

На правах рукописи

**Столярова Елена Юрьевна**

**РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР  
В ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
АУТОРЕАКТИВНОСТИ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Челябинск – 2015

Работа выполнена на кафедре иммунологии и клеточной биологии биолого-химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Удмуртский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент,  
**Бедулева Любовь Викторовна**

Официальные оппоненты:  
**Селедцова Галина Викторовна** доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточных биотехнологий, заведующая

**Заморина Светлана Анатольевна** доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория экологической иммунологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 года в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.117.03 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте [www.chelsma.ru](http://www.chelsma.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 года.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Шишкова Ю. С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В настоящее время одним из ключевых в фундаментальной и клинической иммунологии остается вопрос о механизмах иммунорегуляции, обеспечивающих состояние естественной толерантности, поскольку нарушения в этих механизмах ведут к развитию аутоиммунных заболеваний.

Сегодня происходит кардинальная смена представлений о механизмах толерантности к аутоантигенам в направлении признания существования в условиях физиологической нормы непатогенной активности аутореактивных лимфоцитов и продукции аутоантител к внеклеточным, мембранным, внутриклеточным и внутриядерным аутоантигенам (Coutinho A., Kazatchkine M. D., Avrameas S. Natural autoantibodies // *Curr. Opin. in Immunology*. 1995. Vol. 7, № 6. P. 812–818). В связи с этим возникает вопрос, как осуществляется регуляции активности аутореактивных лимфоцитов, обеспечивающая не агрессивный характер аутоиммунных реакций. Обсуждается роль Т-регуляторных клеток ( $CD4^+CD25^+$  FoxP3) (Bettelli E., Carrier Y., Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells // *Nature*. 2006. Vol. 411. P. 235–238.) и В-регуляторных клеток ( $CD19^+CD25^{high}$ ) (Kessel A., Haj T., PerHuman R. et al.  $CD19^+CD25^{high}$  B regulatory cells suppress proliferation of  $CD4^+$  T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells // *Autoimmun. Rev.* 2012. Vol. 11, № 9. P. 670–677) в контроле аутореактивности. Однако механизм регуляции аутореактивных клеток до конца не ясен. Об этом свидетельствует не только отсутствие эффективных лекарственных средств для лечения аутоиммунных заболеваний, но и не обозначенность биомишеней, воздействие на которые может подавлять аутоиммунные реакции.

Наиболее обоснованное объяснение как формируется и поддерживается состояние естественной толерантности может быть найдено в рамках предложенной N. Jerne теории иммунной сети (Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system // *Ann. Immunol.* 1974. Vol. 125. P. 373–389). Согласно теории Jerne лимфоциты и антитела специфически взаимодействуют между собой посредством взаимного узнавания идиотипов (Jerne N.K. Towards a network theory

of the immune system // *Ann. Immunol.* 1974. Vol. 125. P. 373–389). Такие взаимодействия называли идиотип-антиидиотипические (ИАИ). Jerne предполагал, что антиидиотипические антитела – ключевые факторы специфической супрессии иммунного ответа. Позже были получены многочисленные доказательства, что ИАИ взаимодействия являются механизмом поддержания и ограничения активности лимфоцитов (Rodkey L. S. Autoregulation of Immune Responses via Idiotypic Network Interactions // *Microbiol. Rev.* 1980. Vol. 44, № 4. P. 631–659, Zanetti M., Sollazzo M., Billetta R. Functions and structures in regulatory network for self-reactivity // *Immunol Ser.* 1991. Vol. 55. P. 221–238). Сегодня наблюдается ренессанс в исследованиях ИАИ взаимодействий (Behn U. Idiotypic networks: toward a renaissance? // *Immunol. Rev.* 2007. Vol. 216. P. 142–152; Shulz R., Werne B., Behn U. Self-tolerance in a minimal model of the idiotypic network // *Frontiers in Immunology.* 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00086) в частности, в связи с их способностью обеспечить специфичность, клональность регуляции и высоким потенциалом в регуляции естественной толерантности (Coutinho A. Will the idiotypic network helps to solve natural tolerance? // *Trends Immunol.* 2003. Vol. 24. P. 53–54). В ряде работ показано, что аутореактивные лимфоциты являются компонентами иммунной сети и находятся под контролем антиидиотипических лимфоцитов (Calkins C.E., Cochran S.A., Miller R.D. Evidence for regulation of the autoimmune anti-erythrocyte response by idiotypic-specific suppressor T cells in NZB mice // *Int. Immunol.* 1990. Vol. 2, № 2. P. 127–133.; Coutinho A., Kazatchkine M. D., Avrameas S. Natural autoantibodies // *Curr. Opin. in Immunology.* 1995. Vol. 7, № 6. P. 812–818). Однако как иммунная сеть осуществляет контроль аутореактивных лимфоцитов до конца не ясно.

Важным компонентом иммунной сети является ревматоидный фактор (РФ) и лимфоциты его продуцирующие (Carson D. A., Chen P., Fox R. I. et al. Rheumatoid factor and immune networks // *Ann. Rev. Immunol.* 1987. Vol. 5. P. 109 – 126.; Newkirk M. M. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity // *Clinical immunology.* 2002. Vol. 104, № 1. P. 1–13). Идиотип-антиидиотипические взаимодействия обнаружены между ревматоидным фактором и антителами различной специфичности: аутоантителами к тиреоглобулину (Kojima K., Yamada T., Ohgaki S. Crossreaction of monoclonal antiidiotypic antibodies specific for human

antithyroglobulin antibody with the Fc portion of human IgG // J. Rheumatol. 1988. Vol. 4, № 4. P. 587–592), аутоантителами к коллагену II типа (Nordling C., Holmdahl R., Klareskog L. A monoclonal antiidiotypic antibody with rheumatoid factor activity defines a cross-reactive idiotope on murine anticollagen antibodies // The Journal of Immunology. 1991. Vol. 146, № 12. P. 4258–4263), антителами к антигенам семейства герпес вирусов (McCormick J.N., Wojtacha D., Edmond E. et al. Do polyclonal rheumatoid factors carry an 'internal image' of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and nuclear antigens? // Scand. J. Rheumatol. 1988. Vol. 17. P. 109–116), антителами против Fc-связывающих белков *Streptococcus* (Nardella F. A., Oppliger I. R., Stone G. C. et al. Fc epitopes for human rheumatoid factors and the relationships of rheumatoid factors to the Fc binding proteins of microorganisms // Scand. J. Rheumatol. Suppl. 1988. Vol. 75. P. 190–198). Поэтому можно предполагать, что лимфоциты, продуцирующие РФ, участвуют в регуляции активности как аутореактивных лимфоцитов, так и лимфоцитов против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий с ними. Учитывая, что РФ - гетерогенная по специфичности и свойствам группа антител (Ota T. Present status and problems with rheumatoid factor as a laboratory test // Rinsho Byori. 2003. Vol. 51, № 7. P. 649–655) для определения РФ были выбраны два метода, один из которых позволяет определять аутореактивный РФ у здоровых людей и животных, другой выявляет РФ, ассоциированный с артритом.

**Цель исследования:** исследовать роль ревматоидного фактора в идиотипической регуляции иммунного ответа против антигенов-индукторов экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний.

**Задачи исследования:**

1. Провести сравнительный анализ продукции популяций ревматоидного фактора у чувствительных и резистентных к индуцируемому аутоиммунным заболеваниям крыс.
2. Выяснить специфичность ревматоидного фактора, определяемого методом агглютинации танизированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, и сравнить ее со специфичностью ревматоидного фактора, определяемого мето-

дом иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигена IgG кролика.

**3.** Исследовать идиотип-антиидиотипические взаимодействия между ревматоидным фактором и антителами к антигенам-индукторам экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний.

**Методология и методы исследования.** Исследование проводилось на трех экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний: ЭАЭ крыс, КИА крыс и атеросклероз крыс. Для выяснения роли РФ в регуляции иммунного ответа и предотвращении развития аутоиммунного заболевания проводили сравнительный анализ продукции РФ у чувствительных и резистентных к индуцируемому аутоиммунным заболеваниям крыс. ИАИ взаимодействия между РФ и антитела к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний исследовали с помощью конкурентного иммуноферментного анализа. Специфичность регуляторной популяции РФ определяли, используя несколько подходов – индукция РФ *in vivo* потенциальными антигенами, конкурентное ингибирование.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Результаты получены на адекватных заболеваниях человека экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний, с помощью стандартизованных методов, на выборках достаточного объема, воспроизведены в нескольких сериях экспериментов. Для оценки достоверности выявленных различий использованы адекватные статистические критерии.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на II Всероссийской научной конференции «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», (Санкт-Петербург, 2012); 17-ой международной Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013); объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); 15-м международном конгрессе иммунологов (Милан, 2013); XXII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013); научно-практической конференции посвященной 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург, 2014).

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, д.б.н., доцентом, Бедулевой Л.В. Цель, задачи и дизайн исследования сформулированы и разработаны автором самостоятельно. Экспериментальная часть исследования проводилась автором совместно с сотрудниками и аспирантами кафедры иммунологии и клеточной биологии УдГУ – к.б.н., Фоминой К.В., Сидоровым А.С., Храмовой Т.В. Анализ, систематизация, обобщение литературы по изучаемой проблеме проведены диссертантом самостоятельно. Статистическая обработка данных, оформление рукописи диссертации, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Ревматоидный фактор осуществляет негативную регуляцию активности лимфоцитов специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний.
2. Ревматоидный фактор регулирует активность лимфоцитов против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с ними.

**Научная новизна.** В нескольких экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний (коллаген-индуцированного артрита крыс, экспериментального энцефаломиелита крыс и атеросклероза крыс) выявлена связь между продукцией РФ в период инициации иммунного ответа против антигенов-индукторов экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний и устойчивостью к их развитию. Обнаружена ассоциация высокого уровня РФ с завершением иммунного ответа и ремиссией экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний. Таким образом, впервые показана физиологическая роль РФ, заключающаяся в негативной регуляции иммунного ответа против антигенов-индукторов экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний и обеспечении устойчивости к их развитию.

Выявлены две, разные по специфичности, популяции РФ, участвующие в регуляции иммунного ответа против антигенов-индукторов экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний. Одна из них может быть определена

методом агглютинации танализованных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, другая - методом ИФА с использованием в качестве антигена IgG кролика и служит дополнительным фактором регуляции.

Впервые выяснена специфичность регуляторной популяции РФ, определяемого методом агглютинации танализованных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Данная популяция РФ несет 2 вида паратопов – индивидуальный и общий. Индивидуальные паратопы молекул РФ разнообразны по специфичности и служат для узнавания антигенсвязывающих участков иммуноглобулиновых рецепторов и антител, общий паратоп молекул РФ узнает повторяющиеся идиотопы на иммуноглобулиновых рецепторах разной специфичности. Узнаваемые общим паратопом антигенные детерминанты могут быть индуцированы в шарнирной области Fc фрагментов гомологичного IgG папаиновым протеолизом.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Представлена новая гипотеза о механизме негативной регуляции активности лимфоцитов против антигенов-индукторов экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний с помощью ревматоидного фактора посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий. Полученные знания о роли РФ в регуляции аутореактивности открывают перспективы для разработки новых подходов в лечении аутоиммунных заболеваний, основанных на восстановлении механизмов регуляции аутореактивности. Выявленная ассоциация интенсивной продукции РФ в период инициации иммунного ответа и устойчивостью к развитию аутоиммунного заболевания в нескольких экспериментальных моделях позволяет обозначить лимфоциты, продуцирующие РФ как потенциальную биологическую мишень для разработки лекарственного средства против широкого спектра аутоиммунных заболеваний. Результаты исследования специфичности РФ дают основание для использования папаиновых Fc фрагментов гомологичного IgG, содержащих шарнирную область, в качестве действующего начала лекарственного средства для лечения аутоиммунных заболеваний. Найден новый предиктор (ранний маркер) манифестации экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний, которым является отсутствие продукции ревматоидного фактора в период их индукции.



**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс студентов биолого-химического факультета Удмуртского государственного университета, в курсы «Иммунология», «Клиническая иммунология», «Экспериментальные модели иммунопатологий», в тематику научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ кафедры иммунологии и клеточной биологии Удмуртского государственного университета по разработке вакцины для лечения аутоиммунных заболеваний.

**Публикации.** Соискатель имеет 14 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 14 научных работ общим объемом 3,75 печатных листов, в том числе 7 публикаций в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций (4 статьи, 3 тезисы), 2 статьи в зарубежных научных изданиях, 5 работ в материалах вузовских, всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 111 страницах, содержит приложение и состоит из введения, обзора литературы, описания организации и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов. Список литературы включает 128 источников, среди которых 8 отечественных и 120 иностранных. Работа иллюстрирована 19 рисунками, 3 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследований**

Исследование проводилось на трех экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний: ЭАЭ крыс, вызванного иммунизацией ОБМ морской свинки (мОБМ) (Sigma) в дозе 25 мкг в ПАФ, содержащем 100 мкг M. butyricum, КИА крыс, вызванного иммунизацией БК (Elastin) в дозе 400 мкг в НАФ, атеросклероза крыс вызванного иммунизацией ЛППП человека (Sigma) в дозе 200 мкг в НАФ. Для моделирования аутоиммунных заболеваний крыс Wistar иммунизировали однократно внутривенно. После иммунизации еженедельно, в течение 10 недель в моделях КИА и ЭАЭ и 16 недель в модели атеросклероза, забирали кровь кардиальной пункцией. В ответ на иммунизацию аутоиммунные заболевания возникали не у всех иммунизированных животных, некоторые кры-

сы оказались устойчивыми к их развитию. У всех крыс исследовали кинетику образования антител к иммуногену и популяций РФ. Проводили сравнительный анализ уровня исследуемых антител у устойчивых к аутоиммунным заболеваниям крыс и больных крыс. Титр антител к антигенам-индукторам экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний определяли методом ИФА. РФ определяли двумя методами: методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов (Oreskes I., Mandel D. Reactivity of sized thermal aggregates of immunoglobulin G with IgM rheumatoid factor // Immunology. 1984. Vol. 51, № 1. P. 115–121.) и методом ИФА, где в качестве антигена использовали IgG кролика (Halldórsdóttir H. D., Jónsson T., Thorsteinsson J. et al. A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor // Ann. Rheum. Dis. 2000. Vol. 59, № 2. P. 149–151). РФ, определяемый методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов называли РФтнIgGэ, РФ специфичный к IgG кролика – РФкрIgG.

Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между РФтнIgGэ и антителами к иммуногенам исследовали методом конкурентного ИФА. Антигены (БК, мСОБМ или чЛПНП) сорбировали в планшеты. После этого в лунках планшета инкубировали смесь, содержащую антиген-специфическую плазму и РФтнIgGэ-содержащую плазму. Образцы антиген-специфической плазмы вносили в лунки планшета в разведениях, включая рабочее. За рабочее принимали разведение плазмы, при котором соотношение связанного и общего антигена равно 0,5. В контроле вместо РФтнIgGэ-содержащей плазмы вносили плазму не содержащую РФтнIgGэ. Антиген-специфическая плазма, используемая в этом эксперименте, имела высокие титры антител к соответствующим иммуногенам и не обнаруживаемые уровни РФтнIgGэ. Образцы плазмы, содержащие РФтнIgGэ были получены от крыс на 7 день после иммунизации БК, мСОБМ и чЛПНП и не содержали антиген-специфических антител в детектируемых количествах.

Для выяснения специфичности РФтнIgGэ сравнивали специфичности РФтнIgGэ и панагглютининов, РФтнIgGэ и РФкрIgG; исследовали способность IgG крысы (Sigma) и его фрагментов вызывать торможение реакции агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванной

плазмой, содержащей РФтнIgGэ и индуцировать продукцию РФтнIgGэ у интактных крыс при иммунизации. Fc фрагменты IgG крыс получали папаиновым гидролизом. Fc фрагменты очищали от Fab фрагментов методом аффинной хроматографии на протеин G-сефарозе. Физико-химические свойства Fc-фрагментов IgG определяли методом электрофореза в ПААГ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica для Windows. Результаты выражали как среднее±SE (стандартная ошибка среднего). Для оценки достоверности различий был использован t-тест и критерий Манна-Уитни для малых выборок.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

#### **Сравнительный анализ продукции популяций ревматоидного фактора у чувствительных и резистентных к индуцируемому аутоиммунным заболеваниям крыс**

В ответ на иммунизацию антигенами-индукторами аутоиммунных заболеваний часть крыс оказалась устойчива к развитию вызываемых ими заболеваний. На рисунках 1А, 2А и 3А видно, что у устойчивых к аутоиммунным заболеваниям крыс, иммунному ответу против антигена-индуктора, независимо от его специфичности, предшествует повышение уровня РФтнIgGэ. Максимум РФтнIgGэ в крови наблюдаются уже на 7 день после иммунизации, тогда как антитела к иммуногену достигают максимума только на 28-35 день после иммунизации.

У животных, развивших КИА, ЭАЭ или атеросклероз не выявлено повышения уровня РФтнIgGэ в период индукции иммунного ответа (т.е. в течение 7 дней после иммунизации) (рисунок 1Б, 2Б и 3Б соответственно). Сравнительный анализ уровня РФтнIgGэ на 7 день после иммунизации у устойчивых и больных крыс в трех моделях выявил достоверно высокий уровень РФтнIgGэ на 7 день у устойчивых крыс по сравнению с животными, у которых далее развилось заболевание. Индивидуальный анализ показал, что у некоторых крыс, оказавшихся устойчивыми к развитию исследуемых заболеваний, в период индукции иммунного ответа, вместо РФтнIgGэ, либо совместно с РФтнIgGэ наблюдается продукция РФкрIgG. У заболевших ЭАЭ и атеросклерозом крыс уровень РФкрIgG, как и РФтнIgGэ низкий.

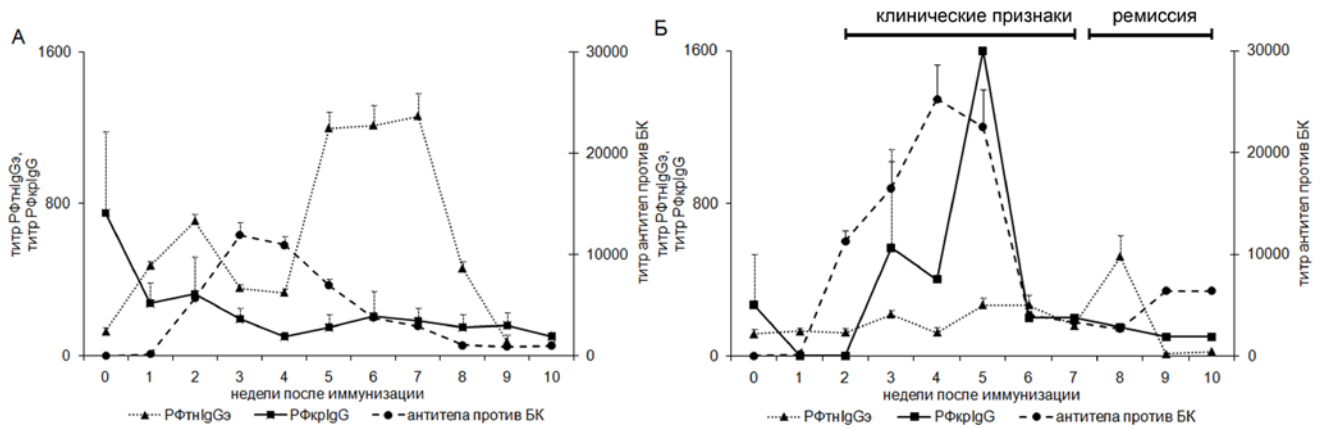


Рисунок 1 – Кинетика антител к БК и кинетика РФтИгGэ и РФкрИгG в ходе иммунного ответа, вызванного иммунизацией БК у устойчивых (А) и чувствительных (Б) к КИА крыс. Примечание: каждая точка представлена средним от 14 крыс±SE для больных животных и от 24крыс±SE для здоровых животных.

В фазу завершения иммунного ответа у крыс устойчивых к КИА (рисунок 1А) и к ЭАЭ (рисунок 2А), а также в период клинической ремиссии и падения уровня антител против антигена-индуктора у крыс больных ЭАЭ (рисунок 2Б) наблюдается повышение уровня РФтИгGэ. Клиническая ремиссия в модели КИА (рисунок 1Б) наступает вслед за интенсивной продукцией РФкрИгG. Таким образом, устойчивость к развитию аутоиммунного заболевания в моделях КИА, ЭАЭ, атеросклероза крыс ассоциирована с интенсивной продукцией РФтИгGэ или/и продукцией РФкрИгG в период инициации иммунного ответа, тогда как отсутствие продукции РФ в ранний период иммунного ответа связано с последующей манифестацией экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний. Ремиссия экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний и завершение иммунного ответа у устойчивых к аутоиммунным заболеваниям животных также связаны с повышением уровня РФ.

Выявленные факты указывают на регуляторную роль РФтИгGэ и РФкрИгG в продукции антител к антигенам индукторам аутоиммунных заболеваний. Популяция РФтИгGэ является ведущей в регуляции. Низкий уровень РФтИгGэ и РФкрИгG в период индукции иммунного ответа (7 день после иммунизации) может рассматриваться как предиктор последующей манифестации экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний.

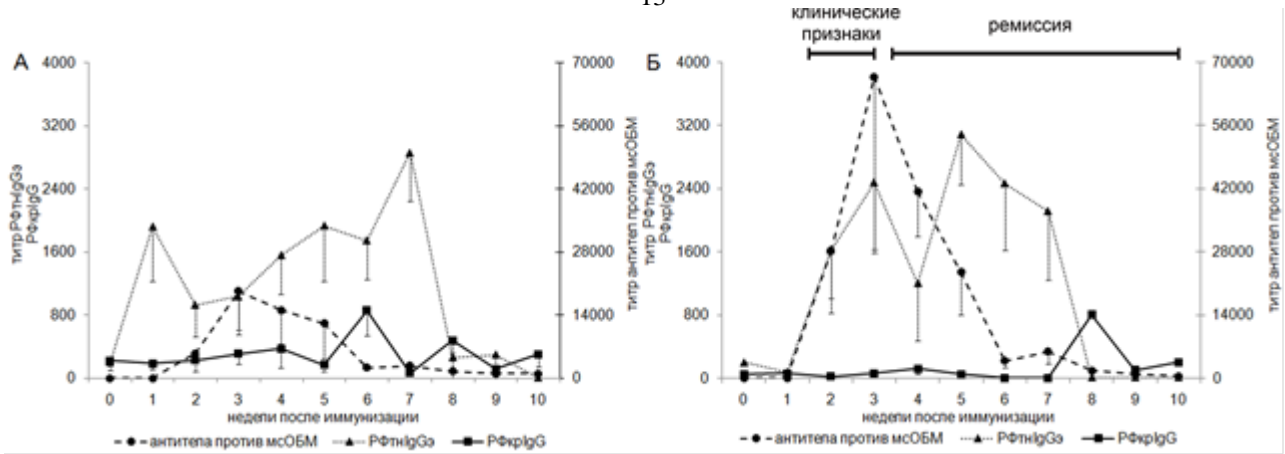


Рисунок 2 – Кинетика антител к мСОБМ и кинетика РФтнIgGэ и РФкрIgG в ходе иммунного ответа, вызванного иммунизацией мСОБМ у устойчивых (А) и чувствительных (Б) к ЭАЭ крыс. Примечание: каждая точка представлена средним от 13 крыс±SE для здоровых животных и от 7 крыс±SE для больных животных.

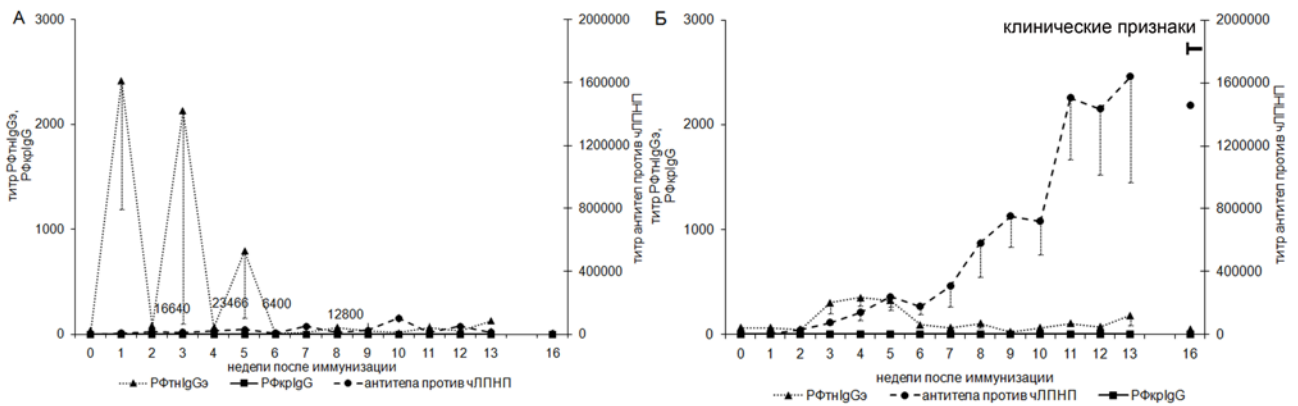


Рисунок 3 – Кинетика антител к чЛПНП и кинетика РФтнIgGэ и РФкрIgG в ходе иммунного ответа против чЛПНП у устойчивых (А) и чувствительных (Б) к атеросклерозу крыс. Примечание: каждая точка представлена средним от 7 крыс±SE для здоровых животных и от 8 крыс±SE для больных животных.

На первый взгляд полученные факты и следующие из них выводы не согласуются с широко распространенным представлением о том, что повышение уровня РФ предшествует ревматоидному артриту и высокий титр РФ является фактором риска прогресса артралгии и развития внесуставных проявлений у пациентов с ревматоидным артритом (Vittecoq O., Pouplin S., Krzanowska K. et al. Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients // Rheumatology. 2003. Vol. 42. P. 939–946). Однако в ряде работ показано, что кроме патологического существует физиологический РФ, который считается нормальным компонентом иммунного ответа (V.W.J. Esch, C.C. Reparon-Schuijt, E.W. Levarht et al. Differential requirements for induction of total immunoglobulin and

physiological rheumatoid factor production by human peripheral blood B cells // Clin. Exp. Immunol. 2001. Vol. 123, № 3. P. 496–504). Изучаемые нами популяции РФ выявляются у интактных животных и повышение их уровня в ответ на инициирующий антигенный стимул, предшествующее продукции антител к иммуногену, ассоциировано с устойчивостью животных к развитию аутоиммунных заболеваний в исследуемых экспериментальных моделях. Эти факты дают основания считать РФтнIgGэ, а также РФкрIgG отличными от патологического РФ, ассоциированного с артритом, и отнести их к классу физиологического, регуляторного РФ. Зависимость между высоким уровнем РФ на 7 день после иммунизации и устойчивостью к развитию клинической картины заболевания выявлена в нескольких экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний (КИА, ЭАЭ, атеросклероза), что позволяет назвать РФтнIgGэ универсальным фактором устойчивости к развитию аутоиммунных заболеваний.

**Специфичность ревматоидного фактора, определяемого методом агглютинации танализованных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.**

Для выяснения специфичности РФтнIgGэ использовали несколько подходов: исследование способности IgG и его фрагментов ингибировать агглютинацию танализованных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, вызванную РФтнIgGэ-содержащей сывороткой, и вызывать продукцию РФтнIgGэ у интактных крыс; сравнение специфичности РФтнIgGэ и РФкрIgG.

Исследование реакции агглютинации, вызванной РФтнIgGэ-содержащей плазмой, полученной от крыс иммунизированных антигенами-индукторами аутоиммунных заболеваний, в присутствии Fc-фрагментов IgG крысы, содержащих шарнирный участок и не содержащих последнего, а также нативного IgG крысы показало, что только Fc фрагменты IgG крысы, содержащие шарнирную область конкурируют за связывание с РФтнIgGэ-содержащей плазмой. Для определения способности индуцировать продукцию РФтнIgGэ *in vivo* крыс иммунизировали гомологичным нативным IgG и его папаиновыми Fc фрагментами, содержащими и не содержащими шарнирный участок. Было обнаружено, что продукцию РФтнIgGэ индуцируют только Fc фрагменты, содержащие шарнирную область. Поскольку Fc фрагменты, имеющие шарнирную область, конкури-

руют с ЭТИgG за связывание с РФтИgGэ и вызывают его продукцию *in vivo*, а несодержащие шарнир Fc фрагменты и нативный IgG крыс не обладают такими свойствами, можно сделать вывод, что антигенные детерминанты для РФтИgGэ являются индуцируемыми и формируются в шарнирной области папаиновых Fc фрагментов IgG крыс.

Чтобы выяснить, являются РФтИgGэ и РФкрIgG одними и теми же антителами или разными, исследовали их кинетику в ходе иммунного ответа, вызванного иммунизацией крыс мСОБМ, а также способность IgG кролика вызывать торможение реакции агглютинации ЭТИgG и продукцию РФтИgGэ. Обнаружено, что у некоторых устойчивых к ЭАЭ крыс происходит повышение уровня обеих популяций РФ. Однако временные максимумы их образования не совпадают. Выявлено, что IgG кролика не вызывает торможение реакции агглютинации, вызванной РФтИgGэ-содержащей плазмой. Кроме того, IgG кролика *in vivo* не индуцирует продукцию РФтИgGэ. Следовательно, РФтИgGэ и РФкрIgG – разные по специфичности популяции ревматоидного фактора.

#### **Исследование идиотип-антиидиотипических взаимодействий между РФ и антителами к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний.**

ИАИ взаимодействия между РФтИgGэ и антителами против антигенов индукторов аутоиммунных заболеваний были изучены методом конкурентного ИФА. Для этого к системе антиген/плазма против антигена были добавлены образцы плазмы, содержащие РФтИgGэ, полученные от крыс иммунизированных данным антигеном (рисунок 4, левый столбец), а также от крыс, иммунизированных другими антигенами (рисунок 4, правый столбец).

Обнаружено, что реакция антиген/антитело во всех исследованных системах в присутствии РФтИgGэ-содержащей плазмы подавлена (рисунок 4). Следовательно, РФтИgGэ-содержащая плазма способна ингибировать связывание любой из исследованных пар антиген-антитело независимо от их специфичности. Однако, характер ингибирования в присутствии образцов плазмы содержащих РФтИgGэ, полученных от животных, иммунизированных тем же антигеном, что сорбирован в планшете и в присутствии образцов плазмы содержащих РФтИgGэ, полученных при иммунизации другими антигенами, различен (рисунок 4).

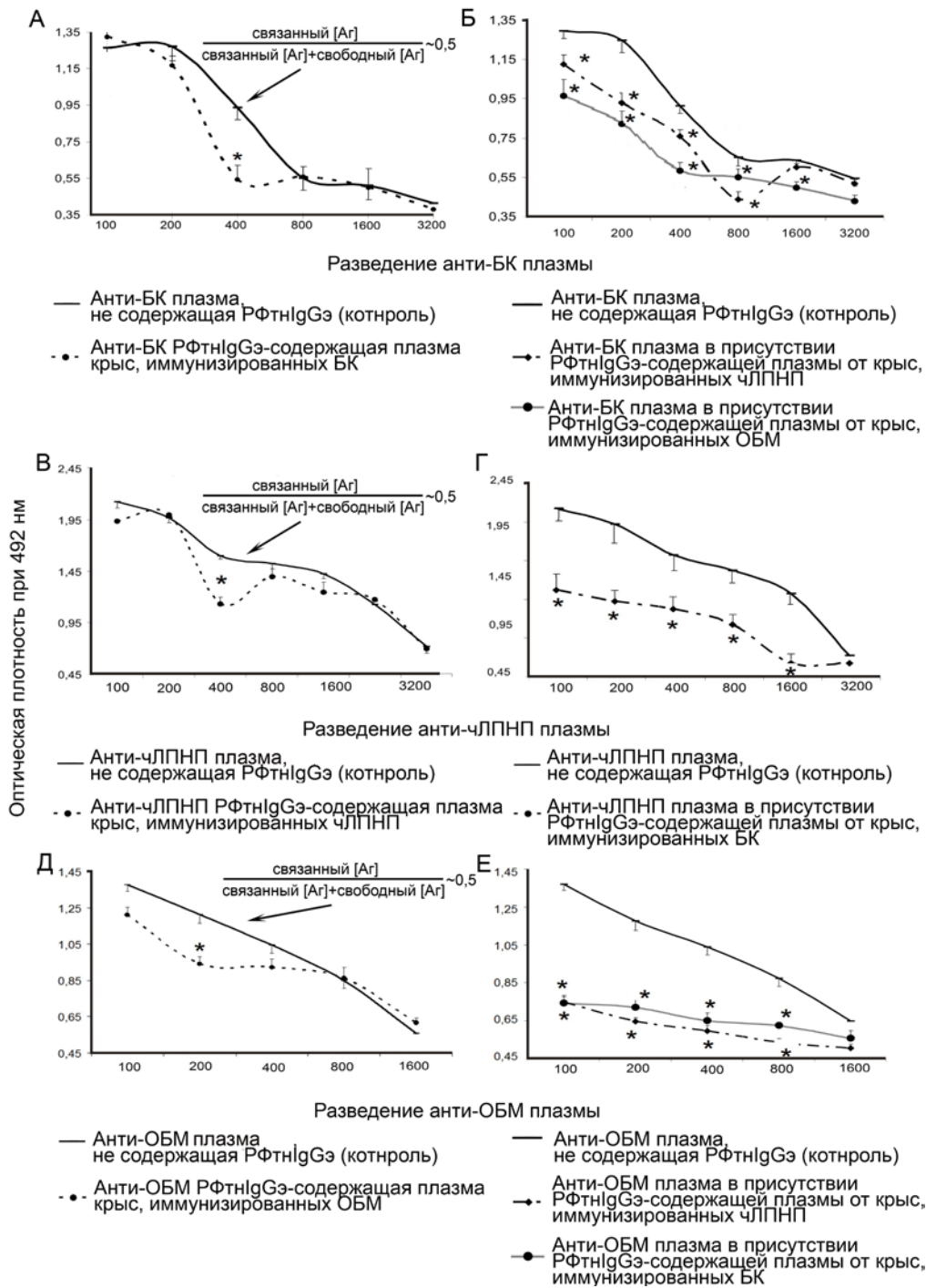


Рисунок 4 – Кривые титрования антител к антигену–индуктору аутоиммунного заболевания в присутствии плазмы содержащей РФтнIgGэ, полученной от крыс, иммунизированных тем же антигеном, что сорбирован на планшете, и плазмы содержащей РФтнIgGэ, полученной от крыс, иммунизированных другими антигенами-индукторами аутоиммунных заболеваний. В контроле добавлена плазма, не содержащая РФтнIgGэ. Примечание: каждая точка представлена средним±SE. \* - статистически значимые различия по отношению к контролю,  $p < 0,05$ .

На рисунке 4 (левый столбец) показаны результаты ИФА образцов плазмы, содержащих антитела против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний (БК, ЧЛПНП, мсОБМ) в присутствии РФтнIgGэ-содержащей плазмы, по-



лученной при иммунизации тем же антигеном, который сорбирован в планшете. Видно, что снижение оптической плотности в присутствии РФтИгGэ-содержащей плазмы наблюдается только в зоне, где отношение концентраций антигена, связанного с антителами, и суммарного антигена близко к 0,5 (условие для конкуренции за связывание с антителами), и не происходит ни в области избытка, ни в области недостатка антител по отношению к антигену. Это свидетельствует о конкуренции за связывание с антителами к антигену между РФтИгGэ-содержащей плазмой и антигеном, при иммунизации которым она была получена.

Конкурентное ингибирование реакции антиген/антитело в присутствии РФтИгGэ-содержащей плазмы, полученной при иммунизации данным антигеном, указывает на наличие внутреннего образа этого антигена на РФтИгGэ, и доказывает существование ИАИ взаимодействий между антителами к антигену и РФ, полученным при иммунизации данным антигеном, а именно между антителами к БК и РФтИгGэ, полученным от крыс иммунизированных БК, между антителами к чЛПНП и РФтИгGэ от чЛПНП иммунизированных крыс, и между антителами к мСОБМ и РФтИгGэ от мСОБМ иммунизированных крыс (рисунок 5). Данный факт указывает на то, что для популяции РФ, определяемой методом агглютинации таннизированных нагруженных IgG эритроцитов, характерно разнообразие по специфичности.

РФтИгGэ-содержащая плазма, полученная от крыс иммунизированных другим антигеном (не тем, что сорбирован в планшете), ингибирует связывание антител с антигеном при любом соотношении антиген-антитело, т.е. неконкурентно (рисунок 4, правый столбец). Неспецифическое ингибирование реакции связывания антиген/антитело РФтИгGэ-содержащей плазмой может происходить по двум причинам. Либо РФтИгGэ связывается с Fc-областью антител в составе иммунных комплексов, образующихся при анализе, либо ревматоидные факторы помимо индивидуальных специфичностей несут общий паратоп, с помощью которого узнают повторяющийся идиотоп на антителах разной специфичности (рисунок 5). Мы показали, что плазма, содержащая РФтИгGэ, не вызывает агглютинацию иммунных комплексов - эритроциты человека/IgG-антитела против эритроцитов человека. Поэтому неспецифическое ингибирование

ние реакции связывания антиген/антитело РФтнIgGэ-содержащей плазмой можно объяснить только наличием общих детерминант на антителах разной специфичности, и наличием на РФтнIgGэ разной специфичности общего паратопа, узнающего такие детерминанты (рисунок 5). Ранее Fong на основе генетического анализа РФ также классифицировал идиотипические маркеры РФ человека на "частные" и "общие" (Fong S., Chen P.P., Crowley J.J. et al. Idiotypes and the structural diversity of human rheumatoid factors // Springer Semin. Immunopathol. 1988. Vol. 10, № 2–3. P. 189–201). Однако Fong не была исследована специфичность идиотипических детерминант РФ.

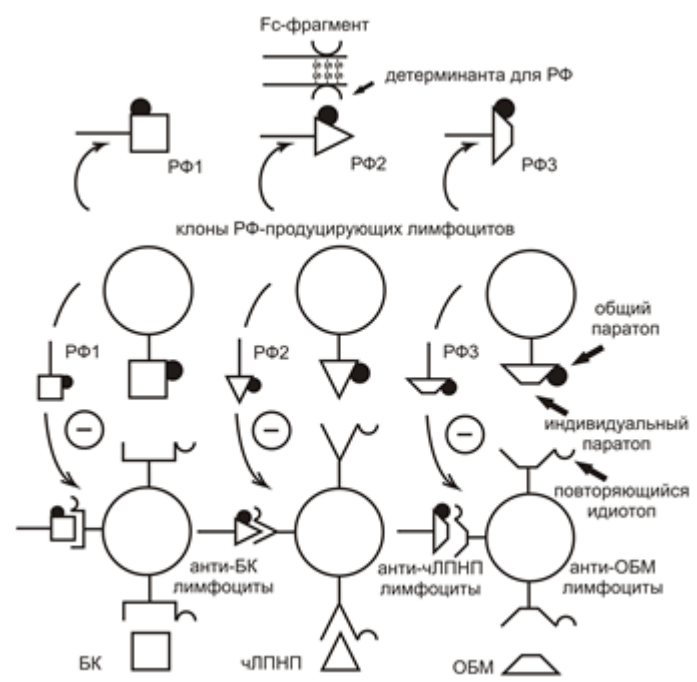


Рисунок 5 – Гипотетическая схема негативной регуляции активности лимфоцитов против антигенов-индукторов экспериментально вызываемых аутоиммунных заболеваний с помощью ревматоидного фактора посредством ИАИ взаимодействий.

Таким образом, способность РФтнIgGэ-содержащей плазмы конкурировать с антигеном, при иммунизации которым она получена, и неспецифически подавлять связывание разных пар антиген-антитело, позволяет предполагать, что РФтнIgGэ – антиидиотипические антитела, несущие индивидуальный паратоп (узнает антигенсвязывающий участок антител) и общий паратоп (специфичен к идиотопам повторяющимся на антителах разной специфичности) (рисунок 5). Общий паратоп РФ может служить также для распознавания неоантигенных детерминант на Fc фрагментах гомологичного IgG, индуцируемых папаиновым

протеолизом (рисунок 5). Способность РФ вступать в идиотип-антиидиотипические взаимодействия с антителами, т.е. взаимодействовать с их Fab фрагментами и узнавать Fc фрагменты IgG согласуется с известными фактам о существовании у здоровых людей и у людей, страдающих аутоиммунными заболеваниями популяции анти-IgG антител с двойной специфичностью, реагирующих как Fab, так и с Fc фрагментами IgG (Hunt Gerardo S., Persselin J.E., Stevens R.H. Human IgG anti-F(ab')<sub>2</sub> antibodies possess rheumatoid factor activity // Clin. Exp. Immunol. 1990. Vol. 81, № 2. P. 293 – 300).

### **Заключение**

Обнаружены две, разные по специфичности, популяции ревматоидного фактора, которые осуществляют супрессорную регуляцию иммунного ответа против антигенов-индукторов экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний и предотвращают развитие последних. Одна из них может быть определена методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, другая методом иммуноферментного анализа, с использованием в качестве антигена IgG кролика. Антигенные детерминанты для ревматоидного фактора, определяемого методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, могут быть индуцированы в шарнирной области Fc фрагментов гомологичного IgG папаиновым протеолизом, но отсутствуют на нативной молекуле IgG.

Регуляция, опосредованная популяцией ревматоидного фактора определяемого методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, основана на распознавании уникальных идиотопов лимфоцитов специфичных к антигенам-индукторам аутоиммунных заболеваний, что позволяет отнести ревматоидный фактор к факторам специфической регуляции аутореактивности. Способность ревматоидного фактора регулировать иммунный ответ разной специфичности свидетельствует о его универсальности как фактора регуляции.

Результаты исследования обозначают лимфоциты, продуцирующие РФ, как биомишень, стимуляция которой позволит подавлять аутоиммунные реакции, а Fc фрагменты IgG, несущие детерминанты для РФ, как потенциальное лекарственное средство для лечения широкого спектра аутоиммунных заболе-

ваний. Поэтому предметом дальнейших исследований будет разработка технологии получения Fc фрагментов IgG человека, несущих детерминанты для ревматоидного фактора и испытания их эффективности.

### **ВЫВОДЫ**

1. Устойчивость к развитию коллаген-индуцированного артрита, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита и атеросклероза крыс ассоциирована с интенсивной продукцией ревматоидного фактора в период индукция иммунного ответа, тогда как отсутствие его продукции в этот период ведет к манифестации аутоиммунных заболеваний. Ремиссия экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний и завершение иммунного ответа у устойчивых к аутоиммунным заболеваниям животных также связаны с повышением уровня ревматоидного фактора.

2. Ревматоидный фактор, определяемый методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, специфичен к неоантигенным детерминантам, формирующимся в шарнирной области Fc фрагментов гомологичного IgG в ходе папаинового протеолиза, и отличается по специфичности от ревматоидного фактора против IgG кролика.

3. Ревматоидный фактор, определяемый методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов, конкурирует с антигеном, при иммунизации которым он получен, и неспецифически подавляет связывание разных пар антиген-антитело. Данный факт указывает на то, что исследуемый ревматоидный фактор – антиидиотипические антитела, несущие индивидуальный паратоп, служащий для узнавания антигенсвязывающего участка антител, и общий паратоп, который может быть специфичен к повторяющимся идиотопам на антителах разной специфичности.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Бедулева, Л.В. Толерантность, вызванная циклоспорином А в модели коллаген-индуцированного артрита крыс, опосредована ревматоидным фактором / Л.В. Бедулева, А.С. Корепанов, И.В. Меньшиков, А.О. Сосновцева, Е.Ю. Столярова // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле. – 2012. – №4. – С. 84–89.

2. Столярова, Е.Ю. Исследование специфичности регуляторной популяции ревматоидного фактора / Е.Ю. Столярова // XL итоговая студенческая конференция: материалы конференции. Ижевск. Удмуртский гос. ун-т. – 2012. – С. 97–98.
3. Столярова, Е.Ю. Популяции ревматоидного фактора в предотвращении развития атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП / Е.Ю. Столярова, К.В. Фомина, Л.В. Бедулева // Медицинский академический журнал: материалы II всерос. науч. конф. «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». – 2012. – С. 403-404.
4. Столярова, Е.Ю. Популяции ревматоидного фактора в регуляции иммунного ответа / Е.Ю. Столярова, Л.В. Бедулева // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – №4. – С. 61–62.
5. Столярова, Е.Ю. Специфичность регуляторной популяции ревматоидного фактора / Е.Ю. Столярова, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, Т.В. Храмова, Ю.В. Никонова // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле. – 2012. – №3. – С. 85–92.
6. Терентьев, А.С. Способ получения чистых Fc-фрагментов иммуноглобулина G крысы / А.С. Терентьев, А.Ю. Сидоров, Л.В. Бедулева, Е.Ю. Столярова, И.В. Меньшиков // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о земле. – 2012. – №4. – С. 91–95.
7. 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 Пушкинская школа – конференция молодых ученых. – 2013. - С. 418.
8. 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.
9. Столярова, Е.Ю. Ревматоидный фактор в идиотипической регуляции аутоиммунитета / Е.Ю. Столярова, Л.В. Бедулева, Н.Н. Абишева, Т.В. Храмова, О.Н. Мальцева // Российский иммунологический журнал. – 2013. – том 7, №. 2 – 3. – С. 256.

10. Beduleva, L. The rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / L. Beduleva, I. Menshikov, E. Stolyarova // *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. – 2013. – doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00319.
11. 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. Серия Биология. Науки о земле*. – 2014. – №3. – С. 107–112.
12. Столярова, Е.Ю. Ревматоидный фактор – патологические или регуляторные антитела? / Е.Ю. Столярова, Л.В. Бедулева, Н.Н. Абишева, Т.В. Храмова // *Цитокины и воспаление*. – 2014. – том 13, № 1. – С. 125.
13. Beduleva, L. The rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / L. Beduleva, I. Menshikov, E. Stolyarova, K. Fomina, O. Lobanova, P. Ivanov, A. Terentiev // *International Journal of Rheumatic Diseases*. – 2014. – doi. 10.1111/1756-185X.12335.
14. 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*. – 2014. – doi: 10.1016/j.jtbi.2014.10.003.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|   |   |
|---|---|
| БК – бычий коллаген II типа                             | РФ – ревматоидный фактор  |
| ИАИ – идиотип-антиидиотипические взаимодействия         | РФкрIgG – ревматоидный фактор, определяемый методом ИФА, где в качестве антигена используется IgG кролика                   |
| ИФА – иммуноферментный анализ                           | РФтнIgGэ - ревматоидный фактор, определяемый методом агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов |
| КИА – коллаген индуцированный артрит                    | ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит   |
| чЛПНП – нативные липопротеины низкой плотности человека | ЭТ – танализированные эритроциты  |
| НАФ – неполный адъювант Фрейнда                         | ЭТИgG – танализированные нагруженные гомологичным IgG эритроциты  |
| БОБМ – основной белок миелина быка                      |   |
| мсОБМ – основной белок миелина морской свинки           |   |
| ПААГ – полиакриламидный гель                            |   |
| ПАФ – полный адъювант Фрейнда                           |   |

На правах рукописи

**Столярова Елена Юрьевна**

**РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР  
В ИДИОТИПИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ  
АУТОРЕАКТИВНОСТИ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Челябинск – 2015