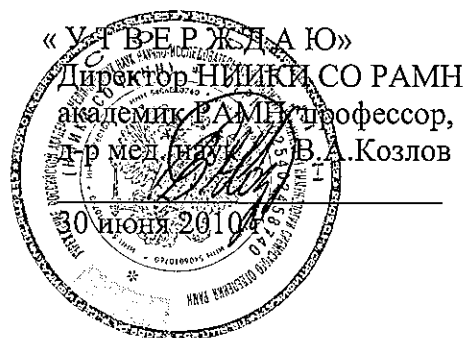


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Учреждение Российской академии медицинских наук  
научно-исследовательский институт клинической иммунологии  
(НИИКИ СО РАМН)



**НАУЧНЫЙ ОТЧЁТ**

по теме «Влияние оригинального препарата (фрагментированной ДНК лососевых рыб, иммобилизованной на полиэтиленгликоле низкой молекулярной массы) на возникновение и течение аутоиммунной патологии - *lupus*-подобного гломерулонефрита в экспериментальной модели»

Научный руководитель работы

в.н.с. лаборатории экспериментальной иммунотерапии






д-р биол. наук

Кудаева О.Т.

30 июня 2010 г.

Новосибирск-2010

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный сотрудник, К.м. н.	<u>«30» июня 2010 г.</u>		О.М.Перминова
Научный сотрудник	<u>«30» июня 2010 г.</u>		Е.В.Гойман
Научный сотрудник	<u>«30» июня 2010 г.</u>		Е.Д.Гаврилова
Лаборант-исследователь	<u>«30» июня 2010 г.</u>		В.Е.Абрамова
Лаборант-исследователь	<u>«30» июня 2010 г.</u>		А.В. Ларионова

## РЕФЕРАТ

Отчет изложен на 13 стр., содержит 4 табл., 25 литературных источников.

**Влияние оригинального препарата (фрагментированной ДНК лососевых рыб, иммобилизованной на полиэтиленгликоле низкой молекулярной массы) на возникновение и течение аутоиммунной патологии - *lupus*-подобного гломерулонефрита в экспериментальной модели**

Проведено изучение влияния оригинального препарата (фрагментированной ДНК лососевых рыб, иммобилизованной на полиэтиленгликоле низкой молекулярной массы) (далее – препарата) на возникновение, формирование и коррекцию иммунокомплексного гломерулонефрита – аутоиммунной патологии, индуцированной у экспериментальных животных хронической реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ).

Показано, что введение препарата по схеме, принятой для индукции оральной толерантности, увеличивает частоту возникновения *lupus*-подобного гломерулонефрита, вызванного хронической РТПХ. Эффект наиболее выражен при введении препарата до индукции хронической РТПХ, проявляется в меньшей степени при введении на ранних стадиях формирования гломерулонефрита и отсутствует при введении экспериментальным животным с уже развившимся гломерулонефритом; в последнем случае, напротив, наблюдается незначительное снижение выраженности аутоиммунной патологии почек. Возможно, выбранная доза, данная форма препарата ДНК или уровень метилирования использованной ДНК вызывают развитие иммунного ответа, что препятствует формированию толерантности.

## ВВЕДЕНИЕ.

Целью работы было изучение возможности с помощью оригинального препарата (фрагментированной ДНК лососевых рыб, иммобилизованной на полиэтиленгликоле низкой молекулярной массы) (далее – препарата) корректировать развитие аутоиммунной патологии - иммунокомплексного гломерулонефрита, индуцированного у экспериментальных животных хронической реакцией трансплантат против хозяина (РТПХ).

Хроническая реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) широко применяется для моделирования в эксперименте аутоиммунных заболеваний человека, что позволяет изучать механизмы формирования иммунопатологических процессов и разрабатывать схемы корректирующей терапии [Gleichmann E. et al., 1984; Murphy W.J. , 2000; Slayback D.L. et al., 2000 ]. Показано, что перенос лимфоцитов родительской линии DBA/2 гибридам C57Bl/6xDBA/2)F1 приводит к поликлональной активации В-лимфоцитов реципиента, продукции аутоантител разной специфичности, образованию многочисленных иммунных комплексов, их отложению в капиллярной сети клубочков и, в конечном итоге, к развитию у реципиентов аутоиммунного гломерулонефрита, который по ряду признаков аналогичен нефриту при системной красной волчанке (СКВ) [Kimura M. et Gleichmann E., 1987]. Хроническая РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57Bl/6xDBA/2)F1 может идти по двум направлениям, несмотря на генетическую идентичность животных (DBA/2xC57Bl/6)F1: у всех реципиентов развивается типичная хроническая РТПХ, о чём свидетельствуют спленомегалия и поликлональная активация В лимфоцитов при отсутствии атрофии тимуса, но аутоиммунный гломерулонефрит развивается только у части животных (*lupus*-реципиенты), у остальных мышей отсутствуют выраженные поражения почек (*nonlupus*-реципиенты) [Козлов В.А. с соавт., 2002]. Обнаружено, что реакция у *nonlupus*- и *lupus*-мышей идёт с доминирующим участием, соответственно, Th1- или Th2-субпопуляций [Власов В.В. с соавт., 2002; Кудаева О.Т. с соавт., 20056].

Возникновение аутоиммунной патологии вызывается нарушением процессов поддержания аутоотолерантности – состояния иммунологической ареактивности в отношении собственных антигенов. Показано, что формирование аутоиммунного поражения почек при хронической РТПХ в модели полуаллогенного переноса DBA/2→(C57Bl/6xDBA/2)F1 сопровождается появлением аутоантител к молекулам ДНК, представленных иммуноглобулинами класса IgG [Козлов В.А. с соавт., 2002; Morris S.C., 1990]. Считается, что именно активная продукция аутоантител и приводит к развитию

аутоиммунных патологий в данной и других аналогичных моделях; в частности, показано, что аутоантитела к dsДНК и ssДНК играют патогенетическую роль при формировании иммунокомплексного гломерулонефрита и служат диагностическим признаком развития системной красной волчанки, хотя прямая корреляция между уровнем аутоантител различной специфичности, в том числе и к ДНК, и развитием аутоиммунной патологии отсутствует [Ткачѐв В.О. соавт., 2006; Meziere C. et al., 1994; Maede T. et Nomoto K., 1995; Waldman M., Madaio M. P., 2005].

Толерантность к антигенам можно индуцировать различными способами; одним из них является пероральное введение антигена [Smith K.M. et al., 2000; Fujihashi K. et al., 2001; Wang J. et Toes R.E.M., 2008]. Механизм развития толерантности при пероральном введении зависит от дозы антигена. Высокие дозы антигена могут вызывать в конечном итоге гибель антигенспецифических клонов лимфоцитов; низкодозовая толерантность формируется с участием IL-10 и TGF $\beta$ , продуцируемых антигенспецифическими Th2-клетками кишечника и оказывающих неспецифическое супрессирующее действие на активность Th1-клеток, пролиферацию и функции В-клеток, цитотоксических Т-клеток и НК-клеток. В настоящее время этот способ – индукция толерантности путѐм перорального введения антигена – рассматривается как перспективный метод лечения аутоиммунных заболеваний [Faria A.M. et Weiner H.L., 2006].

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

### **Животные.**

В работе использовали мышей гибридов первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1, самок, в качестве реципиентов и мышей линии DBA/2, самок, в качестве доноров трансплантируемых полуаллогенных клеток. Животных получали из Экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). В опытах использовались мыши в возрасте 2-х месяцев. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Для исследования влияния препарата на развитие аутоиммунного гломерулонефрита формировали следующие группы экспериментальных животных:

1. Контроль 1 – интактные мыши.
2. Контроль 2 – мышам внутрижелудочно вводится физиологический раствор в объеме 0,2 мл на мышѐ в течение 14 дней.
3. Контроль 3 - мышам внутрижелудочно вводится препарат в дозе 10 мг/кг (в физиологическом растворе в объеме 0,2 мл) в течение 14 дней.

4. Контроль 4 - мышам внутрижелудочно вводится физиологический раствор в объеме 0,2 мл в течение 14 дней, после чего проводится индукция хронической РТПХ.
5. Опыт 1 - мышам внутрижелудочно вводится препарат в дозе 10 мг/кг (в физиологическом растворе в объеме 0,2 мл) в течение 14 дней, после чего проводится индукция хронической РТПХ.
6. Опыт 2 - мышам проводится индукция хронической РТПХ, после чего через 6 недель внутрижелудочно вводится препарат в дозе 10 мг/кг (в физиологическом растворе в объеме 0,2 мл) в течение 14 дней.
7. Опыт 3 - мышам проводится индукция хронической РТПХ, после чего через 3 месяца животным с развившимся аутоиммунным гломерулонефритом (*lupus*-реципиентам) проводится курс введения препарата в дозе 10 мг/кг (в физиологическом растворе в объеме 0,2 мл) в течение 14 дней; через 1 месяц курс лечения повторяется.

Группы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 используются для забора сыворотки. В случае обнаружения корригирующего эффекта препарата сыворотки могут быть использованы для дальнейшего анализа (определения титра аутоантител к ДНК).

Группы 4, 5 используются для изучения влияния препарата на возникновение аутоиммунной патологии (оценивается частота развития гломерулонефрита).

Группы 4, 6 используются для изучения влияния препарата на ранние стадии формирования аутоиммунного поражения (оценивается частота развития гломерулонефрита).

Группы 4, 7 используются для изучения возможности с помощью препарата корригировать сформировавшееся аутоиммунное поражение почек (оценивается уровень протеинурии у *lupus*-реципиентов).

#### **Индукция толерантности.**

Препарат вводили по схеме, используемой для индукции оральной толерантности [Chen Y. et al., 1996; Alpan O. et al., 2001].

#### **Реагенты.**

Среда RPMI-1640 (НПО «Вектор»); раствор Хенкса (НПО «Вектор»); физиологический раствор, забуференный фосфатным буфером pH=7.4 (PBS); бычий сывороточный альбумин (BSA) («Sigma»); краситель Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie); ортофосфорная кислота (J. T. Baker Inc.); уксусная кислота; 96-луночные круглодонные планшеты (Linbro).

**Выделение органов, тканей и клеток** выполняли по стандартным методикам [Гольдберг Е.Д. и др., 1992]. Мышей забивали дислокацией позвоночника, обрабатывали 70% этаноловым спиртом и помещали на анатомический столик. Селезёнку, лимфоузлы и тимус помещали во флакончики со средой, расстригали ножницами, многократно пропускали через шприц с иглой, фильтровали через металлическую сеточку и 3 раза

отмывали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин со сменой среды. Осадок клеток ресуспендировали в среде и подсчитывали их общее количество.

#### **Получение сыворотки и плазмы крови.**

Забор крови у мышей проводили следующими способами:

- из хвостовой вены прижизненно: мышам надрезали кончик хвоста, кровь забирали микропипеткой в количестве 5 мкл и переносили в пробирки с 200-кратным объёмом холодного физиологического забуференного раствора (PBS, pH 7.4); после тщательного перемешивания пробирки с раствором центрифугировали при 400g 10 мин для осаждения форменных элементов; образцы переносили в пластиковые микропробирки, замораживали и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  [Кудаева О.Т. с соавт., 2005a];
- из центральных сосудов при забое: ножницами декапитировали животное, кровь собирали в пробирку; оставляли на 1 час для свёртывания; после образования сгустка и осторожного его отделения от стенок центрифугировали при 400g 10 мин для отделения сыворотки; образцы сыворотки переносили в пластиковые микропробирки, замораживали и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Индукция хронической РТПХ.**

Хроническую РТПХ индуцировали у мышей путём переноса самкам (C57Bl/6xDBA/2)F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки лимфатических узлов, тимуса и селезёнки, выделенных ex tempore, в соотношении 1:3:6 внутривенно вводили реципиентам в дозе  $60-70 \times 10^6$  клеток двукратно с интервалом в 5 дней [Kimura M. et al., 1987]. В качестве контрольной группы использовали интактных животных того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте. Наличие поражения почек, сопровождающегося нарушением фильтрации и проявляющегося протеинурией, определяли по появлению белка в моче (в концентрации, превышающей 3 мг/мл), что коррелирует с развитием гломерулонефрита [Колесникова О.П. с соавт., 1991; Kimura M. et Gleichmann E., 1987].

#### **Определение белка в моче.**

Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий [Bradford M.M., 1976]. Реактив готовили следующим образом: 10 мг Кумасси (Kum Sai brilliant blue, Loba Feinchemie) растворяли в 5 мл  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . После полного растворения красителя добавляли 11,2 мл 70%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Общий объём доводили до 100 мл, фильтровали. Образцы мочи собирали в пластиковые пробирки, определение белка проводили немедленно после забора мочи. По 5 мкл мочи, разведённой в 5 раз в ЗФР, помещали в 2 лунки 96-луночного планшета, добавляли по 150 мкл красителя Кумасси, измеряли с помощью Titertec Multiskan, длина волны  $\lambda=570 \text{ nm}$ . Калибровочную

кривую строили по BSA (100-1000 мкг/мл), результаты (среднее двух измерений) выражали в мг/мл.

### Статистическая обработка.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием критерия Т (парный критерий Вилкоксона) для оценки различий в средних тенденциях для связанных выборок и  $\phi$ -критерия для сравнения выборочных долей вариант [Урбах В.Ю., 1963; Гублер Е.В., 1978;].

В таблицах отмечены достоверные различия ( $p < 0.05$ ): \* - между контрольной и опытной группой; # - между опытными группами.

### РЕЗУЛЬТАТЫ.

Хроническую РТПХ индуцировали в системе DBA/2  $\rightarrow$  (C57Bl/6xDBA/2)F1. Развитие аутоиммунного процесса в данной модели происходит в течение 6 - 12 недель и завершается формированием иммунокомплексного гломерулонефрита у части реципиентов; по истечении этого срока новые случаи возникновения у экспериментальных животных поражения почек не выявляются [Козлов В.А. с соавт., 2002; Кудяева О.Т. с соавт., 20056].

Для изучения возможного профилактического действия препарата оценивали его влияние при ведении до индукции хронической РТПХ. Влияние препарата на частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита определяли по относительному числу экспериментальных животных, у которых на фоне хронической РТПХ развивался аутоиммунный иммунокомплексный *lupus*-подобный гломерулонефрит (*lupus*-реципиенты). Введение реципиентам препарата по схеме, используемой для индукции оральной толерантности, перед трансплантацией полуаллогенных родительских клеток привело к увеличению доли *lupus*-реципиентов (табл.1).

Таблица 1. Частота развития *lupus*-нефрита, индуцированного хронической РТПХ, при введении препарата до полуаллогенной трансплантации.

группа	6 недель		10 недель		13 недель	
	n	%	n	%	n	%
РТПХ	12	8.3	12	8.3	12	8.3
РТПХ+препарат	12	25	11	72.7*	11	72.7*



Для изучения влияния препарата на развитие аутоиммунного гломерулонефрита на ранних стадиях формирования аутоиммунного поражения почек курс введения препарата по схеме, используемой для индукции оральной толерантности, проводили через 6 недель после индукции хронической РТПХ, когда у экспериментальных животных начинают появляться первые признаки поражения почек. Эффект оценивали по относительному числу экспериментальных животных, у которых на фоне хронической РТПХ развивался гломерулонефрит (*lupus*-реципиенты). Введение реципиентам препарата по схеме, используемой для индукции оральной толерантности, в этот период также привело к увеличению доли *lupus*-реципиентов (табл.2).

Таблица 2. Частота развития *lupus*-нефрита, индуцированного хронической РТПХ, при введении препарата в ранние сроки проявления заболевания.

группа	6 недель		10 недель		13 недель	
	n	%	n	%	n	%
РТПХ	12	8.3	12	8.3	12	8.3
РТПХ+препарат	10	10.0	10	40.0*	10	40.0*

Для изучения возможного корригирующего эффекта препарата на уже сформировавшуюся аутоиммунную патологию введение препарата по схеме, используемой для индукции оральной толерантности, проводили через 12 недель после полуаллогенной трансплантации только тем экспериментальным животным, концентрация белка в моче у которых превышала значение 3 мг/мл (*lupus*-реципиентам). Через месяц курс введения препарата повторили в той же дозе и по той же схеме. Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Табл.3. Уровень протеинурии у *lupus*-реципиентов при введении препарата.

№ животного	Концентрация белка в моче в мг/мл (%)		
	Исходная	После 1-курса	После 2-го курса
1	4.9	3.2	2.8
2	4.7	4.5	Пала
3	3.9	3.6	3.9
4	4.4	3.8	Пала
5	4.7	4.4	4.3
6	4.9	4.3	4.3
7	4.7	4.7	3.7

8	4.4	4.8	4.3
Среднее значение	4.58 (4.58)	4.16 (4.17)	3.88*

Примечание: в скобках указаны данные для группы из 6 мышей (исключены №2 и №4).

Табл.4. Динамика протеинурии у *lupus*-реципиентов при введении препарата.

№ животного	Изменение в % к исходному значению	
	После 1-го курса	После 2-го курса
1	-35	-43
2	-4	-
3	-8	0
4	-14	-
5	-6	-8
6	-12	-12
7	0	-21
8	+9	-2
Среднее значение	-8.8	-14.3

Полученные результаты демонстрируют, что введение препарата в использованной дозе по выбранной схеме индукции оральной толерантности увеличивает вероятность развития аутоиммунного поражения почек, индуцированного хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2→(C57Bl/6хDBA/2)F1. Стимулирующее влияние препарата на развитие аутоиммунных реакций зависит от того, на какой стадии формирования аутоиммунного процесса он вводится. Максимальное действие наблюдается при введении препарата до полуаллогенной трансплантации, влияние снижается при введении препарата в период, когда начинают проявляться признаки поражения почек, то есть когда процессы, приводящие к патологии, уже имеют место, и эффект усиления отсутствует, когда гломерулонефрит полностью сформировался. В последнем случае наблюдается некоторое снижение выраженности патологического процесса, что проявляется в небольшом, но достоверном уменьшении концентрации белка в моче *lupus*-реципиентов после 2-кратного курса введения препарата.

Таким образом, использованная доза препарата в данной схеме введения не привела к формированию (или восстановлению) толерантности к ДНК. Более того, по-видимому, введение препарата индуцировало иммунный ответ на ДНК, что привело к увеличению частоты *lupus*-нефрита на фоне хронической РТПХ. В общем случае ДНК слабо иммуногенна, но, возможно, выбранная доза, данная форма препарата ДНК или уровень метилирования использованной ДНК способствовали развитию иммунного ответа [Wen Z.K. et al., 2007; Zang Q. et al., 2010].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры тканей в гематологии. – Томск, 1992. - 272с.
2. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – М.: Медицина, 1978. - 296с.
3. Козлов В.А., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. и др. Th1- и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина // Иммунология. - 2002. – N.3. - С.143-146.
4. Колесникова О.П., Кудаева О.Т., Логинов М.В. и др. Показатели эритро- и иммунопоза в развитии аутоиммунного заболевания, индуцированного РТПХ // Вестник АМН. - 1991. – N.12. -С.13 -16.
5. Кудаева О.Т., Ненашева Е.В., Козлов В.А. Определение содержания иммуноглобулинов в цельной крови// Иммунология. – 2005а. - №3. – С.189-191.
6. Кудаева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П. и др. Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина // БЭБиМ. – 2005б. – №9(140). – С. 325-327.
7. Ткачев В.О., Ненашева Е.В., Гойман Е.В. и др. Уровень аутоантител к ДНК и метаболическая активность полиморфноядерных лейкоцитов в динамике хронической реакции трансплантат против хозяина.// Иммунология. – 2006. – № 2. – С. 98 - 101.
8. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. – М.: Из-во академии наук СССР, 1963. – 324 с.
9. Alpan O., Rudomen G., Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses.// J.Immunol. – 2001. – V.166. – P.4843-4852.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. – 1976. – V.72. – P.248-254.
11. Chen Y., Inobe J.-I., Kuchroo V.K. et al. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: Suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 1996. – V.93. – P.388-391.
12. Faria A.M., Weiner H.L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases.// Clinical @ Developmental Immunology. – 2006. – V.13. – P.143-157.

13. Fujihashi K., Dohi T., Rennert P.D. et al. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins.//PNAS.- 2001. – V.98. – P.3310-3315. M
14. Gleichmann E., Pals S.T., Rolink A.G. et al. Graft-versus-host reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases // Immunol. Today. – 1984. – Vol. 5. – P. 324-332.
15. Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host disease // Clin. Exp. Immunol. - 1987. - Vol. 69. - P. 385-393.
16. Maeda T., Nomoto K. Anti-T cell receptor antibody treatment of mice with lupus-like graft versus host disease: suppression of glomerulonephritis without reduction in anti-DNA antibody levels // J. Rheumatol. – 1995. – Vol. 22. – № 12. – P. 2259-2265
17. Meziere C., Stockl F., Batsford J. et al. Antibodies to DNA, chromatin core particles and histones in mice with GvHD and their involvement in glomerular injury.// Clin.Exp.Immunol. – 1994. – V.98. – P.287-294.
18. Murphy W.J. Revisiting graft-versus-host disease models of autoimmunity: new insights in immune regulatory processes. // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106, N 6. – P. 745-747.
19. Slayback D.L., Dobkins J.A., Harper J.M. et al. Genetic factors influencing the development of chronic graft-versus-host disease in a murine model // Bone Marrow Transplantation. – 2000, - V,26. – P.931-938.
20. Smith K.M., Eaton A.D., Finlayson L.M. et al. Oral tolerance.// Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2000. – V.162. – P.S175-S178.
21. Waldman M., Madaio M. P. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis.// Lupus. - 2005. - Vol.14. - P. 19- 24.
22. Wang J., Toes R.E.M. Mechanisms of oral tolerance revisited.// Arthritis Research @ Therapy. – 2008. – V.10. – P.108-109.
23. Wen Z.K., Xu W., Xu L. et al. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice.//Rheumatology. – 2007. – V.46. – P.1796-1803.
24. Young J.A. Infectious complications of acute and chronic GVHD. // Best Pract. Res. Clin. Haematol. – 2008. – V.21. – P.343-356.
25. Zang Q., Raoof M., Chen Y. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury.//Nature. – 2010. – V.464. – P.104-107.