

О.П. Колесникова, **О.Т. Кудяева**, Н.Н. Вольский, Е.В. Гойман, Е.Д. Гаврилова, О.М. Перминова,
Е.Н. Демченко, В.А. Козлов

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Российская Федерация

Экспериментальная модель аутоиммунного процесса: роль эпигенетической изменчивости в популяции мышей-гибридов

В генетически однородной популяции мышей (гибриды F1) при индукции СКВ-подобного заболевания на основе реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) выявляются клинические фенотипы *lupus+* (гемолитическая анемия + иммунокомплексный гломерулонефрит) и *lupus-* (гемолитическая анемия). Механизм развития фенотипической гетерогенности обусловлен поляризацией T-хелперного (T_{x1}/T_{x2}) иммунного ответа: преимущественной активацией T_{x1} (*lupus-*) или T_{x2} популяции лимфоцитов (*lupus+*). **Цель исследования:** оценить возможность использования экспериментальной модели аутоиммунного заболевания для изучения и тестирования эпигенетических модификаций, сдвигающих T_{x1}/T_{x2} баланс *in vivo*. **Методы:** хроническую РТПХ индуцировали введением B6D2F1 мышам-гибридам 130×10^6 клеток селезенки от родителя DBA/2. Антитела к ДНК, IgG1, IgG2a-подклассам IgG и общий IgG оценивали с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты:** 6–8-недельные самки мышей DBA/2 и B6D2F1 получены из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных (Новосибирск). Установлено, что продолжительные регулярные физические нагрузки умеренной интенсивности (плавание без груза) сдвигают баланс T_{x1}/T_{x2} у реципиентов в сторону T_{x1} , т.е. в популяции достоверно уменьшается доля мышей *lupus+* (с 57 до 26%; $p < 0,001$), у которых достоверно снижается степень выраженности гипергаммаглобулинемии (с 2,8 до 2,0 мг/мл; $p < 0,047$) и титр антител к ДНК (от 0,18 до 0,12 OD; $p = 0,05$). Введение в низких дозах эпигенетического модификатора бисфенола А, имитирующего действие эстрогенов, не только увеличивает долю мышей *lupus+* (с 33 до 64%; $p < 0,001$), но и утяжеляет их состояние: концентрация белка у них достоверно повысилась (с 2,8 до 4,2 мг/мл; $p < 0,001$). **Заключение:** эпигенетические изменения в иммунной системе, сформировавшиеся на предыдущих этапах онтогенеза у мышей-гибридов и связанные с условиями лабораторного содержания животных (двигательная активность, эндокринный статус), по-видимому, определяют соотношение активностей T_{x1} и T_{x2} субпопуляций, контролирующее выбор варианта, по которому пойдет развитие иммунного процесса в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: *lupus-нефрит*, поляризация T_{x1}/T_{x2} , эпигенетические изменения.

(Для цитирования: Колесникова О.П., [Кудяева О.Т.], Вольский Н.Н., Гойман Е.В., Гаврилова Е.Д., Перминова О.М., Демченко Е.Н., Козлов В.А. Экспериментальная модель аутоиммунного процесса: роль эпигенетической изменчивости в популяции мышей-гибридов. Вестник РАМН. 2015; 70 (2): 152–158. Doi: 10.15690/vramn.v70i2.1307)

152

О.П. Kolesnikova, **О.Т. Kudaeva**, N.N. Volsky, E.V. Goiman, E.D. Gavrilova, O.M. Perminova,
E.N. Demchenko, V.A. Kozlov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

The Experimental Model of Autoimmune Process: the Role of Epigenetic Variation in the Population of Mice Hybrids

Background: At the development of graft versus host disease in genetically homogeneous population of (C57Bl/6 x DBA/2) F1 mice two clinical phenotypes of SLE-like disease were revealed: *lupus+* (immune complex glomerulonephritis and hemolytic anemia) and *lupus-* (hemolytic anemia). The GvHD phenotypic heterogeneity is determined by the T_{h1}/T_{h2} -polarization: T_{h2} lymphocyte predominant activity, leads to the *lupus+* development, or prevalence activity of T_{h1} cells, leads to the *lupus-* development. **Objective:** Our aim was to evaluate the possibility of using an experimental model of autoimmune disease for studying and testing of epigenetic modifications, shifting T_{h1}/T_{h2} -balance *in vivo*. **Methods:** Chronic GVHD was induced in B6D2F1 mice by the transplantation of 130×10^6 parental DBA/2 splenocytes. Anti-ds-DNA, total IgG and IgG1, IgG2a Abs were measured by ELISA. **Results:** Six- to 8-week-old female DBA/2 and B6D2F1 mice were obtained from Biological Research Laboratory (Novosibirsk). It was established that regular moderate physical activity (unloaded swimming) shifted T_{h1}/T_{h2} balance towards T_{h1} . This leads to a decrease in a population of recipients the *lupus+* mice from 57 to 26% ($p < 0,001$) with significantly reduced hypergamaglobulinemia (IgG from 2,8 to 2,0 mg/ml; $p < 0,047$) and DNA antibodies titer from 0,18 to 0,12 OD ($p = 0,05$). Administration of epigenetic modifier bisphenol A at low doses, which mimicking estrogen effects, enhances the proportion of *lupus+* mice in experimental groups from 33 to 64% ($p < 0,001$) and impairs their clinical status by the increasing the urine protein level from 2.8 to 4,2 mg/ml ($p < 0,001$) in animals. **Conclusion:** T_{h1}/T_{h2} -balance presumably is determined by the immune system epigenetic modification in the experimental mice, formed on the previous stages of ontogeny and defines the direction of immune processes development in individual animal.

Key words: *experimental model*, *lupus-nephritis*, polarization T_{h1}/T_{h2} , epigenetic changes.

(For citation: Kolesnikova O.P., [Kudaeva O.T.], Volsky N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. The Experimental Model of Autoimmune Process: the Role of Epigenetic Variation in the Population of Mice Hybrids. Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 70 (2): 152–158. Doi: 10.15690/vramn.v70i2.1307)

Обоснование

Моделирование расстройств иммунитета, в т.ч. СКВ-подобного заболевания, на основе индукции реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) — иммунной реакции клеточного типа в условиях тканевой несовместимости донора и реципиента — широко используется в экспериментальных целях [1]. Концепция поляризации иммунного ответа, рассматривающая баланс Т-клеток-хелперов (T_{x1}/T_{x2}) в качестве базисного параметра регуляции иммунных процессов [2], оказалась плодотворной при изучении регуляции иммунитета как в нормальных физиологических условиях, так и при иммунопатологических состояниях (аутоиммунные расстройства, иммунные конфликты при беременности). Накапливается все больше данных о дисбалансе T_{x1}/T_{x2} , обусловленном преимущественной дифференцировкой этих субпопуляций лимфоцитов в том или другом направлении, связанном с нарушениями эпигенетических механизмов при дифференцировке наивных CD4+ Т-клеток в T_{x1} и T_{x2} при аутоиммунных, аллергических болезнях. Так, например, у больных системной красной волчанкой (СКВ) преимущественная дифференцировка клеток в T_{x2} коррелирует с глобальным гипометилированием ДНК [3]; при астме сдвиг баланса в сторону T_{x2} коррелирует с гипометилированием ДНК, увеличением ацетилирования гистонов и повышенной экспрессией генов интерлейкинов (ИЛ) 4, 5 и 13 [4].

Одним из ярких примеров того, как эпигенетические механизмы в физиологических условиях используются для регулирования экспрессии генов в постнатальном периоде, являются CD4+ Т-лимфоциты — семейство клеток, состоящее из наивных предшественников и эффекторных подтипов (T_{x1} , T_{x2} , T_{x17} , $T_{рег}$). Поскольку наивные CD4+ Т-клетки дифференцируются в T_{x1} или T_{x2} , секретирующие, соответственно, интерферон (ИФН) γ или ИЛ 4, то экспрессия гена одного цитокина и перманентное подавление другого организованы при помощи эпигенетических механизмов [5].

При индуцировании экспериментальной модели СКВ-подобного заболевания на основе хронической РТПХ (хРТПХ) в полуаллогенной системе DBA/2→C57Bl/6хDBA/2)F1 нами было обнаружено возникновение иммунодефицита и других классических признаков болезни «трансплантат против хозяина» у всех реципиентов [6]. В то же время формирование аутоиммунной патологии (иммунокомплексного гломерулонефрита, в патогенезе которого T_{x2} играют центральную роль) наблюдали только у части животных. Используемые в наших опытах экспериментальные животные представляют собой генетически однородную группу (гибриды первого поколения от скрещивания чистых линий); трансплантируемые клетки идентичны в каждом опыте для всех реципиентов; условия содержания до переноса клеток, процедура трансплантации клеток и дальнейшее содержание животных постоянны и одинаковы. Тем не менее в эксперименте хРТПХ развивается по двум направлениям: у части мышей формируется вариант болезни с иммунокомплексным люпусоподобным гломерулонефритом, в то время как у других наблюдается клиническая картина без признаков гломерулонефрита. Во многих случаях, несмотря на стандартные условия экспериментов, обнаруживается некоторая гетерогенность результатов, что часто относят на счет несовершенства методик или их проведения. Однако, данные, полученные нами в опытах с хРТПХ, позволяют предположить, что по крайней мере часть такой гетерогенности может объясняться теми

эпигенетическими изменениями в организме лабораторных животных, которые возникли у них в период, предшествующий эксперименту. В настоящее время относительно лабораторных животных формируется взгляд, учитывающий, что, несмотря на исходную генетическую идентичность, животные в процессе онтогенеза под действием различных факторов внешней среды приобретают стабильные отличающиеся признаки посредством эпигенетических механизмов [7]. Результаты, полученные нами на модели РТПХ-индуцированного СКВ-подобного заболевания, являются одним из экспериментальных подтверждений перспективности такого взгляда на сочетание генетических и эпигенетических механизмов, обуславливающих исходную гетерогенность интактных лабораторных животных.

Целью данного исследования было оценить возможность использования экспериментальной модели аутоиммунного заболевания для изучения и тестирования эпигенетических модификаций, сдвигающих T_{x1}/T_{x2} баланс *in vivo*.

Методы

Дизайн исследования

Нерандомизированное контролируемое перекрестное исследование.

153

Критерии соответствия

В опыт были включены здоровые половозрелые 6–8-недельные мыши, содержащиеся в виварии в условиях, соответствующих требованиям эксперимента. Мыши получали комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах в рациональных дозах.

Условия проведения

Все эксперименты проводили в стандартных условиях соблюдения содержания животных, температурного режима, освещенности. Мышей выводили из эксперимента дислокацией позвоночника.

Продолжительность исследования

Продолжительность исследования составила 2,5 года (с 2011 по 2014 г.).

Исходы исследования

Исходом исследования являлось получение модели СКВ-подобного заболевания на основе индукции хронической РТПХ с последующим взятием крови в заданные интервалы времени.

Методы регистрации исходов

РТПХ у мышей индуцировали путем переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 [8]. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie, Австрия) на Titertek Multiscan (Финляндия), длина волны $\lambda = 570$ нм. В опытах использовали мышей со стойкой протеинурией и содержанием белка 3 мг/мл и более (белок в моче определяли неоднократно). Проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование почек [9]. Концентрацию IgG в периферической крови, содержание подклассов IgG и антител к ДНК в сыворотке крови определяли твердофазным методом иммуноферментного анализа в 96-луночных плоскодонных

Таблица. Характеристика гетерогенности мышей с СКВ-подобным синдромом

Параметры	T _{x2}	T _{x1}
Белок в моче Критерий ≥3 мг/мл	3,0–10,0	0–1,5
Морфология почек по шкале М. Mugasani и соавт. [11]	3,5	1
Спленомегалия	+++	+
Поликлональная активация В-лимфоцитов (гипергаммаглобулинемия)	+++	+
Концентрация IgG в сыворотке через 6 мес	+++	+
Антитела к ДНК	+++	+
Иммунный ответ на Т-зависимый антиген	–	–
IgM, IgG	↓	↓↓↓
Гиперчувствительность замедленного типа	↓	N
Соотношение IgG1/IgG2a	↑	↓
Уровень холестерина	↑↑↑	N
Клинические фенотипы:	Гемолитическая анемия+, иммунокомплексный гломерулонефрит	Гемолитическая анемия

планшетах (E.I.A. Linbro, США). Содержание кортикостерона в сыворотке крови мышей определяли методом конкурентного белкового связывания с использованием 3H-кортикостерона и транскортина. Концентрацию тестостерона, прогестерона и кортикостерона в высушенных экскрементах определяли радиоиммунным методом с использованием меченных 3H препаратов соответствующего гормона (Amersham, США) и специфических антител (Sigma, США). Экстракцию стероидов проводили этиловым эфиром [10].

Этическая экспертиза

Экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с требованиями Международной конвенции по гуманному обращению с подопытными животными (Страсбург, 1986), а также Приказом МЗ РФ № 257 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 г.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Вилкоксона и теста Манна–Уитни. Предварительный анализ вариационных рядов выявил асимметричность распределения признаков. Данные представлены в виде медианы (Me). Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты

Объект исследования

В работе использовали мышей-гибридов первого поколения (C57Bl/6xDВА/2)F1 (B6D2F1) — самок; мышей линий ДВА/2 — самок, полученных из Экспериментально-биологической клиники лабораторных животных (Новосибирск). В опытах принимали участие мыши в возрасте 2–8 мес. Все животные были распределены на группы: 2 контрольные группы — интактный (B6D2F1 мыши-гибриды) и положительный контроль (сингенный перенос — перенос клеток селезенки от B6D2F1 → B6D2F1); 2 опытные группы — с индукцией РТПХ (полуаллогенный перенос — перенос клеток селезенки от ДВА/2 → B6D2F1), и воздействием в момент индукции РТПХ (плавание и введение бисфенола А).

Основные результаты исследования

На основании данных литературы и собственных результатов основным диагностическим критерием развития гломерулонефрита в нашей модели было выбрано стойкое наличие белка в моче более 3 мг/мл, которое определялось у животных к 10–12-й нед после индукции хРТПХ. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование почек подтвердило существование взаимосвязи между уровнем протеинурии и степенью поражения почек в разные периоды заболевания. Так, на ранних сроках (2–3 мес) заболевания при уровне белка в моче 0,3 мг/мл наблюдаются минимальные изменения почечной паренхимы (слабая пролиферация мезангиальных клеток, пылевидные отложения IgG в почечных клубочках, незначительная белковая дистрофия канальцевого эпителия). В эти же сроки заболевания, но при протеинурии 3 мг/мл имеет место другая картина: выражена пролиферация мезангиальных клеток, базальная мембрана капиллярных петель утолщена, появляется запустевание капиллярных петель, нодулярный склероз, склероз отдельных клубочков, резко выражена белковая дистрофия эпителия извитых канальцев; отложения IgG в почечных клубочках носят линейно-глобчатый характер. При протеинурии более 3 мг/мл на 6–7-м мес болезни в почечной ткани преобладают грубые склеротические изменения.

В дальнейшем мы формировали группы животных, основываясь на этом значении концентрации белка в моче: брали в эксперимент мышей со стойкой протеинурией (lupus+, концентрация белка ≥3 мг/мл при трехкратном определении с интервалом 1 нед) и без протеинурии, т.е. когда содержание белка в моче было на уровне контрольной интактной группы (lupus-). Для характеристики обнаруженной гетерогенности среди реципиентов в дальнейшем оценивали частоту развития lupus-нефрита и проводили сравнительное изучение параметров иммунной системы у групп lupus- и lupus+.

Установлено, что перенос мышам B6D2F1 лимфоидных клеток мышей родительской линии ДВА/2 приводит к развитию у всех реципиентов хРТПХ, о чем свидетельствует наличие характерных для нее признаков: спленомегалия, гипергаммаглобулинемия, продукции аутоантител к ДНК при отсутствии выраженной атрофии тимуса. Однако течение этой реакции отличается у изучаемых групп: у мышей lupus+ показатели параметров демонстрировали более выраженные изменения; только в этой группе в тимусе определялась выраженная плазмоцитарная реакция, характерная для аутоиммунных состояний.

Наблюдали отличия и в динамике образования аутоантител к ДНК: в группе мышей, у которых впоследствии развился *lupus*-нефрит, высокие титры антител к ДНК определялись на ранних стадиях и на 2-м мес уже снижались, тогда как в группе мышей *lupus*- в это время имело место только нарастание титров, которые не достигали уровня, определяемого у мышей *lupus*+ на пике ответа. Разные варианты течения хРТПХ приводят к разным клиническим исходам, что было подтверждено морфологическим исследованием почек: степень выраженности поражения органа, оцененная по балльной шкале, у мышей *lupus*- соответствует 1 баллу, у мышей *lupus*+ — 3,5 баллам (табл.).

Изучение основных параметров иммунной системы мышей *lupus*- и *lupus*+ показало, что развитие хРТПХ сопровождается подавлением первичного иммунного ответа на Т-зависимый антиген — эритроциты барана. При этом в группе *lupus*+ наблюдается снижение как клеточных, так и гуморальных реакций, тогда как у животных группы *lupus*- более выражено подавление продукции антител при сохраненном уровне клеточного ответа (см. табл.). Поскольку у *lupus*+ мышей наблюдалась супрессия Т-клеточных реакций, мы предположили, что в группах *lupus*- и *lupus*+ преимущественно активированы разные субпопуляции хелперных Т клеток, принимающих активное участие в индукции и развитии хРТПХ (соответственно, T_{x1} клетки в первом случае и T_{x2} — во втором). Определение соотношения подклассов иммуноглобулинов IgG_1/IgG_{2a} у реципиентов в динамике развития хРТПХ выявило различия между двумя опытными группами, которые нарастали с течением времени. У *lupus*+ реципиентов было зарегистрировано увеличение относительной продукции T_{x2} -зависимого подкласса IgG_1 по сравнению с мышами *lupus*-, что свидетельствует о преимущественной активации при этом варианте T_{x2} клеток. Соотношение подклассов у мышей *lupus*- оказалось ниже, чем в контроле (сыворотки от интактных мышей B6D2F1), что предполагает доминирующее влияние T_{x1} клеток.

Характерным симптомом, возникающим у мышей *lupus*+ и отсутствующим в группе мышей *lupus*-, было значительное увеличение концентрации холестерина в сыворотке крови, что соответствует аналогичному изменению этого биохимического показателя у больных СКВ. Гиперхолестеринемия развивалась у мышей *lupus*+ одновременно с появлением протеинурии и сохранялась, постепенно снижаясь, на протяжении многих месяцев (рис. 1).

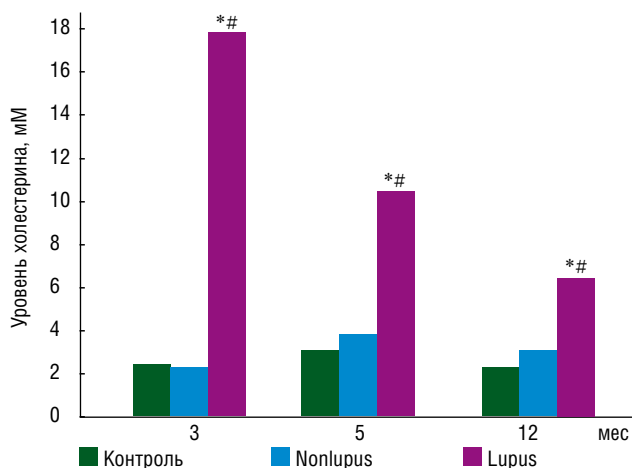


Рис. 1. Концентрация холестерина в сыворотке крови у мышей в различные сроки после индукции хронической РТПХ.

Примечание. * и # — достоверные отличия ($p < 0,05$) от контроля и группы *lupus*-, соответственно.

У мышей обеих групп по мере развития хРТПХ обнаруживалось увеличение содержания свободной ДНК в плазме крови. К моменту окончательного формирования групп *lupus*- и *lupus*+ на сроке 3 мес от начала индукции хРТПХ у мышей *lupus*- концентрация свободной ДНК возросла в 1,4 раза, у мышей *lupus*+ — в 2,2 раза относительно контрольных значений (рис. 2).

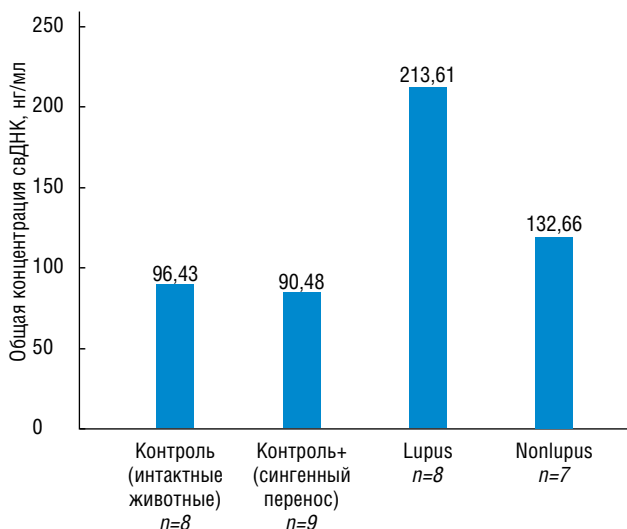


Рис. 2. Содержание свободной ДНК в плазме крови мышей BDF1 через 3 мес после индукции хронической РТПХ.

Примечание. Статистических изменений не выявлено ($p > 0,05$).

Из множества причин, способных вызывать стойкие сдвиги T_{x1}/T_{x2} баланса и приводить к фенотипической разнородности исходов развивающегося иммунопатологического процесса, мы исследовали самые, на наш взгляд, вероятные в условиях стандартного лабораторного содержания животных: двигательную активность и эндокринный статус. Для выяснения вопроса о разном уровне двигательной активности как одной из возможных причин, определяющих особенности поляризации T_{x1}/T_{x2} , предварительно было изучено влияние регулярных физических нагрузок средней интенсивности (плавание без груза в течение 1, 2 и 4–5 ч), но с минимальным стрессующим эффектом на состояние иммунной системы. Исследования проводили после того, как животные привыкали к процедуре, т.е. не ранее чем через 1–2 мес. Не было обнаружено достоверного повышения концентрации кортикостерона в периферической крови животных, подвергавшихся плаванию в течение 2 ч 5 раз/нед на протяжении 2–3 мес (у контрольных мышей содержание кортикостерона составило 35,0 нг/мл, у мышей-пловцов — 35,5 нг/мл). Мышей-самок B6D2F1 подвергали ежедневному плаванию в течение продолжительного периода: по 2 ч 5 дней в неделю на протяжении 2–3 мес до индукции и 3 мес — после индукции хРТПХ. Оказалось, что регулярное продолжительное плавание снижает вероятность формирования аутоиммунной патологии в процессе развития хРТПХ (рис. 3). Помимо общего снижения (более чем в 2 раза) доли *lupus*+ реципиентов и, соответственно, снижения уровня протеинурии при регулярных физических тренировках умеренной интенсивности (3,86 мг/мл у мышей с хРТПХ и 2,48 мг/мл у мышей с хРТПХ при физических нагрузках; $p < 0,035$) отмечалось достоверное уменьшение гипергаммаглобулинемии (концентрация общего IgG снизилась с 2,8 до 2,0 мг/мл; $p < 0,047$) и паде- ние титра антител к ДНК у *lupus*+ пловцов по сравнению

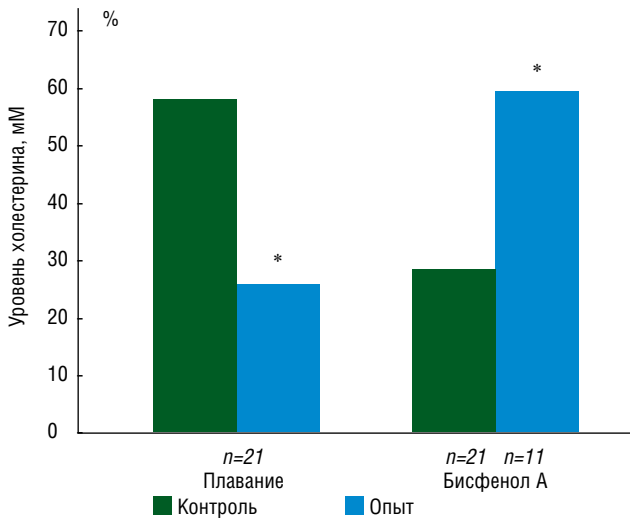


Рис. 3. Частота развития lupus-нефрита у мышей после физических нагрузок и введения бисфенола *per os*.
Примечание. * — достоверные отличия ($p < 0,05$) от контроля.

с lupus+ мышами без регулярных физических тренировок (с 0,18 до 0,12 OD; $p = 0,05$).

Для характеристики эндокринного статуса реципиентов проводили морфологическое изучение надпочечников lupus- и lupus+ мышей в конце эксперимента (6 мес после индукции хРТПХ). Данные морфометрического исследования надпочечников позволяют считать, что группа lupus+ характеризуется усиленной (по сравнению с lupus-) продукцией глюкокортикоидных и половых гормонов в течение предшествующего периода, когда происходило развитие хРТПХ и формирование lupus-нефрита. Сравнение уровня развивающейся впоследствии протеинурии и концентрации кортикостерона в сыворотке крови опытных мышей демонстрирует корреляцию, но она не достигает уровня статистической значимости ($r = 0,54$; $p > 0,05$).

Поскольку процедура прижизненного взятия достаточного большого объема периферической крови (200–300 мкл) является травмирующей и стрессирующей для таких мелких животных, как мыши, в дальнейшем мы определяли содержание гормонов в высушенных фекалиях, что, учитывая роль кишечника как основного пути выведения продуктов метаболизма нейтральных стероидов у

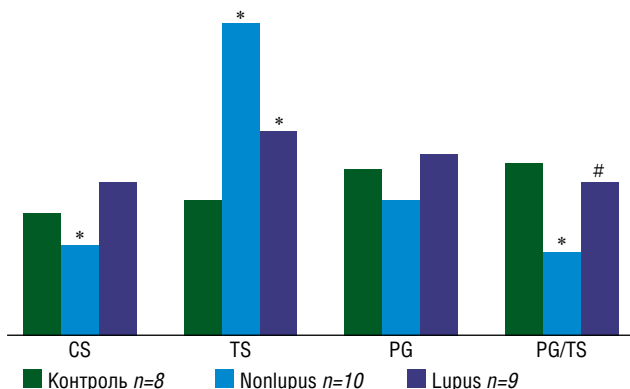


Рис. 4. Содержание гормонов у мышей с СКВ-синдромом.
Примечание. Представлены концентрации кортикостерона (CS), тестостерона (TS) и прогестерона (PG). Абсолютные значения концентраций разных гормонов и отношение уровней прогестерона и тестостерона даны в разном масштабе, чтобы сравнить степень их изменения в пределах одного рисунка. * и # — достоверные отличия ($p < 0,05$) от контроля и группы lupus-, соответственно.

грызунов, адекватно отражает их содержание в организме. Значение содержания гормонов при этом демонстрирует не их одномоментную концентрацию, как в случае определения содержания в периферической крови, а средний уровень на протяжении 12 ч. Полученные результаты (рис. 4) свидетельствуют о выраженных отличиях гормонального статуса lupus- и lupus+ реципиентов. Первые характеризуются сниженным содержанием кортикостерона и более низким отношением уровня женских половых гормонов к мужским. Обращает на себя внимание резкое повышение концентрации тестостерона у животных с хРТПХ по сравнению с контрольной группой. Группа lupus+ отличается также повышенным соотношением женских половых стероидов по отношению к мужским. Как видно из рис. 3, введение низких доз бисфенола А (2,5 мкг/кг) *per os* мышам-реципиентам в течение первых 2 нед после индукции хРТПХ увеличивало частоту развития гломерулонефрита до 63,6% по сравнению с 33,3% в контрольной группе ($p < 0,001$). При этом утяжеляется состояние животных: протеинурия у них достоверно увеличивается с 2,8 до 4,2 мг/мл ($p < 0,001$).

Обсуждение

При воспроизведении описанного в литературе метода индукции экспериментальной модели СКВ-подобного заболевания на основе хРТПХ установлено, что, несмотря на стандартные условия проведения реакции, генетическую однородность реципиентов, формирование аутоиммунной патологии — иммунокомплексного гломерулонефрита — воспроизводится только у части животных. Более того, при введении клеток селезенки от донора реципиенту в полуаллогенной системе — от родителя DBA/2 потомству, гибридам первого поколения (C57Bl/6xDBA/2)F1 — у животных обнаруживаются различные клинические проявления, обозначенные как lupus- и lupus+ и, соответственно, связанные с превалирующей активностью T_{x1} или T_{x2} субпопуляций. Интересно отметить, что в отдельных статьях указано на то, что процент формирования lupus-нефрита в экспериментах редко достигал 100%; в некоторых случаях для увеличения процента нужной патологии прибегали к использованию дополнительных усиливающих воздействий [12]. Однако в ходе экспериментов «неудачные» реципиенты просто удаляются из опытной группы и не изучаются далее. При попытке использовать таких «неудачных» реципиентов в качестве своеобразного дополнительного контроля мы обнаружили, что на самом деле иммунопатологический процесс развивается и у этих животных, но идет каким-то особым путем. Поскольку у lupus+ мышей, в отличие от lupus-, имела место супрессия Т-клеточных реакций, мы предположили, что в опытных группах lupus- и lupus+ преимущественно активированы разные субпопуляции Т-хелперных клеток, принимающих активное участие в индукции и развитии хРТПХ (соответственно, T_{x1} клетки в первом случае и T_{x2} — во втором). Учитывая, что содержание в сыворотке крови цитокинов, продуцируемых этими клетками, подвержено большим колебаниям, зависит от многих факторов и может не отражать активацию той или другой субпопуляции при однократном измерении, для проверки данного предположения было изучено соотношение подклассов IgG сыворотки крови реципиентов как интегральный показатель активации T_{x1} или T_{x2} лимфоцитов, т.к. известно, что T_{x1} -зависимый иммунный ответ характеризуется увеличением содержания IgG_{2a}, тогда как продукция T_{x2} цитокинов сопровождается повышением концентрации IgG₁ [13]. Эти

данные, а также характер изменения соотношения подклассов IgG в сторону T_{x1} -зависимого подкласса IgG_{2a} в группе lupus- и в сторону T_{x2} -зависимого подкласса IgG_1 в группе lupus+ позволяют сделать вывод о сдвиге баланса T клеток-хелперов при индукции хРТПХ в сторону T_{x1} в случае lupus- варианта и в сторону T_{x2} — в случае lupus+. Главное отличие по иммунным параметрам у мышей lupus- и lupus+ — разное соотношение T_{x1}/T_{x2} субпопуляций — представлено клиническими фенотипами: у мышей lupus- выявляется только гемолитическая анемия, у мышей lupus+ — гемолитическая анемия в сочетании с иммунокомплексным гломерулонефритом [14].

Нарушения холестерина метаболизма, обнаруженные только у мышей lupus+, могут быть обусловлены, по нашему предположению, снижением активации ядерных рецепторов LXR (liver X ресептор) при поглощении клетками больших количеств иммунных комплексов. Как было установлено [15], фагоцитоз иммунных комплексов клетками приводит к подавлению в них активности холестерол-27-гидроксилазы — фермента, продуцирующего основной физиологический лиганд LXR. Поскольку LXR играют ключевую роль в регуляции обмена холестерина в организме, уменьшение степени их активации в результате низкой концентрации лиганда может приводить к нарушениям обмена холестерина и гиперхолестеринемии. Таким образом, предполагается, что как развитие аутоиммунного гломерулонефрита, так и гиперхолестеринемия у мышей lupus+ обусловлены одной и той же причиной — резким возрастанием продукции аутоантител и повышением содержания иммунных комплексов, отлагающихся в тканях. У мышей lupus- количество образующихся иммунных комплексов существенно ниже, и потому данные симптомы не развиваются. Увеличенное содержание свободной ДНК у мышей lupus+ и lupus- в экспериментальной модели находит подтверждение у больных СКВ. У больных в отличие от здоровых лиц найден ряд аномалий количества и эпигенетического статуса ДНК: определяется повышенная концентрация экстрацеллюлярной ДНК, которая представлена в виде фрагментированной, некротической ДНК, выявляется ДНК в составе иммунных комплексов, в IgG-связанной фракции плазмы крови, гипометилированная апоптотическая ДНК, что позволяет связать эти изменения с патологическими процессами в иммунной системе и органах-мишенях [16]. Достоверное уменьшение доли lupus+ реципиентов, а также достоверное снижение уровня протеинурии, гипергаммаглобулинемии и падение титра антител к ДНК у lupus+ пловцов по сравнению с lupus+ мышами без плавания свидетельствует о возможности с помощью регулярных физических тренировок умеренной интенсивности изменять условия поляризации T_{x1}/T_{x2} в организме, сдвигая T_{x1}/T_{x2} соотношение в сторону T_{x1} , и тем самым препятствовать развитию иммунокомплексного гломерулонефрита, уменьшать частоту lupus+ варианта.

Среди факторов, обуславливающих развитие у генетически однородных реципиентов разных вариантов хРТПХ, могут быть разные условия жизни животных на предшествующем отрезке онтогенеза: число мышат в помете, небольшие различия в содержании, количество пищи при вскармливании. В вивариях мыши содержатся по 5–10 особей в клетке, при этом между ними устанавливается определенная социальная иерархия, что может вызывать разный уровень комфорта или стресса. Отличающиеся по социальному статусу особи обладают различным уровнем двигательной активности, что также может определять особенности функционирования

других физиологических систем. Полученные результаты, свидетельствующие о выраженных отличиях уровня кортикостерона, отношения уровня женских половых гормонов к мужским у lupus- и lupus+ мышей, позволяют считать, что гормональный статус может служить причиной различного функционального состояния иммунных параметров, в частности, сложившегося к моменту индукции хРТПХ баланса T_{x1}/T_{x2} . Данные о повышенном соотношении женских половых стероидов к мужским в группе lupus+ соответствуют многочисленным клиническим наблюдениям о преимущественном развитии у женщин системной красной волчанки (соотношение между мужчинами и женщинами в отношении СКВ достигает 1:9) [17]. Подтверждением обнаруженной закономерности могут служить данные, полученные при изучении влияния бисфенола А, обладающего способностью связываться с рецепторами эстрогена и имитировать действие эстрогенов: бисфенол А не только увеличивает число мышей lupus+, но и утяжеляет их состояние: уровень белка в моче у них достоверно увеличивается. Известно, что бисфенол А широко используется в производстве многочисленных бытовых предметов из пластмассы, имитирует эндогенные гормоны и вследствие этого рассматривается как соединение, вызывающее нарушения эндокринных функций, а также гипометилирование ДНК [18].

Вопросы, связанные с возможными долгосрочными влияниями различных факторов как внешней, так и внутренней среды на определяющие параметры иммунной системы, в настоящее время активно исследуют. Хорошо изучены эпигенетические механизмы, приводящие к дифференцировке T клеток-хелперов в разные субпопуляции на молекулярном уровне, однако связать эти процессы с воздействиями, оказывающими свое влияние на целостный организм, удается пока в основном только теоретически. Предлагаются модельные системы для изучения этих вопросов, но они, как правило, касаются воздействий *in vitro*. Представленная нами модель СКВ-подобного заболевания позволяет исследовать воздействия, вызывающие эпигенетические изменения в ключевых параметрах иммунной системы, на уровне целостного организма.

Заключение

Изученная в работе модель поляризации T_{x1}/T_{x2} -иммунного ответа на основе хронической РТПХ в полуаллогенной системе DBA/2 → (C57Bl/6xDBA/2), приводящая к формированию разных клинических исходов, представляет собой чувствительную к воздействиям систему, которая может использоваться для изучения механизмов формирования иммунопатологических состояний и тестирования препаратов, потенциально селективных в отношении воздействия на T_{x1} - или T_{x2} -зависимые иммунные процессы и влияющих на баланс T_{x1}/T_{x2} субпопуляций *in vivo*. Поскольку эпигенетические модификации потенциально обратимы, то модель пригодна для изучения эффектов различных эпигенетических воздействий на баланс T_{x1}/T_{x2} — один из ключевых параметров регуляции иммунных процессов — у конкретных особей на уровне целостного организма.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

- Eisenberg R., Via C. T cells, murine chronic graft-versus-host disease and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2012; 39: 240–247.
- Cher D., Mosmann T. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 1987; 138: 3688–3694.
- Szyf M. Epigenetic therapeutics in autoimmune disease. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.* 2010; 39 (1): 62–77.
- van Panhuys N., Le Gros G., McConnell J. Epigenetic regulation of Th2 cytokine expression in atopic diseases. *Tissue Antigens.* 2008; 72 (2): 91–97.
- Sanders V., Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. *Brain Behav. Immun.* 2006; 20: 317–324.
- Via C., Shearer G. T cell interactions in autoimmunity: insights from a murine model of graft-versus-host disease. *Immunol. Today.* 1988; 9: 207–213.
- Anway M., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 2005; 308: 1466–1469.
- Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987; 43 (1): 97–109.
- Колесникова О.П., Кудяева О.Т., Логинов В.А., Робинсон М.В., Колесникова С.М., Козлов В.А. Показатели эритро- и иммунопоэза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина. *Вестник АМН СССР.* 1991; 12: 13–16.
- Герлинская Л.А., Мошкин М.П., Евсиков В.И. Методические аспекты определения уровня стресса у диких животных. *Экология.* 1993; 1: 97–100.
- Muracami M., Yoshioka H., Shirai T., Tsubata T., Honjo T. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *Int. Immunol.* 1995; 7 (5): 877–882.
- Nikolic B., Lee S., Bronson R.T., Grusby M., Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1289–1298.
- Morris S., Madden K., Adamovicz J., Gause W., Hubbard B., Gately M., Finkelman F. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J. Immunol.* 1994; 152: 1047–1056.
- Сухенко Т.Г., Колесникова О.П., Филимонов П.Н., Козлов В.А. Состояние иммуно- и эритропоэза у мышей с болезнью трансплантат против хозяина на фоне иммунодефицита. *ЖМЭИ.* 1999; 4: 56–60.
- Reiss A.B., Awadallah N.W., Malhotra S., Montesinos M.C., Chan E.S., Javitt N.B., Cronstein B.N. Immune complexes and IFN- γ decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 1913–1922.
- Chan R., Jiang P., Peng X., Tam L-S., Liao G., Li E. et al. Plasma DNA aberrations in systemic lupus erythematosus revealed by genomic and methylomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2014; 111 (49): 5302–5311.
- Whitacre C. Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 777–780.
- Waiserman A. Early-life exposure to endocrine disrupting chemicals and later-life health outcomes: an epigenetic bridge? *Ading Dis.* 2014; 5 (6): 419–429.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Колесникова Ольга Петровна, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории экспериментальной иммуно-терапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: iscreen2001@mail.ru

Кудяева Ольга Тимофеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Вольский Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: dtheory@yandex.ru

Гойман Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: l.goiman@mail.ru

Гаврилова Елена Давидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: edav.gavr@mail.ru

Перминова Ольга Михайловна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: pom.57@yandex.com

Демченко Елена Николаевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-06-72, e-mail: elena.demchenko@gmail.ru

Козлов Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор НИИ фундаментальной и клинической иммунологии

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, тел.: +7 (383) 222-26-74, e-mail: vakoz40@yandex.ru