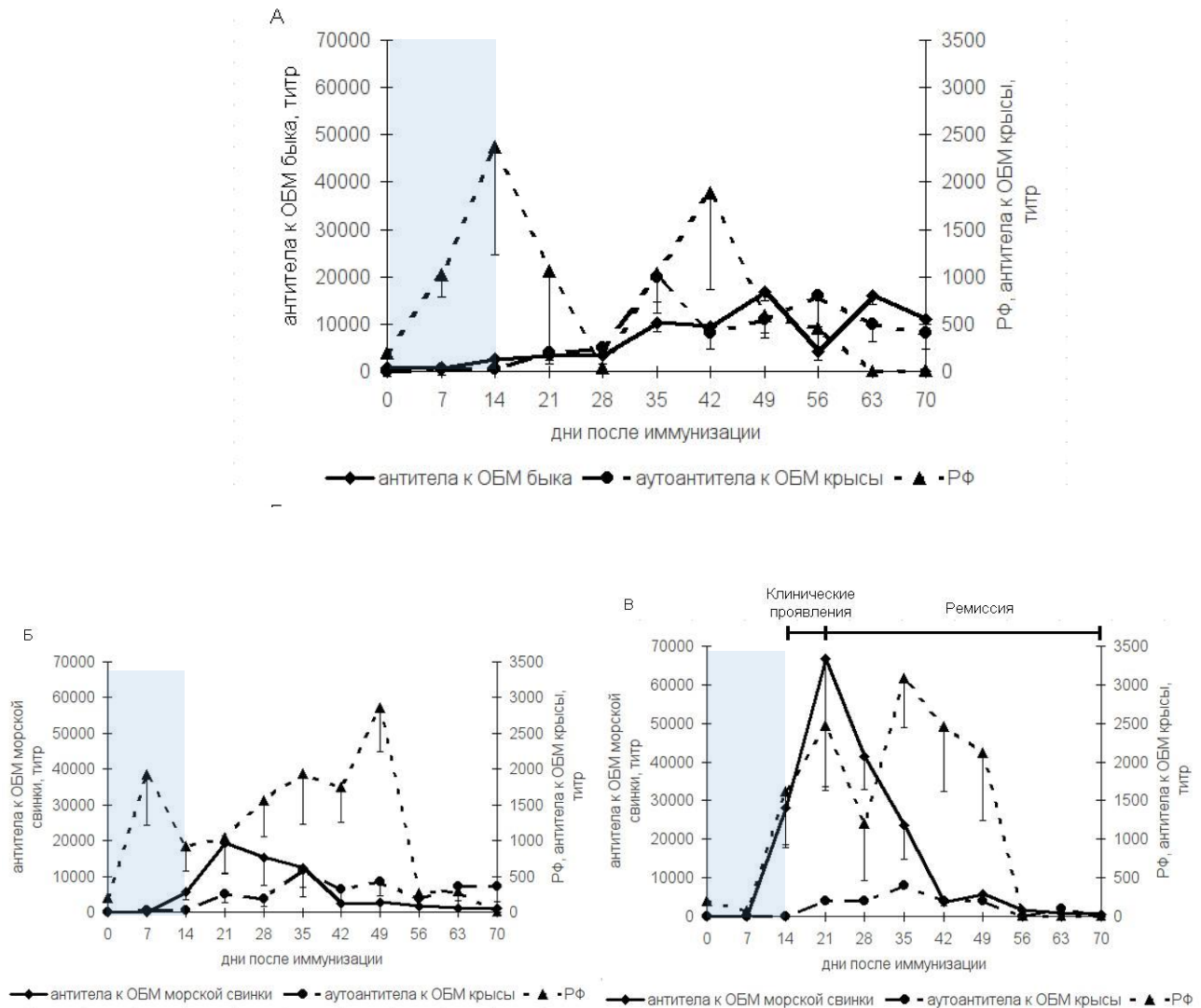


Рисунок 2 – Титр антител к ОБМ быка, ОБМ крысы, регРФ у крыс, иммунизированных ОБМ быка (А) $M \pm SE$, $n=10$. Кинетика антител к ОБМ морской свинки, ОБМ крысы, регРФ у животных без клинических признаков (Б) $M \pm SE$, $n=13$, и с клиническими проявлениями энцефаломиелита (В) $M \pm SE$, $n=7$, иммунизированных ОБМ морской свинки.

Сравнительный анализ уровней регРФ показал, что в период индукции иммунного ответа, на 7 день после иммунизации, развитие клинических признаков энцефаломиелита у крыс ассоциировано с низким уровнем регуляторного ревматоидного фактора в период, предшествующий появлению клинических признаков [10]. Иммунизированные ОБМ животные с клиническими признаками энцефаломиелита имели достоверно низкий уровень регРФ в крови на 7 день после

иммунизации в отличие от животных, у которых были клинические признаки (рисунок 3). Поэтому низкий уровень регРФ в крови на 7 день после иммунизации может рассматриваться как предиктор последующей манифестации ЭАЭ, тогда как выраженная продукция регРФ в ответ на иммунизацию ОБМ морской свинки может быть фактором, определяющим отсутствие клинических проявлений энцефаломиелита у крыс (рисунок 2А, 2Б) [5, 6].

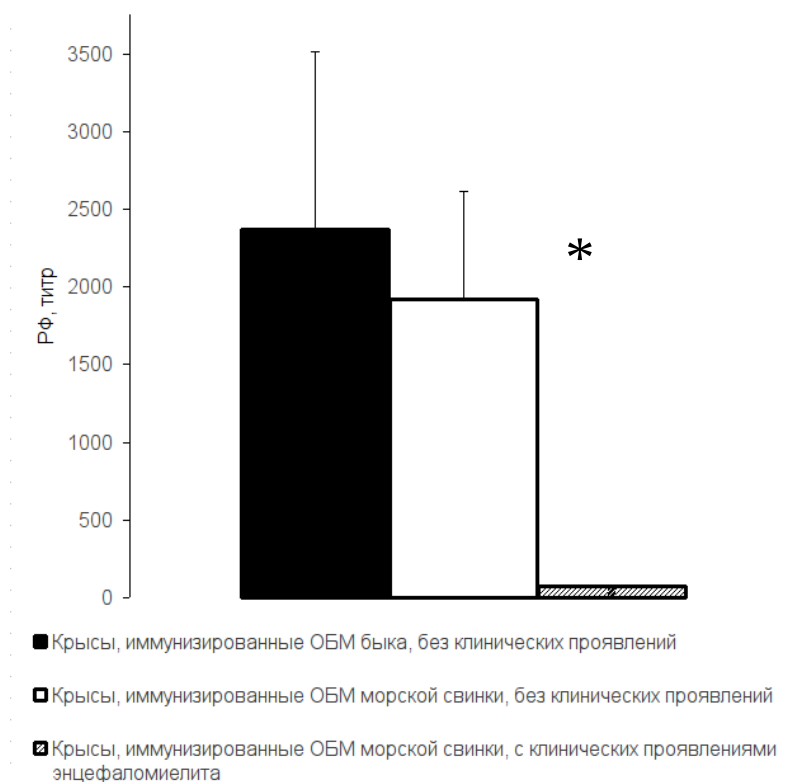


Рисунок 3 – Сравнительный анализ уровня регРФ у крыс на 7 день после иммунизации гетерологичным основным белком миелина у животных с клиническими проявлениями и без клинических проявлений энцефаломиелита. Результаты представлены как среднее значение $M \pm SE$. Иммунизированные ОБМ быка ($n=10$), ОБМ морской свинки для животных без симптомов ЭАЭ $n=13$, для животных с симптомами $n=7$. * $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между антителами к ОБМ морской свинки и регРФ, аутоантителами к ОБМ крысы и регРФ

О наличии идиотип антиидиотипических взаимодействий между антителами можно судить по их способности конкурировать за связывание с антигеном. На рисунке 4 представлены результаты конкурентного ИФА. При добавлении плазмы крови, содержащей регРФ, к плазме, содержащей антитела к ОБМ морской свинки (А) или ОБМ крысы (Б), взятой в различных разведениях, уменьшение оптической плотности

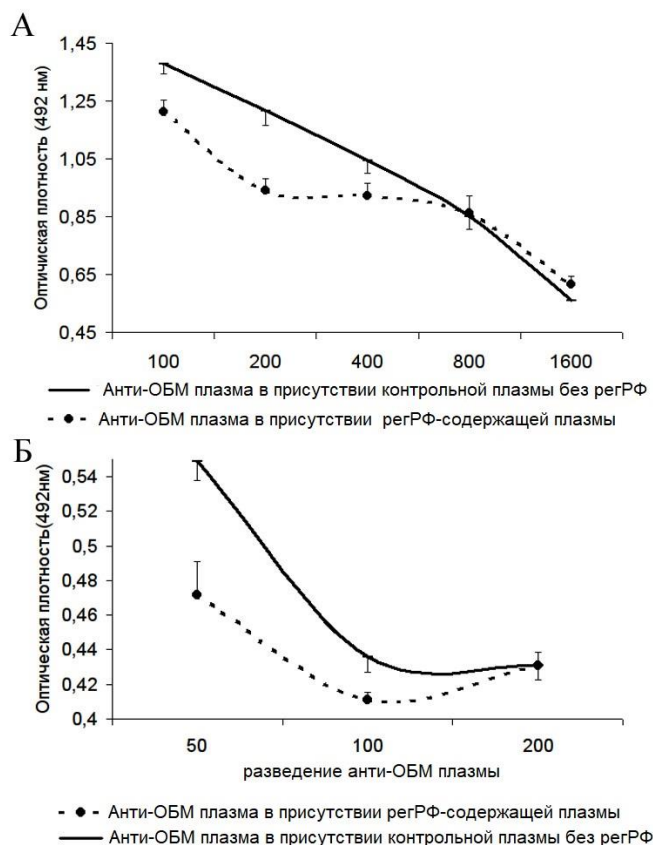


Рисунок 4 - **А.** Ингибирование связывания плазмы, содержащей антитела к ОБМ морской свинки с ОБМ морской свинки в присутствии плазмы, содержащей регуляторный ревматоидный фактор. **Б.** Ингибирование связывания плазмы, содержащей антитела к ОБМ крысы с ОБМ крысы в присутствии плазмы, содержащей регуляторный ревматоидный фактор. Результаты представлены средним значением $\pm$ SE.

реакции происходило при разведениях плазмы в 100, 200 и 400 раз для ОБМ морской свинки и в 50 и 100 раз для ОБМ крысы. В контроле к образцам добавляли плазму, не содержащую регРФ. Известно, что максимальная чувствительность к конкуренту проявляется, когда половина антигена связана с антителами (отношение комплекс антиген-антитело/общее количество антигена приближается к 0,5) и не происходит при избытке или недостатке антител. Поэтому мы наблюдаем больший эффект ингибирования в зоне 50% связывания антигена антителами - это разведение в 200 раз для плазмы содержащей антитела для ОБМ морской свинки и в 50 раз для плазмы с антителами к ОБМ крысы. Таким образом, регРФ специфически ингибирует реакцию связывания как ОБМ морской свинки с антителами к ОБМ морской свинки, так и ОБМ крысы с антителами к ОБМ крысы, из чего следует, что молекулы регРФ несут внутренний образ антигена и могут взаимодействовать как идиотип-антиидиотип с антителами,

специфичными к ОБМ морской свинки, а также с антителами, специфичными к ОБМ крысы [9, 10].

Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между регРФ и антителами к ОБМ морской свинки, а также между регРФ и антителами к ОБМ крысы позволяет предложить гипотетическую схему фрагмента иммунной сети, ответственного за индукцию и регуляцию аутоиммунной реакции в модели экспериментального энцефаломиелита крыс

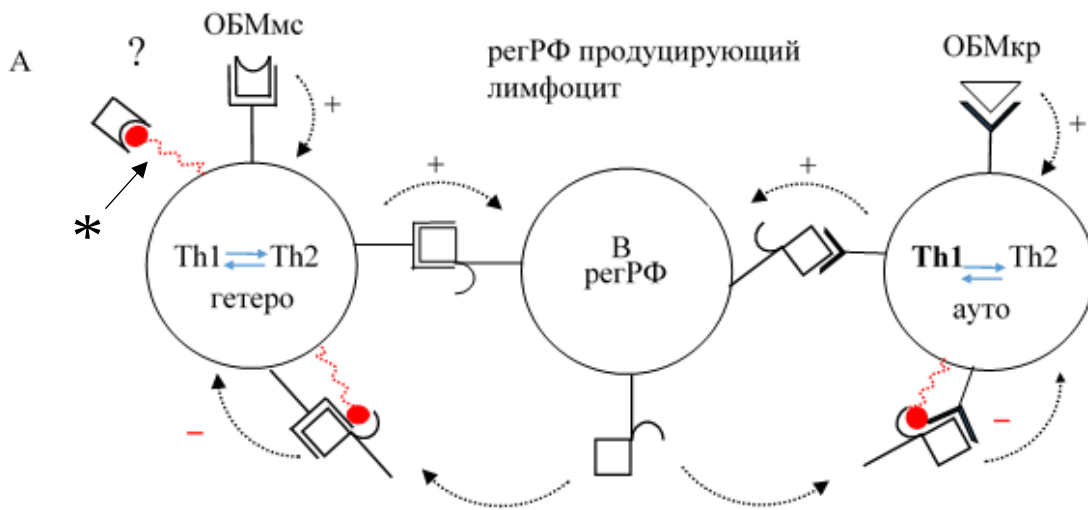


Рисунок 5 - Гипотетическая схема идиотип-антиидиотипических взаимодействий лимфоцитов, вовлеченных в иммунный ответ на иммунизацию крыс основным белком миелина морской свинки. Знаком * обозначена дополнительная специфичность, экспрессируемая на активированных лимфоцитах и узнаваемая регРФ.

Как показано на рисунке 5, регРФ являются антиидиотипическими антителами по отношению к лимфоцитам, распознающим ОБМ морской свинки, и к аутореактивным лимфоцитам, распознающим ОБМ крысы. Они также несут дополнительную специфичность, которая распознает эпитопы на Fc фрагментах IgG (поэтому называются регРФ) [4, 7]. Она же ассоциирована с выраженным супрессивным эффектом этих антител по отношению к активированным CD4⁺ лимфоцитам (Stolyarova, E. Mechanism by which Regulatory Rheumatoid Factor Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / E. Stolyarova, L. Beduleva, I. Menshikov, et al. // Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2018. Vol. 18. P. 596-601). По этой причине мы не наблюдаем развития клинических признаков у крыс, иммунизированных как ОБМ быка, так и ОБМ морской свинки. В том и другом случае отсутствие клинических признаков ассоциировано с высоким уровнем продукции регРФ у животных на 7 день

после иммунизации. У животных с клиническими признаками энцефаломиелита регРФ в крови практически отсутствует [10, 11]. Связь между клиническими проявлениями и уровнем регРФ в крови на 7 день после иммунизации ранее была показана в исследованиях на экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита крыс (Beduleva L. Role of idiotypic-anti-idiotypic interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats. /Beduleva L, Menshikov I.// Immunobiology. 2010. Vol. 215(12). P. 963-70). Это указывает на то, что в основе наблюдаемого феномена с участием регРФ могут лежать общие механизмы регуляции аутоиммунитета.

Нами не выявлено очевидной связи между продукцией аутоантител и клиническими проявлениями энцефаломиелита, что не является неожиданным, поскольку известно о преимущественно клеточном типе аутоиммунной реакции в данной модели (Batoulis, H. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances / Batoulis H, Recks MS, Addicks K. et al. // APMIS. 2011. Vol. 119, №12. P. 819-30.), и об отсутствии однозначной связи между уровнем аутоантител и клиническими проявлениями энцефаломиелита (Roth G.A. Experimental allergic encephalomyelitis: dissociation of immunochemical and clinicopathological responses in two strains of rats. / G.A Roth, K. Obata, // Neurochem. Int. 1991. Vol. 19. P. 213-320). В связи с чем, представляются интересными результаты группы исследователей, которые показали, что у мышей с дефицитом В-клеток экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит протекал в значительно более тяжелой форме. Мыши редко возвращались к норме в отсутствие В-клеток. Авторы предположили, что В-клетки могут играть роль в иммунной регуляции ЭАЭ посредством иммунного отклонения от Т-хелперов 1 типа к Т-хелперам 2 типа (Wolf S.D. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice / Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F. et al. // J. Exp. Med. 1996. Vol. 184(6). P. 2271-2278.). Эти данные согласуются с результатами наших исследований. Когда антитела к ОБМ морской свинки достигают максимума к 21 дню после иммунизации, клинические признаки у животных проходят. Высокий уровень продукции антител к ОБМ морской свинки (титр выше 1:60000) свидетельствует о сдвиге от клеточного типа реакции на гуморальный в ходе иммунного ответа у животных на 14-21 день. Это одновременно усиливает продукцию регРФ и значительно сильнее может подавлять аутореактивные Th1 клоны. В-клетки, продуцирующие антитела и аутоантитела, в этих условиях, в большей мере

играют роль факторов идиотипической регуляции иммунного ответа.

Нами обнаружено, что ОБМ морской свинки, также, как и регРФ способен вызывать агглютинацию фиксированных танизированных эритроцитов человека, нагруженных IgG крысы. Кроме того, Fc фрагменты IgG крысы, несущие неозепитопы распознаваемые регРФ, могут тормозить реакцию агглютинации нагруженных IgG крысы эритроцитов, вызываемую ОБМ морской свинки, т.е. конкурировать с IgG крысы, фиксированными на эритроцитах за связывание с ОБМ морской свинки. Следовательно, ОБМ несет такие же участки связывания с эпитопами на Fc фрагментах IgG и IgG, фиксированным на эритроцитах, как и регРФ (Рисунок 5). Это еще один интересный факт, поскольку ОБМ морской свинки может связываться с эпитопом, экспрессируемым на активированных лимфоцитах, к которому специфичен регуляторный ревматоидный фактор, однако эффекты такого взаимодействия еще предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, различие в кинетике образования антител к гетерологичному ОБМ и аутоантител к ОБМ крысы в ходе иммунного ответа на гетерологичный ОБМ указывает на то, что антитела к гетерологичному ОБМ и аутоантитела к ОБМ крысы являются разными антителами и, следовательно, продуцируются разными клоонами лимфоцитов. Между регуляторным ревматоидным фактором и антителами к ОБМ морской свинки, а также между регуляторным ревматоидным фактором и антителами к ОБМ крысы существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия. Эти факты указывают на то, что активация аутореактивных лимфоцитов в экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита, вызванного иммунизацией гетерологичным антигеном, может осуществляться посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий.

Крысы, иммунизированные ОБМ морской свинки, у которых развились клинические признаки на 10-12 день, отличались от крыс, у которых клинические признаки не развились относительно низким титром регРФ в крови на 7 день после иммунизации. Данный факт указывает на то, что регуляторный ревматоидный фактор является важным звеном в механизмах идиотипической регуляции аутоиммунитета.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Учитывая ведущую роль клеточных иммунных реакций в патогенезе как

рассеянного склероза, так и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс, представляется интересным исследовать клеточные механизмы идиотипической регуляции аутореактивности и роль антител в них.

ВЫВОДЫ

1. Иммунизация крыс гетерологичным основным белком миелина быка в дозе 200мкг в неполном адъюванте Фрейнда или основным белком миелина морской свинки в дозе 25мкг в полном адъюванте Фрейнда приводит к развитию аутоиммунной реакции, сопровождающейся ростом антител как к введенному антигену, так и аутоантител. Клинические признаки энцефаломиелита проявились только у 35% животных, иммунизированных основным белком миелина морской свинки. Титр аутоантител к основному белку миелина крысы не коррелировал с наличием или отсутствием симптомов энцефаломиелита.

2. Кинетика аутоантител к основному белку миелина крысы в ходе иммунного ответа не зависела от кинетики антител к гетерологичному основному белку миелина. Независимость кинетики аутоантител и антител к гетерологичному антигену в ходе иммунного ответа указывает на то, что они являются продуктами разных клонов лимфоцитов.

3. Выявлено различие в кинетике регуляторного ревматоидного фактора у иммунизированных основным белком миелина морской свинки крыс между животными с клиническими признаками и животными, у которых клинические признаки не развились. Отсутствие клинических признаков энцефаломиелита у крыс, иммунизированных гетерологичным основным белком миелина морской свинки, было ассоциировано с высоким уровнем регуляторного ревматоидного фактора в крови на 7 день после иммунизации.

4. Между антителами к гетерологичному основному белку миелина морской свинки и регуляторным ревматоидным фактором, а также между антителами к аутологичному основному белку миелина крысы и регуляторным ревматоидным фактором существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

5. Независимость кинетики аутоантител и антител к гетерологичному основному белку миелина у иммунизированных крыс, наличие идиотип антиидиотипических взаимодействий между аутоантителами и антителами к гетерологичному антигену указывают на то, что индукция аутоиммунной реакции в данной экспериментальной

модели происходит опосредованно, через идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

6. Ассоциация высокого уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс на 7 день после иммунизации основным белком миелина морской свинки с отсутствием у них клинических проявлений, а также существование идиотип-антиидиотипических взаимодействий между регуляторным ревматоидным фактором, аутоантителами и антителами к гетерологичному основному белку миелина указывают на то, что регуляторный ревматоидный фактор является важным звеном в идиотипических механизмах регуляции аутоиммунитета.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение регуляторного ревматоидного фактора в крови больных рассеянным склерозом может использоваться в клинической практике для мониторинга течения заболевания и оценки его тяжести.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

- 1. Иванов, П.В. Роль идиотип-антиидиотипических взаимодействий в индукции аутоантител к белкам миелина у мышей в ответ на введение гетерологичного основного белка миелина / П.В. Иванов, Л.В. Бедулева // Вестник уральской медицинской академической науки – 2010 - 2/1 – стр. 139-141.**
2. Иванов, П.В. Кинетика образования аутоантител к белкам миелина в ответ на введение основного белка миелина / П.В. Иванов, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // XXI съезд Физиологического общества имени И.П. Павлова. Тезисы докладов. - 2010. - Ч.1. - С. 240-241.
- 3. Иванов, П.В. Механизм индукции и регуляции аутоиммунных реакций в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита / П.В. Иванов, О.С. Лобанова, Л.В. Бедулева // Российский иммунологический журнал. - 2013. - Т. 7(16). - №2-3. - С. 230-231.**
- 4. Бедулева, Л.В. Роль аутоиммунной реакции против CD4 в патогенезе СПИДа / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, П.В. Иванов // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле / УдГУ Ижевск. – 2013. – №3 – С. 64 – 77.**
5. Иванов, П.В. Антииммуноглобулиновые антитела при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите / П.В. Иванов, О.С. Лобанова, Л.В. Бедулева, Е.Ю.

Столярова // Биология – наука XXI века: 17-я – международная Пущинская школа – конференция молодых ученых. – 2013. - С. 418.

6. Иванов, П.В. Устойчивость к развитию аутоиммунных заболеваний ассоциирована с реакцией аутоантител, специфичных к Fab и Fc фрагментам IgG / П.В. Иванов, Н.Н. Абишева, Е.Ю. Столярова, О.С. Лобанова, К.С. Фомина, Л.В. Бедулева // XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов – 2013 – С. 196.

7. Бедулева, Л.В. Физиологический ревматоидный фактор в разнонаправленных эффектах циклоспорина А на иммунный ответ / Л.В. Бедулева, П.В. Иванов // Цитокины и воспаление. - 2014. -Т.13. №1. - С.88

8. Столярова, Е.Ю. Гетерогенность ревматоидного фактора / Е.Ю. Столярова, П.В. Иванов, Н.Н. Абишева, А.С. Терентьев, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Вестник Удмуртского университета. - 2014. - №3. - С.107-112.

9. Beduleva, L. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / L. Beduleva, I. Menshikov, E. Stolyarova, K. Fomina, O. Lobanova, P. Ivanov and A. Terentiev // International Journal of Rheumatic Diseases. – 2015. – V. 18(4). – P. 408-20

10. Иванов, П.В. Идиотипические механизмы индукции и регуляции аутоиммунных реакций при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите крыс/ П.В. Иванов, И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева // Российский иммунологический журнал. - 2017. - Т.11. - №2 (20) - С. 340-342.

11. Beduleva, L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by IgG Fc fragments bearing regRF epitopes / L. Beduleva, T. Khramova, A. Sidorov, A. Terentiev, N. Abisheva, D. Menshikova, P. Ivanov, K. Fomina, A. Gorbushina, N. Shklyayeva, I. Menshikov // International Immunopharmacology. – 2021. - doi: 10.1016/j.intimp.2021.108309.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РС – рассеянный склероз

ЭАЭ – экспериментальный

аутоиммунный энцефаломиелит

ОБМ – основной белок миелина

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ИАИ – идиотип-антиидиотипические взаимодействия

ИФА – иммуноферментный анализ

РФ – ревматоидный фактор

регРФ – регуляторный ревматоидный фактор

На правах рукописи

Иванов Павел Владимирович

**ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
АУТОРЕАКТИВНОСТИ К БЕЛКАМ МИЕЛИНА В МОДЕЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО
ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА КРЫС**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Челябинск– 2022