

На правах рукописи

**Бедулева Любовь Викторовна**

**ИДИОТИП-АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАК МЕХАНИЗМ ИНДУКЦИИ  
И РАЗВИТИЯ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ**

14.00.36 - аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Екатеринбург - 2009

Работа выполнена на кафедре иммунологии и клеточной биологии ГОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор                      Меньшиков Игорь Викторович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук    Куклина Елена Михайловна  
доктор медицинских наук, профессор                                      Смолягин Александр Иванович  
доктор биологических наук, профессор                                      Дятлов Дмитрий Анатольевич

**Ведущая организация:** ГНЦ РФ - Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «31» марта 2009 года 13 час. 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д 004.027.01 при Институте иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук ИИФ УрО РАН по адресу: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620049, г. Екатеринбург, ГСП-293, ул. Софьи Ковалевской /Академическая, 22/20, с авторефератом - на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор



И.А. Тузанкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность исследования.* В настоящее время выяснение механизмов регуляции аутоиммунности, обеспечивающих естественную толерантность, и механизмов ее срыва, ведущих к аутоиммунным заболеваниям, является центральной проблемой фундаментальной и клинической иммунологии. Недостаточность понимания механизмов индукции и развития аутоиммунных заболеваний не позволяет найти эффективные способы лечения.

Существующие сегодня объяснения механизмов индукции аутореактивных лимфоцитов, ведущих к аутоиммунным заболеваниям, опираются на идею молекулярной мимикрии (кроссреактивности лимфоцитов) (Wucherpfennig K. W., 2001, Christen U., 2004, Rice J., 2005). Согласно гипотезе молекулярной мимикрии могут рассматриваться два случая, приводящие к развитию аутоиммунной реакции. В первом случае предполагается, что продукты иммунного ответа на чужое перекрестно реагируют с аутоантигенами. Во втором случае допускается, что чужеродный антиген, перекрестно-реагирующий с аутоантигеном, взаимодействует с аутореактивным лимфоцитом и активирует его. Однако, согласно существующей теории формирования естественной толерантности, аутореактивные клоны должны отсутствовать или быть неспособны к активации, находясь под регуляторным контролем (Anderton S., 2006). Поэтому концепция об иммунном перекресте, как механизме возникновения аутоиммунных заболеваний, продолжает носить гипотетический характер, и на сегодняшний день не нашла прямого экспериментального подтверждения.

Имеющиеся данные о существовании в норме большого разнообразия проявляющих активность аутоантител и аутореактивных лимфоцитов, не вызывают сомнений в том, что иммунная система компетентна в отношении не только чужеродных антигенов, но и своих собственных антигенов (Granucci F., 1996, Coutinho A., 1995, Lacroix-Desmazes S., 1998). Кроме того,

известно, что многие инфекции могут сопровождаться временным повышением уровня аутоантител (Sinclair N., 2004, Newkirk M., 2002). Способность иммунной системы распознавать свои собственные антигены ставит проблему выяснения механизмов регуляции аутореактивных лимфоцитов, ограничивающих их активность. Отдельный клон лимфоцитов как объект специфической регуляции может узнаваться только по уникальному антигенсвязывающему участку его рецептора (идиотипу). Поэтому, механизмом клональной, а, следовательно, специфической регуляции в иммунной системе могут быть идиотип-антиидиотипические взаимодействия лимфоцитов.

Идиотип-антиидиотипические (ИАИ) взаимодействия, о существовании которых впервые предположил Н. Ерне, – специфические взаимодействия между антигенраспознающими молекулами и несущими их лимфоцитами на основе узнавания детерминант (идиотипов), локализованных в гипервариабельной области V-доменов иммуноглобулинов или Т-клеточных рецепторов (Jerne N., 1974). Теория Ерне получила многочисленные экспериментальные доказательства. Показана важная роль ИАИ взаимодействий в саморегуляции иммунного ответа, поддержании иммунной памяти (Rodkey L., 1980, Mitra-Kaushik S., 2001), селекции репертуара лимфоцитов, установлении преиммунного разнообразия, естественной иммунной активности, независимой от внешней антигенной нагрузки (Coutinho A., 2003). Однако интерес к теории Ерне на некоторое время был потерян параллельно с высокими успехами в молекулярной иммунологии. Сегодня наблюдается ренессанс в исследованиях ИАИ взаимодействий (Behn U., 2007), в частности, в связи с их высоким потенциалом в регуляции естественной толерантности (Coutinho A., 2003, Prohászka Z., 2007). Данные экспериментальных и клинических исследований показывают, что аутореактивные лимфоциты контролируются антиидиотипическими лимфоцитами – супрессорами. Потеря этого контроля

приводит к аутоиммунному заболеванию (Calkins C.M, 1990, Coutinho A., 2003). Повышение активности антиидиотипических лимфоцитов, специфичных к идиотипам аутоклонов, наоборот, может подавлять аутоиммунные реакции, приводить к ремиссии аутоиммунных заболеваний (Sakurai Y., 2004, Mehta Y.S., 2003, Zhang J., 2004). Эти факты позволяют предполагать, что идиотип-антиидиотипические взаимодействия с одной стороны, могут быть механизмом контроля аутоиммунных реакций в норме, с другой стороны - быть механизмом, посредством которого может происходить активация аутореактивных клонов, ведущая к аутоиммунным заболеваниям. В частности, аутореактивные лимфоциты, находясь в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях с лимфоцитами против чужеродных антигенов, могут быть активированы этими лимфоцитами посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий (Kennedy J.R., 2000, Tsuchiya N. 1993). Кроме того, идиотип-антиидиотипические взаимодействия являются регуляторными, поэтому нарушения в этих взаимодействиях между аутореактивными лимфоцитами и связанными с ними в иммунной сети лимфоцитами может стать причиной патологической активации аутореактивных лимфоцитов.

Активация лимфоцитов в иммунной сети через систему идиотип-антиидиотипических взаимодействий имеет свои особенности, проявляющиеся в характерной кинетике последовательной активации клонов лимфоцитов. Из этого следует, что активация аутореактивных лимфоцитов, вызванная введением в организм чужеродных антигенов и осуществляющаяся посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий, будет иметь принципиально иной характер кинетики образующихся антител в ходе иммунного ответа, чем при активации по механизму молекулярной мимикрии. Поэтому в исследовании идиотипических механизмов активации аутоклонов эффективным подходом может быть изучение кинетики аутоантител и антител против чужеродного

антигена. Кинетика антител отражает изменение активности продуцирующих их лимфоцитов в ходе иммунного ответа, а, следовательно, характер идиотип-антиидиотипических взаимодействий между лимфоцитами (Lange H., 1996).

Для исследования механизма активации аутореактивных клонов были выбраны хорошо известные экспериментальные модели на животных: модель аутоиммунной гемолитической анемии (АГА) у мышей, коллаген-индуцированного артрита (КИА) крыс, адьювантного артрита крыс. Развитие аутоиммунной реакции в этих моделях объясняют в настоящее время с позиции иммунного перекреста.

АГА вызывают у мышей введением эритроцитов крыс, что приводит к образованию аутоантител к собственным эритроцитам и развитию анемии. В случае развития аутоиммунной реакции в экспериментальной модели АГА по механизму идиотип-антиидиотипических взаимодействий максимумы образования антител на эритроциты крыс и аутоантител к эритроцитам мышей должны не совпадать во времени, а кинетические кривые их образования должны соотноситься как динамика образования идиотипических и антиидиотипических антител. В случае индукции аутоиммунной гемолитической анемии по причине иммунного перекреста следует ожидать совпадение максимумов образования антител к эритроцитам крыс и аутоантител к эритроцитам во времени.

КИА – экспериментальная модель ревматоидного артрита человека. КИА у крыс вызывается введением нативного гетерологичного коллагена II типа, что приводит к образованию артритогенных аутоантител к собственному коллагену II типа, а также аутоантител к IgG (ревматоидного фактора (РФ)). Среди антигенов, вызывающих артрит, не найдено антигенов, с которыми ревматоидный фактор мог бы перекрестно реагировать. Однако известны факты о наличии идиотип-антиидиотипических взаимодействий между ревматоидным фактором и антителами к антигенам микроорганизмов

(Johnson P.M., 1988), а также между ревматоидным фактором и аутоантителами к коллагену (Nordling R., 1991). Эти факты наводят на мысль о том, что антиколлагеновые аутоклоны получают активационный сигнал опосредованно через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, несущими ревматоидный фактор в качестве идиотипа. В свою очередь РФ-продуцирующие лимфоциты, в ответ на иммунизацию коллагеном быка в модели КИА, могут активироваться через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, специфичными к бычьему коллагену. В модели КИА артрит возникает у части животных, что позволяет провести сравнительный анализ особенностей образования аутоантител у животных с артритом и у животных, устойчивых к индукции этого заболевания.

Раскрытие роли идиотип-антиидиотипических взаимодействий в развитии аутоиммунных реакций возможно только с опорой на понимание механизмов функционирования иммунной сети. Для исследования сложных систем, таких как иммунная сеть, эффективно математическое моделирование. Ранее на кафедре иммунологии и клеточной биологии УдГУ была представлена математическая модель иммунной сети (Меньшиков И.В., 2004), которая может быть использована в раскрытии механизмов развития аутоиммунных реакций, опосредованных идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями. Поэтому математическая модель иммунной сети была использована для моделирования экспериментальных условий АГА и КИА.

**Цель работы** - выяснение роли идиотип-антиидиотипических взаимодействий лимфоцитов в механизмах индукции и развития аутоиммунных реакций у животных на экспериментальных моделях.

**Задачи:**

1. Провести анализ кинетики образования антител к эритроцитам крыс и аутоантител к эритроцитам мыши в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей.

2. Определить наличие идиотип-антиидиотипические взаимодействия между аутоантителами к эритроцитам мышей и антителами к эритроцитам крыс в реакции торможения гемагглютинации.

3. Исследовать кинетику образования антител к бычьему коллагену II типа, аутоантител к коллагену II типа, ревматоидного фактора, циркулирующих иммунных комплексов у крыс с признаками артрита и у крыс, устойчивых в моделях коллаген-индуцированного артрита и адьювантного артрита. Провести сравнительный анализ кинетики антител у устойчивых к индукции артрита и артритных крыс.

4. Исследовать идиотип-антиидиотипические взаимодействия между ревматоидным фактором и антителами к бычьему коллагену II типа, а также между ревматоидным фактором и антителами к крысиному коллагену II типа, перекрестную реактивность аутоантител к коллагену II типа и антител к бычьему коллагену II типа в сыворотке крыс, иммунизированных бычьим коллагеном.

5. Определить уровень ревматоидного фактора, антител к бычьему коллагену II типа, аутоантител к коллагену II типа в крови крыс в ответ на иммунизацию гомологичными Fc-фрагментами IgG.

6. Исследовать экспериментальные условия аутоиммунной гемолитической анемии мышей и коллаген-индуцированного артрита крыс в математической модели иммунной сети.

***Положения, выносимые на защиту.***

1. Активация аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов в модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной введением крысиных эритроцитов, осуществляется через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, специфичными к эритроцитам крыс, а не в результате иммунного перекреста.

2. Механизмом активации аутореактивных лимфоцитов, продуцирующих ревматоидный фактор, в модели коллаген-индуцированного



артрита крыс, вызванного введением гетерологичного коллагена, являются идиотип-антиидиотипические взаимодействия этих лимфоцитов с лимфоцитами, специфичными к гетерологичному коллагену.

3. Аутоантитела к коллагену II типа в модели коллаген-индуцированного артрита образуются как анти-анти-идиотипические по отношению к антителам к бычьему коллагену, а не в результате активации аутореактивных антиколлагеновых лимфоцитов гетерологичным коллагеном. При этом лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор, являются «проводником» сигнала от лимфоцитов, специфичным к бычьему коллагену к лимфоцитам, специфичным к аутоколлагену через идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

4. Развитие артрита у крыс в модели коллаген-индуцированного артрита, вызванного введением бычьего коллагена, ассоциировано со слабой и непродолжительной продукцией ревматоидного фактора в первые две недели после иммунизации бычьим коллагеном, тогда как у устойчивых к артриту крыс наблюдается сильный и продолжительный ответ ревматоидного фактора.

#### ***Научная новизна исследования.***

На экспериментальных моделях аутоиммунной гемолитической анемии у мышей и коллаген-индуцированного артрита крыс при использовании различных методических подходов впервые доказано, что активация аутореактивных лимфоцитов осуществляется через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами на чужое при активации последних антигеном.

Впервые показано, что индукция РФ-продуцирующих лимфоцитов в модели коллаген-индуцированного артрита крыс может осуществляться через идиотип-антиидиотипические взаимодействия этих лимфоцитов с лимфоцитами, специфичными к гетерологичному коллагену.

Показано, что уровень антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс зависит от уровня продукции ревматоидного фактора, что указывает на вовлечение ревматоидного фактора и лимфоцитов, его продуцирующих, в физиологическую регуляцию антиколлагеновых лимфоцитов посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий.

Получены доказательства того, что индукция аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс происходит не по причине перекрестной реактивности антиколлагеновых аутореактивных лимфоцитов с бычьим коллагеном, а через цепь идиотип-антиидиотипических взаимодействий, в которых РФ-продуцирующие лимфоциты являются проводником сигнала от лимфоцитов, специфичных к бычьему коллагену к аутореактивным антиколлагеновым лимфоцитам.

Выяснено, что развитие коллаген-индуцированного артрита крыс связано со слабой продукцией ревматоидного фактора в период предшествующий клиническим проявлениям артрита, тогда как высокий уровень продукции ревматоидного фактора в ответ на введение антигена, инициирующего аутоиммунный процесс, ассоциирован с устойчивостью к развитию артрита в данной модели. Открыто явление ранней продукции аутоантител, предшествующей образованию антител на вводимый чужеродный антиген, в экспериментальных моделях аутоиммунной гемолитической анемии у мышей и коллаген-индуцированного артрита крыс.

#### ***Практическая значимость исследования.***

Полученные знания открывают перспективы в разработке новых технологий лечения аутоиммунных заболеваний, основанных на управлении идиотипической сетью. Такие способы лечения аутоиммунных заболеваний предполагают восстановление механизмов регуляции аутореактивности. Выявленная в модели коллаген-индуцированного артрита крыс ассоциация артрита со слабой продукцией ревматоидного фактора и недостаточной

регуляторной активностью ревматоидного фактора в отношении антиколлагеновых лимфоцитов послужила основой для разработки и патентования вакцины для лечения ревматоидного артрита. Научные результаты внедрены в учебный процесс в спецкурсах «Экспериментальная иммунология и клиническое моделирование», «Основы клинической иммунологии» на факультете медицинской биотехнологии УдГУ. Фрагменты работы вошли в учебное пособие Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. «Практикум по экспериментальному моделированию в иммунологии», допущенное УМО по классическому университетскому образованию РФ в качестве учебного пособия.

***Апробация результатов исследований.***

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XVIII съезде физиологического общества имени Павлова, (Казань, 2001); I съезде физиологов СНГ, (Москва, 2005); IV, V, VI конференциях иммунологов Урала «Актуальные проблемы фундаментальной и клинической иммунологии и аллергологии», (Уфа, 2005, Оренбург, 2006, Ижевск, 2007); X Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», (Санкт-Петербург, 2006); IV съезде биотехнологов, (г.Пушино, 2006); XX съезде физиологического общества им. Павлова, (г.Москва, 2007); конференции «Математика. Компьютер. Образование», (Москва, 2007); VIII конгрессе РААКИ "Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии», (Москва, 2007), II объединенном иммунологическом форуме (г. Санкт-Петербург, 2008), VI международном конгрессе по аутоиммунностям (Порту, Португалия, 2008).

По теме диссертации опубликовано 26 работ, из них 7 статей в ведущих Российских и иностранных рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, подана заявка на патент.

**Структура диссертационной работы.** Работа изложена на 187 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов. Список литературы включает 296 источников, среди которых 26 отечественных и 270 иностранных. Работа иллюстрирована 45 рисунками, 5 таблицами.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Основные исследования проводились на двух экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний: модели индуцированной аутоиммунной гемолитической анемии у мышей (АГА) и коллаген-индуцированного артрита крыс (КИА).

АГА у белых лабораторных мышей (n=30) индуцировали введением эритроцитов крыс внутривенно в дозе  $2,8 \cdot 10^8$  клеток в физиологическом растворе. Иммунизацию проводили трижды с интервалом один день. Кровь забирали с ЭДТА с интервалом 5 дней в течение 25 дней декапитацией.

Антитела к эритроцитам крыс определяли в тесте прямой агглютинации эритроцитов крыс. Для этого плазму мышей, иммунизированных эритроцитами крыс, прогретую при  $56^{\circ}\text{C}$ , титровали, вносили в лунки по 50 мкл. Затем добавляли 0,5 % суспензию эритроцитов крыс. Инкубировали при комнатной температуре. Результат реакции учитывали через 24 часа.

Аутоантитела к эритроцитам определяли в непрямом тесте Кумбса. Для этого исследуемые образцы плазмы, полученные от мышей, иммунизированных эритроцитами крыс, прогревали при  $56^{\circ}\text{C}$ . Далее образцы плазмы в разведениях инкубировали с эритроцитами интактных мышей (2% суспензия, 50 мкл) 60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Эритроциты отмывали, ресуспендировали в том же объеме физиологического раствора. К отмытым эритроцитам, покрытым неполными аутоантителами, добавляли по 100 мкл полиспецифической антисыворотки кролика против IgG мыши (ЗАО

«Биосан», г. Новосибирск). Инкубировали при 4<sup>0</sup>С 24 часа, учитывали результаты агглютинации.

Идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к эритроцитам крыс и аутоантителами к эритроцитам определяли в тесте торможения агглютинации эритроцитов. Для этого 80 мкл пулированной мышинной плазмы с известным титром, полученной на максимуме образования антител к крысиным эритроцитам (15 день после иммунизации эритроцитами крыс) инкубировали в разведениях с интактными эритроцитами крыс (50 мкл 0,5 % суспензии) и 80 мкл цельной пулированной мышинной плазмы (от 5 животных), полученной на 10 день после иммунизации эритроцитами крыс (на максимуме аутоантител к эритроцитам). В контроле, вместо плазмы, полученной на 10 день, добавляли физиологический раствор, либо плазму интактных мышей. Результаты агглютинации учитывали через 24 часа.

КИА моделировали на белых нелинейных лабораторных крысах разного пола, массой 150±20 г. КИА вызывали введением нативного бычьего коллагена II типа (Sigma) в 0,1 М уксусной кислоте с неполным адьювантом Фрейнда (Difco) однократно, внутрикожно в заднюю часть спины и основание хвоста в 4-6 точек по 400 мкг коллагена на крысу под анестезией (Paul-Clark M., 2002). На модели КИА было проведено 2 серии экспериментов. Животные в ходе эксперимента на основании наличия или отсутствия клинических проявлений артрита были поделены на 2 группы: с признаками артрита и устойчивые. Исследование на модели КИА представляли собой хронический эксперимент с забором крови до иммунизации и еженедельно после иммунизации у каждого животного в течение 9-11 недель. Кровь забирали кардиальной пункцией под анестезией.

В эксперименте с иммунизацией крыс гомологичными Fc-фрагментами IgG, Fc-фрагменты IgG крыс (чистота 91% по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле) вводили внутрикожно и подкожно в спину и

основание хвоста в дозе 500 мкг на крысу в составе НАФ (Difco). Контрольных животных иммунизировали НАФ. Fc-фрагменты IgG крыс были получены на кафедре биохимии и биотехнологии факультета МБТ УдГУ.

Титр антител к бычьему коллагену, аутоантител к крысиному коллагену определяли методом ИФА. Для этого бычий коллаген типа II (Sigma) в PBS (pH 7,4), крысиный коллаген типа II в ЗФР (pH 7,4) или *M. tuberculosis* в карбонатном буфере (pH 9,6) сорбировали на планшете (Corning-Costar) в течение ночи при 4 °С. Планшеты блокировали 0,05% бычьим сывороточным альбумином в ЗФР pH 7,4. Исследуемые сыворотки вносили в разведениях и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакцию регистрировали с помощью антивидовых антител к Ig крыс (к IgG, IgM, IgA), меченных пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия), в разведении 1:5000. На каждом этапе планшет отмывали ЗФР с Твин-20. Затем вносили субстратную смесь (5 мл цитратного буфера (pH 5,0)/3 мг ОФД/15 мкл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Оптическую плотность измеряли при 492 нм. Крысиный коллаген типа II для ИФА выделяли из хрящей крупных суставов крыс по методике Trentham DE, 1977.

Уровень ревматоидного фактора определяли в реакции гемагглютинации фиксированных эритроцитов человека, нагруженных IgG крыс (Sigma) (Фримель Г, 1987).

Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к бычьему коллагену и ревматоидным фактором было определено по способности сыворотки, содержащей ревматоидный фактор, конкурировать с бычьим коллагеном за связывание с анти-БК сывороткой. Для создания условий для эффективной конкуренции подбиралось рабочее разведение вносимой анти-БК сыворотки, при котором отношение концентраций связанного и суммарного антигена (бычьего коллагена) равно 0,5 (Пол У. 1988). Анти-БК сыворотки, использованные в эксперименте,

содержали высокий уровень антител к бычьему коллагену, но ревматоидный фактор в них не обнаруживался. Эти сыворотки были получены от крыс с артритом на 14 день после иммунизации БК. РФ-содержащие сыворотки были получены от тех же или других артритных крыс на 7 день после иммунизации БК. В них не выявлялись антитела к бычьему коллагену. Также были исследованы сыворотки от устойчивых крыс. Такие сыворотки отбирались на основании наличия в них антител к бычьему коллагену и низкого уровня ревматоидного фактора или наличия высокого уровня ревматоидного фактора и отсутствия антител к бычьему коллагену. Метод осуществляли следующим образом. Анти-БК сыворотку, предварительно истощенную от аутоантител к коллагену крыс, в рабочем разведении преинкубировали с сывороткой, содержащей ревматоидный фактор 1 час при комнатной температуре (Muhumuza L, 2003). Далее эту смесь вносили в лунки планшета с сорбированным бычьим коллагеном и проводили ИФА как описано выше. В контроле 1 анти-БК сыворотки инкубировали с ЗФР. В контроле 2 анти-БК сыворотки инкубировали с интактной сывороткой крыс, полученной пулированием от 10 интактных крыс.

Аналогично был поставлен эксперимент для определения ИАИ взаимодействий между аутоантителами к коллагену и ревматоидным фактором. Сыворотки, использованные в эксперименте, содержали высокий уровень аутоантител к коллагену (коллагену крыс) и были истощены от антител к бычьему коллагену. Эти сыворотки были получены от артритных крыс и устойчивых к КИА крыс. Сыворотки, содержащие ревматоидный фактор, были получены от тех же или других крыс на 7 день после иммунизации бычьим коллагеном. Конкурентный ИФА проводили в планшете с сорбированным крысиным коллагеном.

Перекрестную реактивность антител, специфичных к бычьему коллагену, и аутоантител к коллагену в модели КИА крыс определяли следующим образом. Иммунную сыворотку, полученную от животных,

иммунизированных бычьим коллагеном с целью индукции КИА, реагирующую как с бычьим коллагеном, так и с крысиным коллагеном, истощали в течение часа на коллагене быка или на крысином коллагене, сорбированных в пластиковой планшете (50 мкг/мл). Определяли уровень антител к коллагену быка и аутоантител к коллагену в сыворотках до истощения и после истощения на коллагене быка или крысином коллагене. Контролем служила инкубация исследуемых сывороток в пустой лунке, блокированной бычьим сывороточным альбумином. Аналогично проводили повторное истощение.

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли методом преципитации 4,5% ПЭГ 6000 в боратном буфере pH 8,0, при длине волны 440 нм. В контроле к исследуемой сыворотке добавляли буфер. Уровень ЦИК вычисляли по формуле  $D_{\text{опыт}} - D_{\text{контроль}} * 1000$  и выражали в усл.ед.

Экспериментальные условия АГА и КИА были промоделированы в компьютерной модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий, созданной на кафедре иммунологии и клеточной биологии УдГУ, Ивановым В.В. на основе математической модели иммунной сети (Меньшиков И.В., Иванов В.В., 2004). В компьютерной модели в паре лимфоцитов, связанных в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях один из клонов был обозначен как аутореактивный, путем введения постоянно присутствующего аутоантигена, другой - как клон, реагирующий на внешний антиген.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 5.0 для Windows. Результаты выражали как  $\text{среднее} \pm \text{SD}$ , где SD – выборочное стандартное отклонение, или как  $\text{среднее} \pm \text{SE}$ , где SE – стандартная ошибка среднего (Гланц С., 1999). Для оценки достоверности различий был использован критерий Манна-Уитни (Гланц С., 1999). В эксперименте с ингибированием реакции связывания анти-БК/БК и реакции связывания анти-КК/КК сыворотками, содержащими ревматоидный фактор,



и в тесте определения перекрестной реактивности антиколлагеновых антител был использован парный критерий Уилкоксона (Гланц С., 1999).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия как механизм индукции аутоантител к эритроцитам при аутоиммунной гемолитической анемии у мышей

В ответ на введение эритроцитов крыс у мышей развивалась транзиторная аутоиммунная реакция на собственные эритроциты, что проявлялось в снижении количества эритроцитов и росте аутоантител, направленных против эритроцитов мыши. Наблюдалось образование антител на эритроциты крыс (рис. 1).

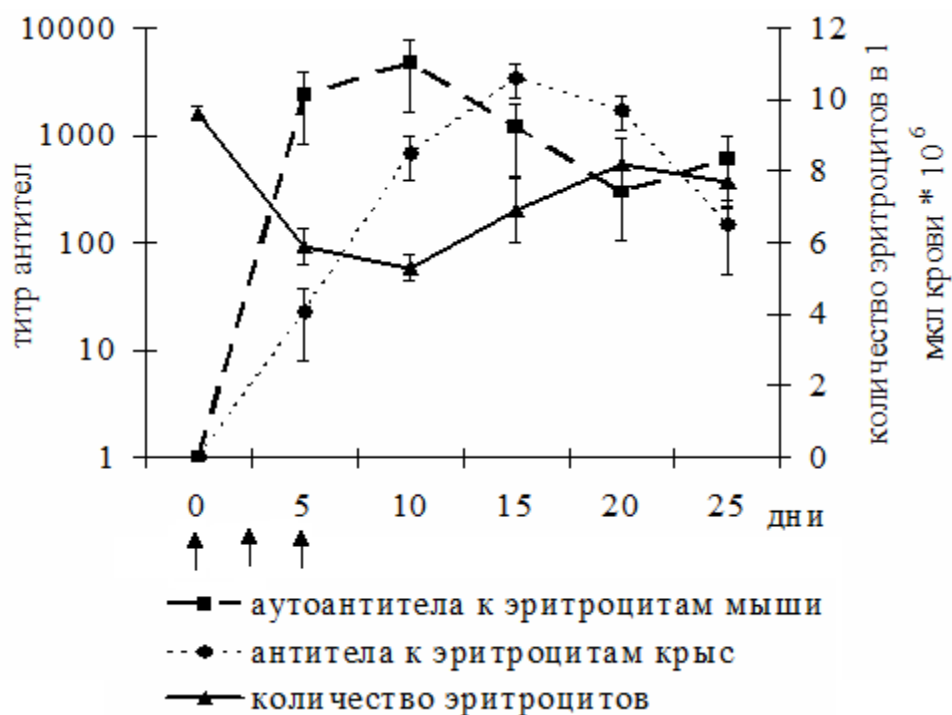


Рисунок 1 - Кинетика образования аутоантител к эритроцитам мышей, антител к эритроцитам крыс и количества эритроцитов в крови мыши при экспериментально вызванной АГА.

*Примечание: Инъекции эритроцитов крыс указаны стрелочками. Каждая точка – среднее результатов исследования 5 мышей  $\pm$  SD.*

Выявлено, что максимумы образования антикрысиных и антимышиных антител не совпадали во времени (рисунок 1). Пик продукции аутоантител на

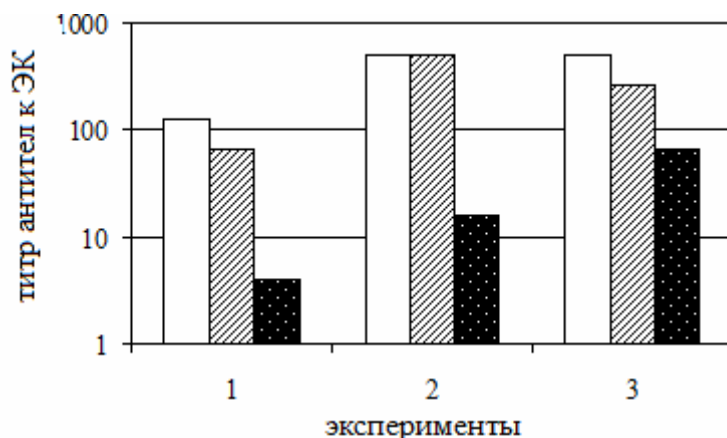
эритроциты наблюдались на 10 день, тогда как максимум образования антител на эритроциты крыс - на 15 день после начала иммунизации. Развитие анемии (снижение количества эритроцитов в крови) совпадало с динамикой аутоантител к эритроцитам, но не с образованием антител на крысиные эритроциты.

Если бы АГА у мышей в ответ на иммунизацию эритроцитами крыс была вызвана антителами, перекрестно-реагирующими с эритроцитами мышей и эритроцитами крыс, как предполагается в соответствии с гипотезой молекулярной мимикрии (иммунного перекреста), то максимумы образования антител к эритроцитам крыс и аутоантител к эритроцитам должны были совпадать во времени. Выявленная кинетика, во-первых, указывает на то, что на мышинные и крысиные эритроциты реагируют разные клоны лимфоцитов. Во-вторых, наблюдаемая кинетика образования аутоантител к эритроцитам и антител к эритроцитам крыс сходна с кинетикой образования идиотипических и антиидиотипических антител в ходе иммунного ответа, при которой, как правило, пики антиидиотипических антител соответствуют минимуму продукции идиотипических антител (Пернис Б., Rodkey L., 1980).

Наблюдаемая кинетика образования антител похожа также на кинетику образования IgM и IgG в ходе первичного иммунного ответа, когда в начале образуются IgM, а позднее IgG. Поэтому можно было бы предполагать, что наблюдаемая в эксперименте кинетика вызвана образованием перекрестно реагирующих с мышинными и крысиными эритроцитами антител сначала IgM (10 день), а затем IgG класса (15 день). Однако в непрямом тесте Кумбса для определения аутоантител к эритроцитам мыши была использована моноспецифическая сыворотка против IgG мыши, поэтому первый пик (10 день) в кинетике образования антител представлен IgG. Антитела к эритроцитам крысы, определяемые в тесте агглютинации, могут быть при этом как IgG, так и IgM. Но их максимум наступает позже (15 день), чем

максимум образования аутоантител. Поэтому кинетика образования аутоантител к эритроцитам и антител к гетерологичным эритроцитам в модели АГА не может быть объяснена с позиции образования перекрестно реагирующих антител, принадлежащих к разным классам.

Плазма, полученная на максимуме образования аутоантител (10 день после иммунизации), была исследована в реакции торможения гемагглютинации в тест-системе, состоящей из ЭК и плазмы, полученной на максимуме образования антител к эритроцитам крыс (на 15 день). На рисунке 2 представлены результаты трех экспериментов, в каждом из которых исследованные образцы плазмы крови получены пулированием плазмы от 5 животных.



- Титр антител к ЭК в плазме, полученной на 15 день после иммунизации, в присутствии физ. раствора
- ▨ Титр антител к ЭК в плазме, полученной на 15 день после иммунизации, в присутствии интактной мышиной плазмы
- Титр антител к ЭК в плазме, полученной на 15 день после иммунизации, в присутствии антисыворотки, полученной на 10 день после иммунизации.

Рисунок 2 - Торможение гемагглютинации эритроцитов крыс в присутствии аутоантител к эритроцитам

Плазма, полученная на 10 день, существенно подавляла реакцию агглютинации эритроцитов крыс. Например, в эксперименте № 1 титр антител к ЭК в контроле, где вместо этой иммунной плазмы был добавлен физиологический раствор, был 1/128; в контроле, где вместо иммунной

плазмы, добавляли плазму интактных мышей, титр антител к ЭК был 1/64, тогда как в присутствие плазмы, полученной на 10 день, титр антител к ЭК был 1/4 (рисунок 2). Таким образом, плазма, содержащая аутоантитела к эритроцитам, конкурировала с эритроцитами крыс за связывание с антителами к ним, т.е. аутоантитела связываются с идиотипами антител к эритроцитам крыс. Торможение реакции агглютинации ЭК в присутствие плазмы, полученной на максимуме образования аутоантител к эритроцитам (рисунок 2) служит убедительным доказательством того, что аутоантитела к эритроцитам и антитела к ЭК у мышей составляют пару идиотип-антиидиотип.

На основании полученных данных можно предположить, что лимфоциты к ЭК обеспечивают в норме антиидиотипический супрессорный контроль лимфоцитов, несущих идиотипы против собственных эритроцитов и являются механизмом поддержания естественной толерантности, обеспечивают в норме низкий уровень аутоантител (рисунок 3).

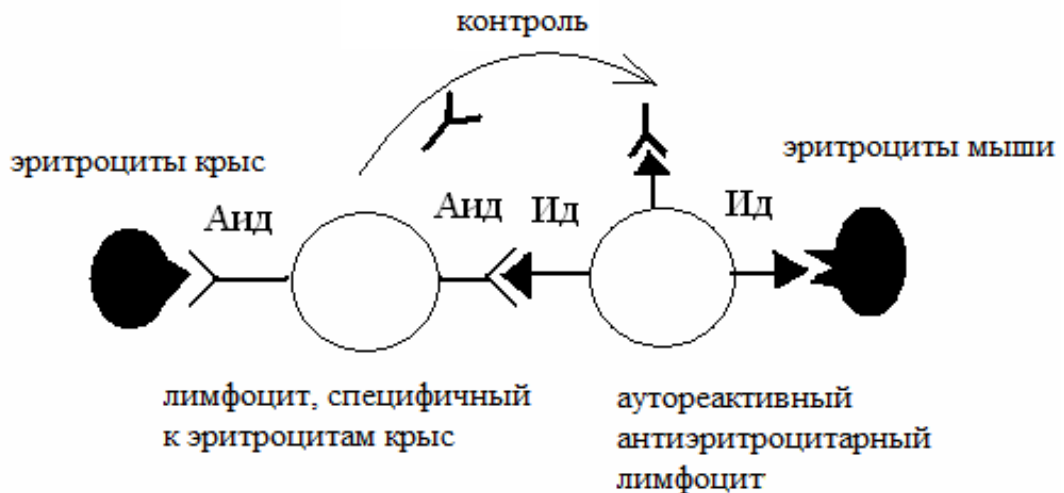


Рисунок 3 - Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между аутореактивным клоном на эритроциты и клоном на гетерологичные эритроциты у мышей.

*Примечание: Ид – идиотип, Аид – антиидиотип.*

Это не противоречит экспериментальным данным о супрессорных свойствах антиидиотипических антител и лимфоцитов (Klusken L., 1974, Calkins C., 1990), а также одному из положений теории иммунной сети Эрне

Н., 1974, по которому антиидиотипические лимфоциты супрессируют функцию, связанных с ними, идиотипоположительных лимфоцитов.

Исследование кинетики антител к ЭК и антител к ЭМ (рисунок 1) при АГА у мышей выявило следующую особенность. Продукция аутоантител на эритроциты и развитие анемии опережает образование антител на иницирующий антиген (гетерологичные эритроциты). Данный факт оказался неожиданным, так как в соответствии с традиционными представлениями о кинетике идиотипических и антиидиотипических антител в ходе иммунного ответа пик антиидиотипических антител, в данном случае антител на ЭМ должен следовать за пиком идиотипических антител – антител на ЭК.

Таким образом, активация аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов при аутоиммунной анемии у мышей, вызванной введением крысиных эритроцитов, осуществляется через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, специфичными к эритроцитам крыс, а не в результате кроссреактивности лимфоцитов на ауто- и гетерологичные эритроциты.

## **2. Механизм индукции ревматоидного фактора при коллаген-индуцированном артрите крыс**

### ***2.1. Коллаген-индуцированный артрит у крыс. Начало и течение артрита***

В ответ на введение БК артрит развился в среднем у 38 % крыс, иммунизированных бычьим коллагеном. Первые клинические признаки наблюдались на 14 - 21 день после введения БК. Артрит проявлялся значительным увеличением объема, отеком, покраснением одной или обеих задних, а у некоторых животных и передних лап, ограничением подвижности животных (рисунок 4).



Рисунок 4 - Клинические проявления артрита у крыс, иммунизированных бычьим коллагеном.

В течение 2-3 недель эти проявления усиливались – усиливалась опухоль, вовлекались новые суставы, поражались другие лапы. Выраженность клинической картины по количеству вовлеченных суставов и степени их опухания варьировала. Спустя 5-6 недель после введения антигена проявления начинали постепенно ослабевать. У большого числа крыс симптомы спонтанно усиливались на 8 неделе, в основном в виде поражения мелких суставов лап. На 9 – 10 неделе видимые признаки артрита сохранялись только в виде утолщений крупных суставов.

На основании наличия или отсутствия клинических признаков артрита животные были поделены на группу артритных и устойчивых к индукции артрита животных. У всех животных, как с признаками артрита, так и без них в ответ на введение бычьего коллагена в крови были обнаружены антитела к бычьему коллагену, аутоантитела к коллагену, ревматоидный фактор. Циркулирующие иммунные комплексы были выявлены только у крыс с артритом и впервые определялись на 14 день после иммунизации бычьим коллагеном ( $29 \pm 9$  у.ед.), что совпадало с началом клинических проявлений артрита или несколько предшествовало им.

## 2.2 Особенности иммунного ответа на бычий коллаген, кинетика ревматоидного фактора в модели коллаген-индуцированного артрита крыс

В ответ на введение бычьего коллагена у всех животных, как с признаками артрита (рисунок 6), так и без них (рисунок 5), обнаружено повышение уровня антител к индуктору (бычьему коллагену), аутоантител к коллагену. Сравнение кинетики исследуемых антител у устойчивых животных и у животных с артритом показывает, что у устойчивых крыс уровень аутоантител возвращался к исходному через 7-9 недель после иммунизации бычьим коллагеном, тогда как у крыс с артритом ревматоидный фактор и аутоантитела к коллагену даже через 11 недель после иммунизации бычьим коллагеном оставались на более высоком уровне по отношению к исходному. Кроме того, у животных с артритом не затухал иммунный ответ и к бычьему коллагену. Таким образом, у устойчивых крыс аутоиммунная реакция носила транзиторный характер, у крыс с артритом – самоподдерживающийся.

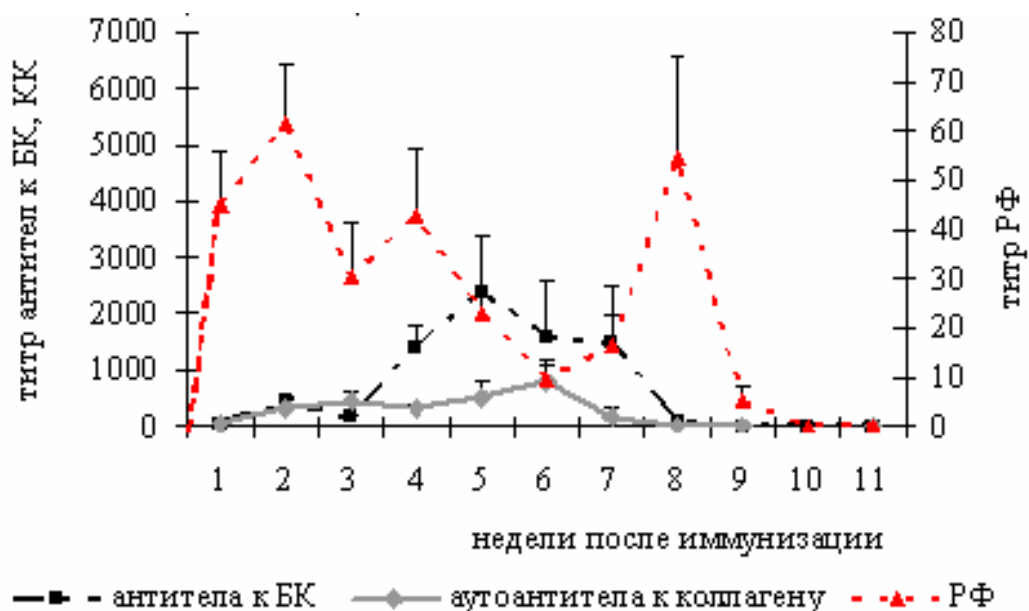


Рисунок 5 - Кинетика антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену, ревматоидного фактора у устойчивых к артриту крыс.

Примечание: 0 – день введения БК. Серия № 1. Каждая экспериментальная точка представлена средним 10 животных  $\pm$  SD. Кинетика антител во 2-ой экспериментальной серии (n=9) носит сходный характер.



Рисунок 6 - Кинетика антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену, ревматоидного фактора у крыс с клиническими проявлениями артрита.

*Примечание: 0 – день введения БК. Эксперимент № 1. Каждая экспериментальная точка представлена средним от 4 животных  $\pm$  SD. Во 2-ой экспериментальной серии (n=5) кинетика антител носит сходный характер.*

В иммунном ответе на бычий коллаген у устойчивых к артриту крыс выявлен ярко выраженный латентный период – уровень антител к бычьему коллагену оставался на низком уровне в течение 21 дня после введения антигена и даже снижается с 14 до 21 день после введения антигена (рисунок 5). Антитела к бычьему коллагену достигали максимума только на 35 день после иммунизации. Обычно гуморальный иммунный ответ на введенный чужеродный белок в адьюванте развивается быстрее и не сопровождается латентным периодом.

Причиной латентного периода в иммунном ответе на бычий коллаген может быть активная супрессия образования антител к бычьему коллагену в течении первых трех недель после введения антигена. Известно, что механизмом специфической регуляции иммунного ответа являются идиотип-антиидиотипические взаимодействия лимфоцитов. Антиидиотипические антитела и лимфоциты являются фактором регуляции связанных с ними идиотипоположительных лимфоцитов. Поэтому было сделано предположение,



что за латентный период в иммунном ответе на БК могут быть ответственны антитела и лимфоциты, антиидиотипические по отношению к идиотипам антител к бычьему коллагену. Nordling С., 1991 было показано, что антиидиотипические моноклональные антитела С1С3 против моноклональных антител к эпитопам нативной молекулы коллагена II типа мыши являются ревматоидным фактором. Возникшее на основании этих данных предположение, что латентный период может быть связан с продукцией ревматоидного фактора, нашло подтверждение при исследовании сывороток, полученных в первые 3 недели после иммунизации бычьим коллагеном. Так, в течение латентного периода обнаруживался высокий уровень ревматоидного фактора в крови устойчивых к артриту крыс в модели КИА. У неартритных крыс (рисунок 5) РФ прогрессивно нарастал в течение первых 2 недель после введения БК. Только после снижения уровня РФ наблюдался спонтанный, без дополнительной антигенной стимуляции, прогрессивный рост антител к бычьему коллагену (с 21 дня после иммунизации).

Ответ ревматоидного фактора и антитела к бычьему коллагену (рисунок 5) циклически сменяли друг друга, фазы спонтанного роста антител к коллагенам соответствовали снижению уровня ревматоидного фактора в крови. Кинетика ревматоидного фактора и антител к бычьему коллагену похожа на кинетику антител, связанных в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях, для которой характерно реципрокное изменение уровня идиотипических и антиидиотипических антител в ходе иммунного ответа.

Особенностью кинетики исследованных антител в модели КИА является то, что в ответ на введение бычьего коллагена повышение уровня ревматоидного фактора, который является аутоантителами, в крови крыс опережает образование антител на бычий коллаген, максимум ревматоидного фактора предшествует максимуму антител к бычьему коллагену. Как у артритных крыс (рисунок 6), так и устойчивых к КИА крыс (рисунок 5).

Ревматоидный фактор впервые определялся в крови на 7 день после иммунизации бычьим коллагеном, тогда как антитела к бычьему коллагену на 14 день после иммунизации. Таким образом, у крыс, иммунизированных бычьим коллагеном, появление аутоантител к IgG, т.е. ревматоидного фактора, опережало образование антител на иницирующий антиген (коллаген быка). Кинетика ревматоидного фактора и антител к бычьему коллагену похожа на кинетику антител, связанных как идиотип-антиидиотип.

### ***2.3. Подавление связывания антител к бычьему коллагену сывороткой, содержащей ревматоидный фактор, в конкурентной схеме ИФА***

Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между ревматоидным фактором и антителами к бычьему коллагену было исследовано методом конкурентного ИФА по способности РФ-содержащей сыворотки, полученной на 7 день после иммунизации бычьим коллагеном, ингибировать связывание антител к бычьему коллагену с бычьим коллагеном. Результаты исследования специфической реакции анти-БК/БК в присутствии РФ-содержащей сыворотки представлены на рисунке 7.

Оптическая плотность специфической реакции связывания анти-БК с БК в присутствии РФ-содержащей сыворотки, достоверно ниже ( $p \leq 0,02$ ), чем в контроле, где вместо РФ-содержащей сыворотки были добавлены ЗФР или интактная сыворотка крыс (рисунок 7). В виду того, что ревматоидный фактор является аутоантителами к Fc-фрагментам IgG и тем самым может влиять на связывание анти-БК/БК, взаимодействуя с Fc-областью антител к БК, а не с их антигенсвязывающими участками, был проведен контрольный эксперимент. В тест-системе, состоящей из антисыворотки против человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и ЧСА, было показано, что сыворотка, содержащая РФ, не подавляет реакцию связывания анти-ЧСА/ЧСА. Поэтому наблюдаемый эффект подавления связывания анти-БК/БК сывороткой, содержащей ревматоидный фактор, может быть объяснен

только идиотип-антиидиотипическими взаимодействиями между ревматоидным фактором и антителами против бычьего коллагена.

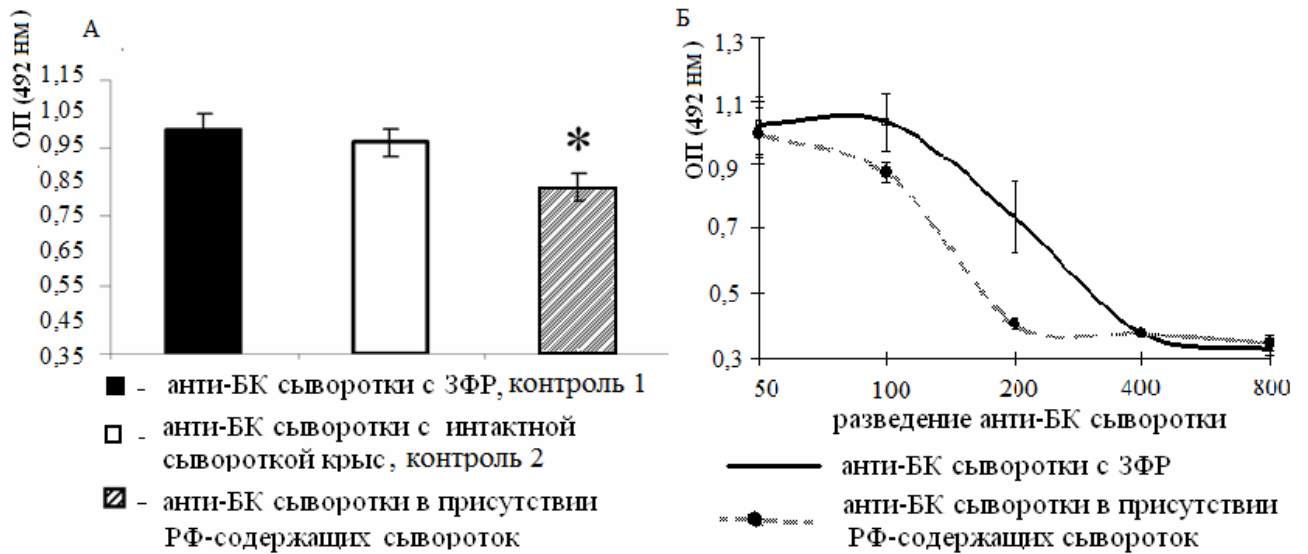


Рисунок 7 - Результаты специфического связывания антисывороток к бычьему коллагену ( $n=10$ ) с бычьим коллагеном в присутствии РФ-содержащих сывороток ( $n=10$ ) и интактной пулированной сыворотки крыс.

*Примечание: Анти-БК сыворотки были предварительно истощены от аутоантител к коллагену. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SE.*

*А - для создания условий для конкуренции за связывание с антителами к бычьему коллагену анти-БК сыворотки были взяты в рабочем титре, при котором отношение концентраций связанный БК/суммарный БК=0,5.*

*Б - кривые титрования анти-БК сывороток в присутствии РФ-содержащих сывороток ( $n=3$ ), (среднее  $\pm$  SE).*

*\* - достоверно по отношению к контролю 1, и контролю 2,  $p \leq 0,02$  (критерий Уилкоксона). БК – бычий коллаген, РФ - ревматоидный фактор, ЗФР – забуференный физиологический раствор.*

На рисунке 7Б представлены результаты конкурентного ИФА при различных разведениях антисыворотки, специфичной к бычьему коллагену. Ингибирование реакции связывания анти-БК сыворотки с БК в присутствии РФ-содержащей сыворотки, наблюдалось только в зоне 50-80%-го связывания бычьего коллагена (зона, где возникают условия для конкуренции за связывание с антителами к бычьему коллагену) и не наблюдалось ни в зоне избытка, ни в зоне недостатка антител к бычьему коллагену. Это свидетельствует о том, что наблюдаемое ингибирование является результатом конкуренции между РФ-содержащей сывороткой и бычьим коллагеном за связывание с анти-БК сывороткой. Из результатов

этих экспериментов следует, что между ревматоидным фактором и антителами к бычьему коллагену существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

***2.4. Антитела к бычьему коллагену, аутоантитела к коллагену, ревматоидный фактор при иммунизации крыс гомологичными Fc-фрагментами IgG***

Если РФ-продуцирующие лимфоциты и анти-БК лимфоциты находятся в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях, то, как иммунизация бычьим коллагеном приводит к образованию ревматоидного фактора в модели КИА крыс, так и стимуляция РФ-продуцирующих лимфоцитов должна приводить к появлению антител к бычьему коллагену.

В ответ на введение крысам гомологичных Fc-фрагментов IgG, которые являются антигеном для РФ-продуцирующих лимфоцитов, у всех иммунизированных крыс значительно повышался уровень ревматоидного фактора. У 6 из 10 иммунизированных животных были обнаружены антитела к бычьему коллагену. Более того, у 2 из 10 крыс был выявлен невысокий уровень аутоантител к коллагену II типа. Результаты определения ревматоидного фактора, антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену II типа в крови крыс на 7 день после иммунизации Fc-фрагментами IgG крыс представлены на рисунке 8. До иммунизации гомологичными Fc-фрагментами IgG, а также в результате введения только НАФ ревматоидный фактор или антитела к бычьему коллагену, аутоантитела к коллагену обнаружены не были.

Появление антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену при иммунизации крыс гомологичными Fc-фрагментами возможно, только в случае, если лимфоциты против IgG находятся в ИАИ взаимодействиях с анти-БК лимфоцитами.

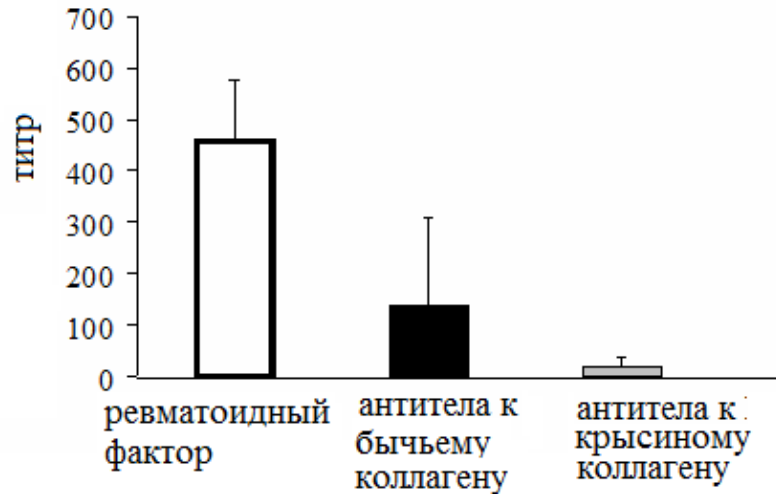


Рисунок 8 - Уровень ревматоидного фактора, антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену на 7 день после при иммунизации крыс гомологичными Fc-фрагментами IgG.

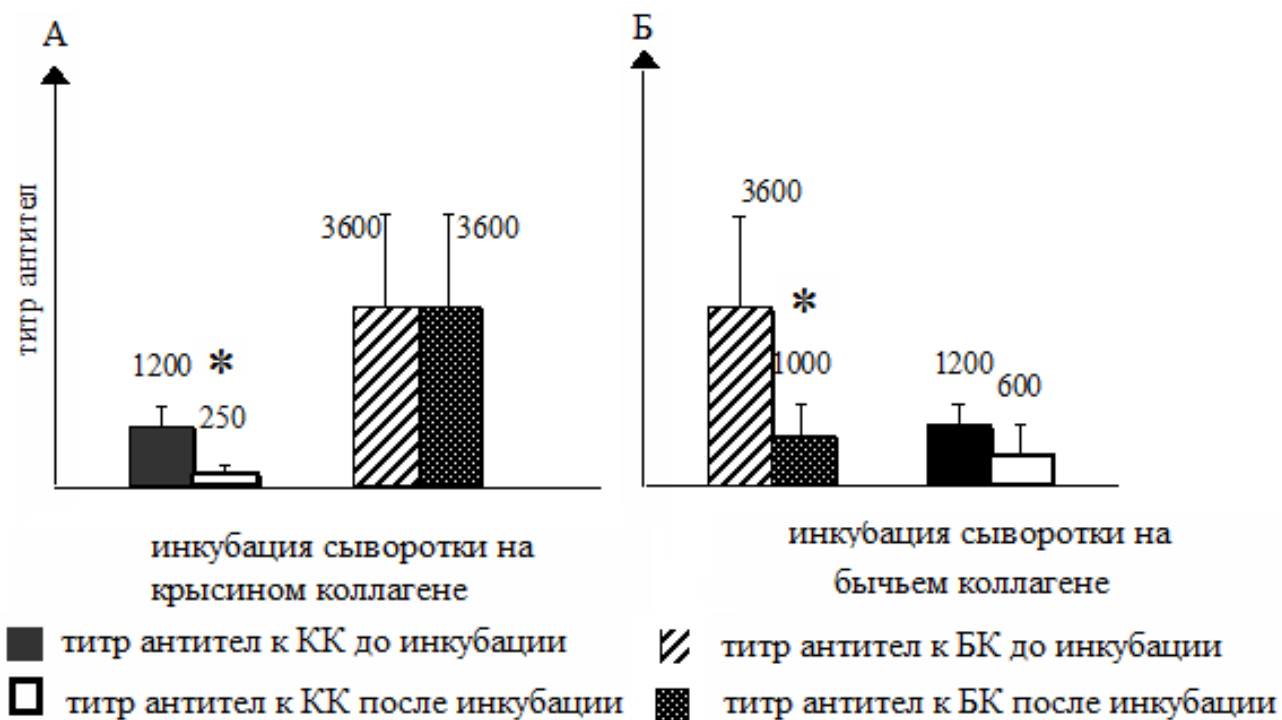
*Примечание: Результаты представлены как среднее  $\pm$ SD, n=10.*

Таким образом, особенности кинетики ревматоидного фактора и иммунного ответа на бычий коллаген, способность РФ-содержащей сыворотки подавлять связывание антител к БК с бычьим коллагеном, факт появления антител к бычьему коллагену при иммунизации крыс гомологичными Fc-фрагментами вместе доказывают, что между ревматоидным фактором и антителами к бычьему коллагену существуют идиотип-антиидиотипические взаимодействия, и индукция лимфоцитов, продуцирующих ревматоидный фактор, как у артритных, так и неартритных крыс в модели КИА, опосредована через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, специфичными к бычьему коллагену II типа при активации последних антигеном.

### **3. Механизм индукции аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс. Регуляторная роль ревматоидного фактора**

Сыворотка, реагирующая с бычьим коллагеном и крысиным коллагеном (аутоколлагеном), полученная от артритных и устойчивых крыс в модели КИА была проинкубирована на коллагене быка и коллагене крыс, сорбированных на пластике. Результаты определения уровня антител к

крысиному коллагену (аутоантител) и антител к бычьему коллагену до и после инкубации сыворотки на коллагене крыс представлены на рисунке 9А,



после инкубации на коллагене быка - на рисунке 9Б.

Рисунок 9 - Титр антител к бычьему коллагену и крысиному коллагену до и после истощения антисывороток на крысином коллагене (А), n=8, и на бычьем коллагене (Б), n=8.

*Примечание: Результаты представлены как среднее±SD, \* - статистически значимые различия (критерий Уилкоксона),  $p \leq 0,024$ . БК - бычий коллаген, КК - крысиный коллаген.*

После инкубации сывороток (рисунок 9А) на крысином коллагене уровень антител к бычьему коллагену не изменялся по сравнению с исходным, тогда как аутоантитела к коллагену истощались. После инкубации исследуемых сывороток на коллагене быка уровень аутоантител к коллагену снижался, также как и уровень антител к бычьему коллагену (рисунок 9Б). Однако, снижение уровня аутоантител к коллагену по отношению к исходному уровню было недостоверно. Индивидуальный анализ результатов показал, что в 2 из 8 исследованных сывороток снижение уровня аутоантител к коллагену после инкубации сывороток на коллагене быка не наблюдалось.

Факт, что антитела к бычьему коллагену не истощаются на коллагене крыс, свидетельствует в пользу того, что антитела к бычьему коллагену и аутоантитела к коллагену – не одни и те же антитела, перекрестно-реагирующие с бычьим и крысиным коллагеном. Антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену – продукты разных клонов лимфоцитов. На это указывает также характер кинетики антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену (рисунок 5). Кинетика аутоантител к коллагену не совпадает с кинетикой антител к бычьему коллагену (рисунок 5).

Выявленное снижение уровня аутоантител к коллагену в некоторых образцах сывороток при инкубации их на коллагене быка позволяет предполагать наличие перекрестной реактивности у антиколлагеновых аутоантител с гетерологичным коллагеном. Однако, наличие перекрестной реактивности аутоантител к коллагену с бычьим коллагеном в некоторых случаях в условиях *in vitro* не является доказательством того, что бычий коллаген может непосредственно активировать аутореактивные антиколлагеновые лимфоциты *in vivo* и вызывать артрит. Также нельзя объяснить активацию продукции аутоантител к коллагену бычьим коллагеном в тех отдельных случаях (2 из 8 исследованных сывороток), когда перекрестная реактивность аутоантител к коллагену с БК не была выявлена.

Между аутоантителами к коллагену и ревматоидным фактором было исследовано наличие ИАИ взаимодействий методом конкурентного ИФА по способности РФ-содержащей сыворотки, полученной на 7 день после иммунизации бычьим коллагеном, ингибировать связывание аутоантител к коллагену с коллагеном крыс. Результаты исследования специфической реакции анти-КК/КК в присутствии сыворотки, содержащей ревматоидный фактор, представлены на рисунке 10. ОП специфической реакции связывания анти-КК с КК в присутствии РФ-содержащей сыворотки, был достоверно

ниже ( $p \leq 0,02$ ), чем в контроле, где вместо РФ-содержащей сыворотки был добавлен ЗФР.

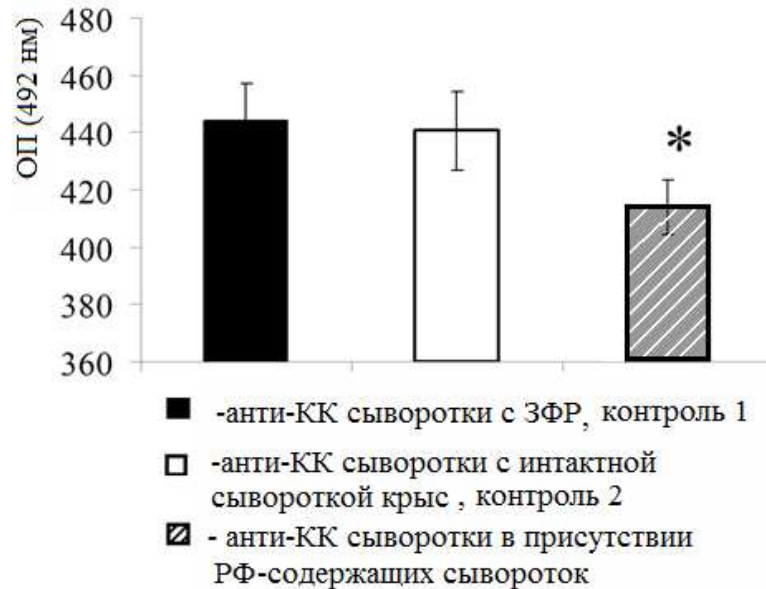


Рисунок 10 - Специфическое связывание (ОП реакции) антисывороток, содержащих аутоантитела к коллагену крыс с крысиным коллагеном ( $n=12$ ) в присутствии сывороток, содержащих ревматоидный фактор ( $n=12$ ) и интактной пулированной сыворотки крыс.

*Примечание: Антисыворотки, содержащие аутоантитела к коллагену крыс, были предварительно истощены от антител к бычьему коллагену. Результаты представлены как среднее  $\pm$  SE. \* - достоверно по отношению к контролю 1, и контролю 2,  $p \leq 0,02$  (критерий Уилкоксона). КК – крысиный коллаген, РФ - ревматоидный фактор.*

Таким образом, ревматоидный фактор конкурирует с коллагеном крыс за связывание с аутоантителами к коллагену крыс и, следовательно, вступает в идиотип-антиидиотипические взаимодействия не только с антителами, специфичными к бычьему коллагену, но и с аутоантителами, специфичными к крысиному коллагену II типа.

Полученные данные указывают на следующий характер взаимодействий между лимфоцитами, специфичными к бычьему коллагену, лимфоцитами специфичными к крысиному коллагену и РФ-продуцирующими лимфоцитами (рисунок 11). В соответствии с этой схемой аутореактивные лимфоциты, специфичные к собственному коллагену, активируются не бычьим коллагеном, как предполагается в соответствии с



гипотезой молекулярной мимикрии, а опосредованно через цепочку связанных в ИАИ взаимодействиях лимфоцитов.

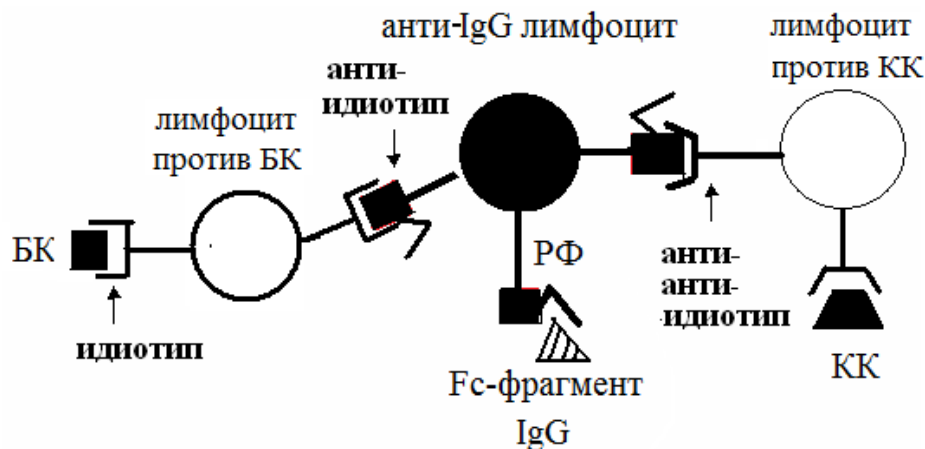


Рисунок 11 – Гипотетическая схема организации фрагмента иммунной сети, объясняющая механизм повышения уровня ревматоидного фактора и аутоантител к коллагену при введении БК.

*Примечание: БК - бычий коллаген, КК – крысиный коллаген.*

Идиотип-антиидиотипические взаимодействия не только передают информацию, но и на их основе формируются механизмы регуляции активности клонов лимфоцитов, включая аутоклоны. Полученные в работе данные, указывающие на то, что ревматоидный фактор представляет собой антиидиотипические антитела по отношению к антиколлагеновым аутоантителам, позволяет предполагать, что ревматоидный фактор и лимфоциты его продуцирующие вовлечены в регуляцию активности антиколлагеновых лимфоцитов через ИАИ взаимодействия. Это не противоречит современным знаниям о функциях антиидиотипических антител и лимфоцитов. Антиидиотипические антитела и лимфоциты, реактивные к идиотипам аутоантител или аутореактивных Т-лимфоцитов, способны подавлять образование антител, несущих этот идиотип, и поэтому способны поддерживать состояние специфической толерантности (Zanetti M., 1991, Routsias J., 2002, Kohler H., 1989). Наличие контроля над аутореактивными антиколлагеновыми лимфоцитами со стороны РФ-продуцирующих лимфоцитов делает принципиально невозможной прямую

активацию аутореактивных антиколлагеновых лимфоцитов гетерологичным коллагеном, как предполагает гипотеза молекулярной мимикрии, так как такая активация не затрагивает РФ-продуцирующие лимфоциты, а, следовательно, механизмы контроля аутореактивных антиколлагеновых лимфоцитов. Активация аутореактивных антиколлагеновых лимфоцитов бычьим коллагеном опосредованно через цепь ИАИ взаимодействий в соответствии со схемой на рисунке 11 в первую очередь вызывает активацию РФ-продуцирующих лимфоцитов, т.е. вмешивается в механизмы регуляции антиколлагеновых аутоклонов и поэтому может приводить к индукции аутоиммунной реакции к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс.

Таким образом, в ответ на иммунизацию бычьим коллагеном аутоантитела к коллагену образуются как анти-анти-идиотипические по отношению к лимфоцитам, специфичным к бычьему коллагену. Лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор, являются «проводником» активационного сигнала через идиотип-антиидиотипические взаимодействия от лимфоцитов, специфичных к бычьему коллагену, к лимфоцитам, специфичным к аутоколлагену.

#### **4. Сравнительный анализ кинетики антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену, ревматоидного фактора у устойчивых и артритных крыс**

Сравнительный анализ кинетики антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену, ревматоидного фактора у устойчивых и артритных крыс в период предшествующий клиническим проявлениям артрита показывает, что кинетика исследуемых антител у устойчивых и артритных крыс принципиально различна (рисунок 12). В этот период не выявляются циркулирующие иммунные комплексы, поэтому уровень антител, определяемых в крови, может отражать их истинную продукцию лимфоцитами.

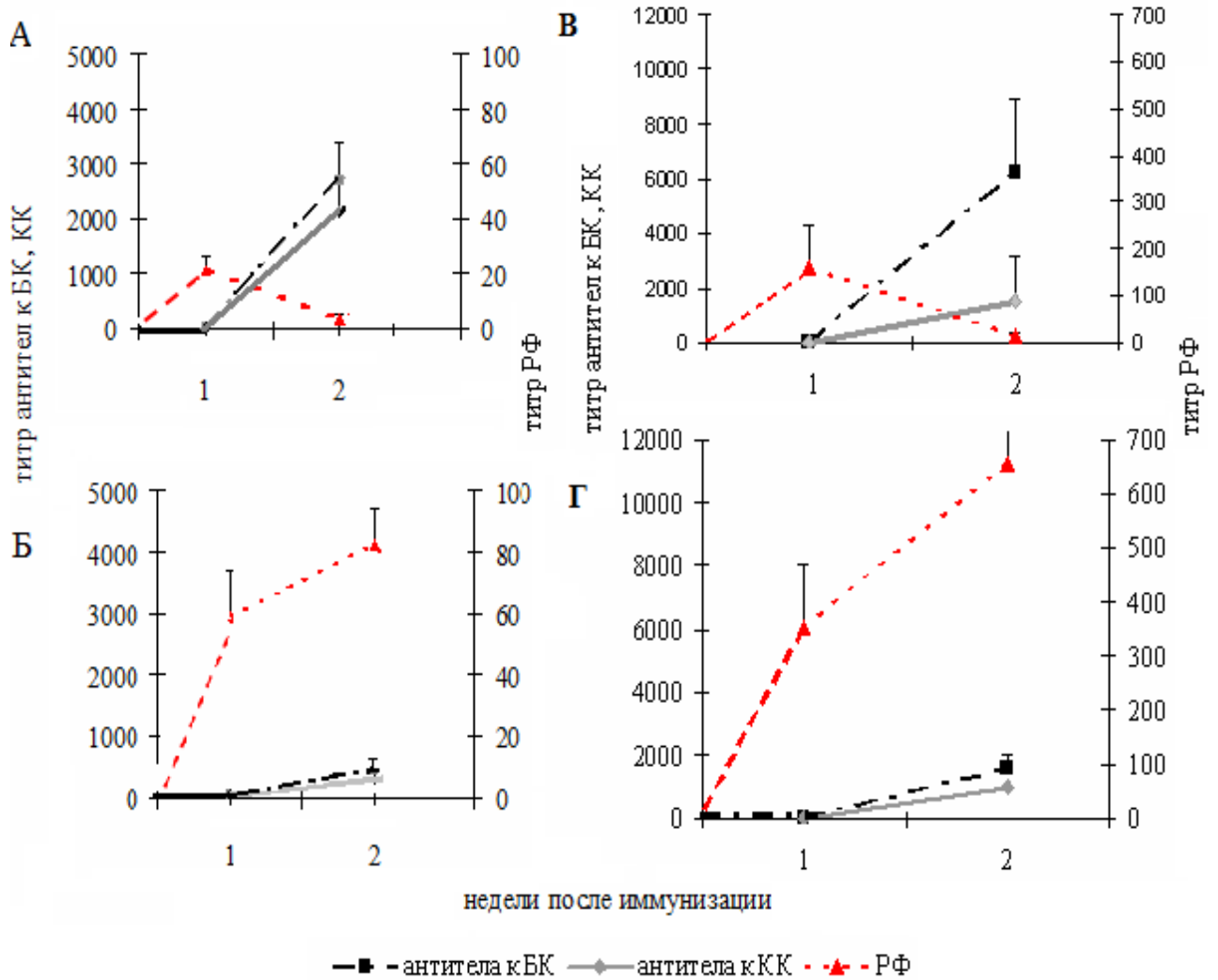


Рисунок 12 - Кинетика антител к бычьему коллагену, аутоантител к коллагену, ревматоидного фактора у крыс с артритом в период предшествующий артриту и у устойчивых крыс в аналогичный промежуток времени.

*Примечание:* 0 – день введения бычьего коллагена. А – кинетика антител у крыс с артритом в 1-ой экспериментальной серии, каждая точка – среднее 4-х исследований  $\pm SE$ ; Б - кинетика антител у устойчивых крыс в 1-ой экспериментальной серии, каждая точка – среднее 10 исследований; В - кинетика антител у крыс с артритом во 2-ой экспериментальной серии, каждая точка – среднее 5 исследований  $\pm SE$ ; Г - кинетика антител у устойчивых крыс во 2-ой экспериментальной серии, каждая точка – среднее 9 исследований.

На рисунках 12 Б и 12 Г показано, что у устойчивых к артриту крыс в ответ на иммунизацию бычьим коллагеном ревматоидный фактор прогрессивно нарастет в течение 14 дней. При этом уровень антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену остается на очень низком

уровне. Латентный период в образовании антиколлагеновых антител на фоне высокого уровня ревматоидного фактора у устойчивых животных может являться проявлением регуляторного (супрессорного) влияния ревматоидного фактора в отношении антиколлагеновых лимфоцитов

У артритных крыс в ответ на иммунизацию бычьим коллагеном уровень ревматоидного фактора повышается незначительно и резко падает через 7 дней после введения бычьего коллагена. Падение уровня ревматоидного фактора сопровождается резким увеличением уровня антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену на 14 день (рисунок 12А, рисунок 12В). У артритных животных уровень ревматоидного фактора на 7 день после введения бычьего коллагена достоверно ниже ( $p \leq 0,05$ ), чем у устойчивых крыс (рисунок 13)

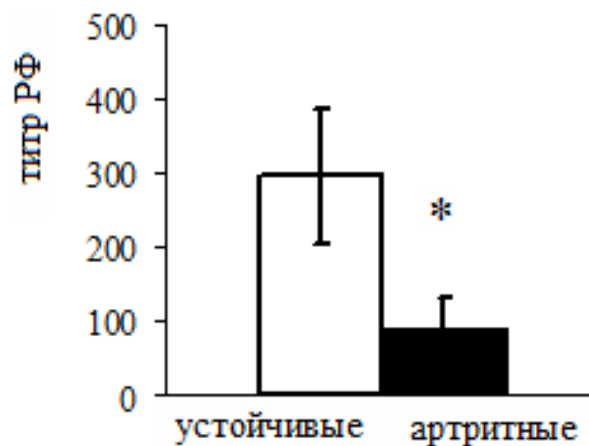


Рисунок 13 – Уровень ревматоидного фактора на 7 день после иммунизации бычьим коллагеном в крови крыс с артритом ( $n = 12$ ) и оказавшихся устойчивыми ( $n = 12$ ).

*Примечание: результаты представлены как среднее  $\pm$  SE. \* - статистически значимые различия,  $p \leq 0,05$  (критерий Манна-Уитни).*

Из полученных фактов следует, что развитие артрита в модели КИА связано со слабой и непродолжительной продукцией ревматоидного фактора в преартритный период, сопровождающейся ростом антиколлагеновых антител. Тогда как значительный и продолжительный рост ревматоидного фактора и слабая продукция антиколлагеновых антител в ответ на

иммунизацию бычьим коллагеном были ассоциированы с устойчивостью к артриту в модели КИА.

Возникает вопрос, как выявленные особенности ответа ревматоидного фактора у артритных крыс на иммунизацию бычьим коллагеном могут быть связаны с развитием клинической картины артрита, т.е. с формированием эффекторных механизмов артрита. Известно, что при коллаген-индуцированном артрите аутоиммунное воспаление обусловлено циркулирующими иммунными комплексами (Holmdahl R., 1989). У крыс (рисунок 12А и 12В), у которых развивается артрит, между 1-ой и 2-ой неделей после введения бычьего коллагена наблюдался одновременно относительно высокий уровень ревматоидного фактора и аутоантител к коллагену в крови, а на 2-ой неделе определялся максимальный уровень ЦИК, тогда как у устойчивых крыс высокий уровень антиколлагеновых антител и ревматоидного фактора в крови во времени не совпадали (рисунок 12Б, 12Г) и ЦИК не выявлялись. Одновременно высокая активность идиотипических и антиидиотипических лимфоцитов, какими являются лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор и аутореактивные лимфоциты к коллагену соответственно, не типична для нормального ответа идиотипических и антиидиотипических лимфоцитов. В норме ИАИ взаимодействия устроены так, что идиотип подавляет образование антиидиотипа, а антиидиотип подавляет продукцию идиотипа, что снимает внутренний конфликт одновременного синтеза значительных количеств взаимодействующих друг с другом идиотипических и антиидиотипических антител, который может привести к образованию из них иммунных комплексов и к иммунокомплексным заболеваниям (Пол У., 1986). Поэтому в качестве гипотезы можно принять, что в результате слабой продукции ревматоидного фактора и недостаточной регуляторной активности ревматоидного фактора в отношении аутореактивных антиколлагеновых лимфоцитов повышение уровня аутоантител к коллагену и ревматоидного

фактора в крови происходит одновременно. Это приводит к формированию из аутоантител к коллагену и ревматоидного фактора циркулирующих иммунных комплексов. В свою очередь уход ревматоидного фактора в ЦИК может усугублять ситуацию слабой продукции ревматоидного фактора. Слабый ответ ревматоидного фактора в ответ на иммунизацию бычьим коллагеном и уход ревматоидного фактора в ЦИК вместе могут обеспечивать длительное поддержание дисрегуляции во идиотип-антиидиотипических взаимодействиях между РФ-продуцирующими лимфоцитами и антиколлагеновыми лимфоцитами с постоянным производством циркулирующих иммунных комплексов. Эти результаты позволяют рассматривать лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор, как мишени для разработки новых средств терапии.

#### **5. Исследование аутоиммунной реакции в математической модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий лимфоцитов**

Как в модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, так и в модели коллаген-индуцированного артрита крыс выявлена особенность кинетики аутоантител, заключающаяся в том, что появление аутоантител опережает рост уровня антител на чужеродный антиген, которым были иммунизированы животные с целью индукции аутоиммунных реакций. С помощью различных методических подходов в настоящем исследовании установлено, что аутоантитела в модели АГА и аутоантитела (ревматоидный фактор) в модели КИА являются антиидиотипическими по отношению к антителам на чужеродный антиген, введение которого инициирует аутоиммунный процесс в данных моделях. Факт раннего появления аутоантител, если их индукция осуществляется опосредовано через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против чужеродного антигена, является новым, ранее не описанным. Принято считать, что сначала появляются идиотипические антитела - антитела, специфичные к

иммуногену, за которыми далее следует спонтанный ответ антиидиотипических, которые могут быть аутоантителами.

Однако, как показало настоящее исследование, правило, что продукция антиидиотипических антител следует за продукцией идиотипических, не выполняется в экспериментальных моделях коллаген-индуцированного артрита крыс и аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, где антиидиотипическими антителами являются аутоантитела. Экспериментальные условия этих моделей были исследованы в математической модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий (Меньшиков И.В., 2004).

В иммунной сети в паре лимфоцитов, связанных в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях, один из клонов был обозначен как аутореактивный, другой как клон, реагирующий на внешний антиген. Исходное состояние сети было установлено как состояние толерантности к постоянно присутствующему аутоантигену (рисунок 14), что нашло отражение в более низком значении активности соответствующих клонов, по сравнению с состоянием активности клонов до введения аутоантигена.

Последующее введение антигена взаимодействующего с лимфоцитом, антиидиотипическим по отношению к аутоклону, вызывает транзиторную аутоиммунную реакцию, что проявилось ростом активности аутоклонов (рисунок 14). Особенностью динамики аутоиммунной реакции (рисунок 14), вызванной через идиотип-антиидиотипические взаимодействия, является то, что аутореактивный клон, являясь антиидиотипическим, отвечает раньше, чем клон, реагирующий на вводимый антиген. Сопоставление полученной теоретической кинетики идиотипических антител (антител на чужое) и антиидиотипических (аутоантител) с кинетикой антител на эритроциты крыс и аутоантител к эритроцитам в модели АГА (рисунок 1) и кинетикой антител к бычьему коллагену и ревматоидного фактора в модели КИА (рисунок 5, 6) указывает на их сходство.

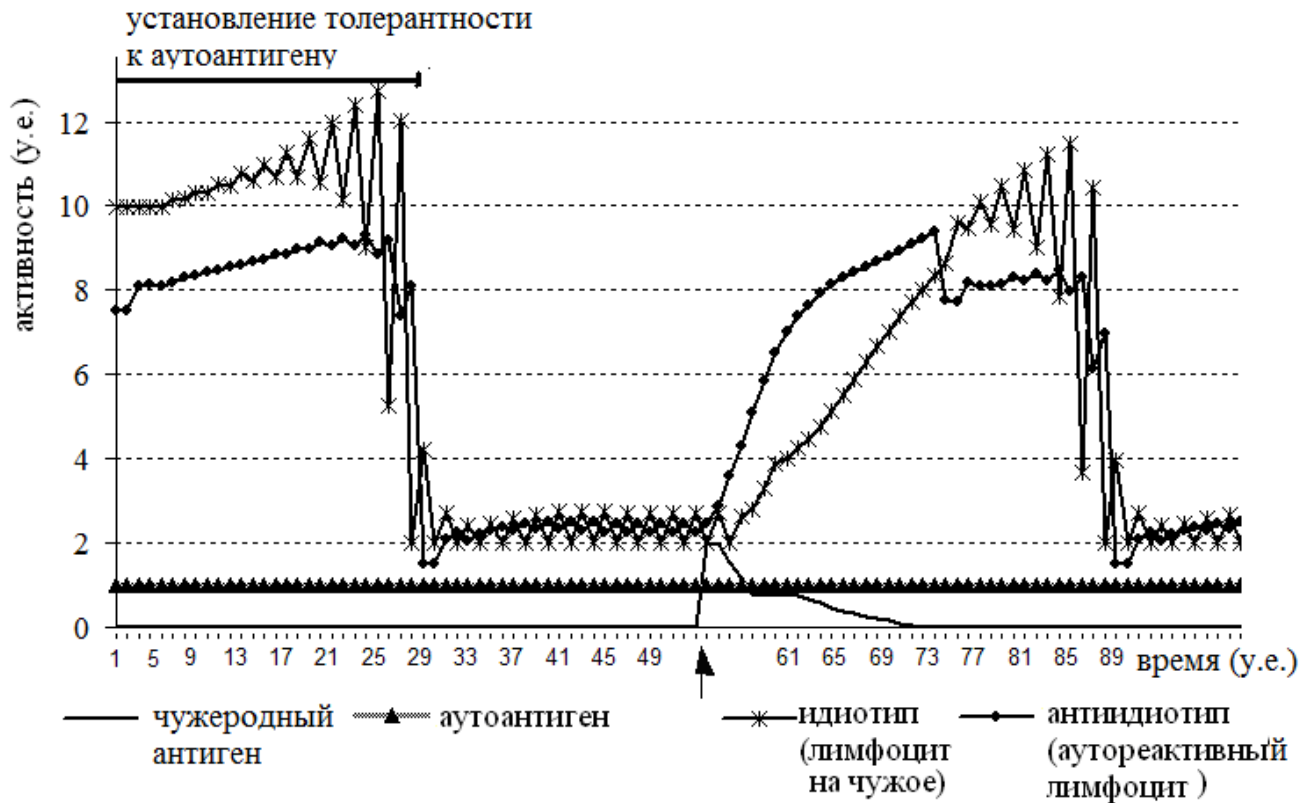


Рисунок 14 - Теоретическая кинетика антиидиотипических (аутореактивных) и идиотипических клонов лимфоцитов при введении гетерологического антигена.

*Примечание: Введение чужеродного антигена показано стрелкой. Представлены активности клонов в условных единицах.*

Ранняя продукция аутоантител может быть проявлением предсуществующей асимметрии в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях между аутореактивным клоном и клоном, реагирующим на чужое. Сущность асимметрии заключается в том, что аутореактивные клоны постоянно испытывают активирующий сигнал со стороны присутствующего в организме аутоантигена, в отличие от связанных с ними антиидиотипических лимфоцитов на чужое, не испытывающих постоянной нагрузки со стороны внешнего антигена. Именно такая асимметрия, как условие, была задана в математической модели введением аутоантигена. Однако активность аутореактивных лимфоцитов находится постоянно под супрессорным контролем антиидиотипических лимфоцитов на чужое. Иммунизация антигеном отвлекает на себя активность контролирующих



лимфоцитов, что немедленно приводит к проявлению активности аутореактивных лимфоцитов. Проявленная активность аутореактивных клонов сдерживает активность идиотипположительных лимфоцитов – лимфоцитов, специфичных к чужеродному антигену, что проявляется в виде запаздывания иммунного ответа на чужеродный антиген.

Более того, выявленный факт раннего появления аутоантител, опережающего образование антител на введенный антиген, указывает на то, что аутоантитела образуются не в результате запуска каскада идиотип-антиидиотипических реакций, как предполагается в работах Shoenfeld Y, 1994, Wun H., 2001. К повышению уровня аутоантител приводит временное снижение активности антиидиотипических лимфоцитов, контролирующей активность аутореактивных лимфоцитов. Таким образом, иммунный ответ аутореактивных лимфоцитов, опережающий иммунный ответ на чужеродный иницирующий антиген, выявленный в двух экспериментальных моделях – модели АГА у мышей, и модели КИА крыс, а также при моделировании аутоиммунной реакции в математической модели иммунной сети, может являться общей особенностью реакции аутореактивных лимфоцитов при их активации через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против чужеродных антигенов.

## **ВЫВОДЫ**

1. В экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной введением эритроцитов крыс, максимумы образования антител к эритроцитам крыс и антиэритроцитарных аутоантител не совпадают во времени. Данный факт указывает на то, что аутоантитела к эритроцитам и антитела к эритроцитам крыс являются продуктами разных клонов лимфоцитов.

2. Между антителами к эритроцитам крыс и аутоантителами к эритроцитам мышей существуют идиотип-антиидиотипические

взаимодействия, выявленные по наличию конкуренции между эритроцитами крыс и аутоантителами к эритроцитам мышей за связывание с антителами к эритроцитам крыс.

3. Принадлежность антиэритроцитарных аутоантител и антител против эритроцитов крыс к разным клонам лимфоцитов, существование идиотип-антиидиотипических взаимодействия между ними подтверждают гипотезу о том, что механизмом развития аутоиммунной гемолитической анемии у мышей является идиотип-антиидиотип опосредованная активация аутореактивных антиэритроцитарных лимфоцитов.

4. Независимый характер кинетики аутоантител к коллагену от кинетики антител к бычьему коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс, вызванного введением бычьего коллагена, а также отсутствие взаимодействия между антителами к бычьему коллагену и коллагеном крыс доказывают, что антитела к бычьему коллагену и аутоантитела к коллагену крыс являются продуктами разных клонов лимфоцитов.

5. Появление антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену в крови крыс, иммунизированных гомологичными Fc-фрагментами IgG, конкурентные отношения между крысиным коллагеном и ревматоидным фактором за связывание с аутоантителами к коллагену крыс, а также конкуренция между бычьим коллагеном и ревматоидным фактором за связывание с антителами к бычьему коллагену в сыворотке крыс, иммунизированных коллагеном быка, свидетельствуют о наличии идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к бычьему коллагену и ревматоидным фактором, а также между аутоантителами к коллагену и ревматоидным фактором.

6. Индукция лимфоцитов, продуцирующих ревматоидный фактор, в модели коллаген-индуцированного артрита опосредована через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами, специфичными к бычьему коллагену. В свою очередь аутоантитела к коллагену образуются

как анти-анти-идиотипические по отношению к антителам, специфичным к бычьему коллагену. Лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор, выступают «проводником» сигнала от лимфоцитов, специфичных к бычьему коллагену, к лимфоцитам, специфичным к аутоколлагену через идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

7. Сравнительный анализ изменения уровня ревматоидного фактора, аутоантител к коллагену у устойчивых крыс и крыс с артритом в период, предшествующий клиническим проявлениям артрита, выявил, что развитие артрита ассоциировано со слабой и непродолжительной продукцией ревматоидного фактора, сопровождающейся ростом антиколлагеновых антител, тогда как у крыс устойчивых к артриту выявлен интенсивный и длительный рост уровня ревматоидного фактора в ответ на иммунизацию бычьим коллагеном, сопровождающийся латентным периодом в образовании антиколлагеновых антител. Данные факты свидетельствуют о вовлечении ревматоидного фактора в физиологическую регуляцию антиколлагеновых лимфоцитов через идиотип-антиидиотипические взаимодействия.

8. Ранняя продукция аутоантител, опережающая рост уровня антител на вводимый чужеродный антиген, инициирующий аутоиммунный процесс, выявленная в моделях аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, коллаген-индуцированного артрита крыс, при исследовании аутоиммунной реакции в математической модели идиотип-антиидиотипических взаимодействий, может являться общей особенностью реакции аутореактивных лимфоцитов при их активации через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против чужеродных антигенов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АА – адьювантный артрит

АГА – аутоиммунная

гемолитическая анемия

БК – бычий коллаген II типа

ЗФР – забуференный

физиологический раствор

ИАИ – идиотип-

антиидиотипические

взаимодействия

ИФА – иммуноферментный анализ

КИА – коллаген-индуцированный

артрит

КК – крысиный коллаген II типа

НАФ – неполный адьювант

Фрейнда

ОП – оптическая плотность

ПАФ – полный адьювант Фрейнда

РА – ревматоидный артрит

РАЭ – реакция агглютинации

эритроцитов

РТГА – реакция торможения

гемагглютинации

РФ – ревматоидный фактор

ЦИК – циркулирующие иммунные

комплексы

ЭК – эритроциты крыс

ЭМ – эритроциты мышей

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Меньшиков И.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия как механизм индукции и развития аутоиммунных реакций. Экспериментальные исследования на модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, А.В. Лебедев, В.В. Иванов // Иммунология. - 2006. - № 2. - С.73-76.

2. Меньшиков И.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия в патогенезе СПИДа / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева // Иммунология. – 2006. - № 5. - С. 316-321.

3. Бедулева Л.В. Идиотип–антиидиотипические взаимодействия как механизм развития коллаген-индуцированного артрита у крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2006. – № 3 – 1 (14). - С. 14-17.

4. Бедулева Л.В. Механизм развития аутоиммунной реакции к коллагену, роль ревматоидного фактора при коллаген-индуцированном артрите у крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, Е.А. Лобынцев // Иммунология. – 2007. - № 1. - С. 24-27.

5. Menshikov I. Evidence in favor of a role of idiotypic network in autoimmune hemolytic anemia induction: theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva // Int Immunol. – 2008. - Vol. 20, № 2. - P. 193-198.

6. Бедулева Л.В. Иммунная сеть в патогенезе аутоиммунных заболеваний / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Успехи физиологических наук. – 2008. - № 1. - С. 55-67.

7. Бедулева Л.В. Дисрегуляция в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях как причина коллаген-индуцированного артрита крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Иммунология. – 2008. - № 4. - С. 214-217.

Публикации в других периодических изданиях, учебных пособиях, сборниках статей и т.п.

8. Бедулева Л.В. Исследование динамики иммунного ответа при получении полиспецифических антисывороток / Л.В. Бедулева, М.В. Капралова, И.В. Капралова // Тез. докл. XVIII Съезда Физиологического общества имени Павлова. – Казань, 2001. - С. 308.

9. Меньшиков И.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия как механизм развития аутоиммунных реакций / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева // Научные труды I съезда физиологов СНГ. – М., 2005. - Т.1. - С.109.

10. Меньшиков И.В. Иммунная сеть и механизмы развития аутоиммунных реакций / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, А.В. Лебедев // Иммунология Урала: мат. IV конф. иммунологов Урала. – 2005. - № 1(4). - С. 19.

11. Меньшиков И.В. Экспериментальные и теоретические исследования идиотип-антиидиотипических взаимодействий в механизмах развития аутоиммунных реакций / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, В.В. Иванов // Медицинская иммунология. - 2006. - Т.8, № 2-3. - С. 157.

12. Бедулева Л.В. Динамика образования антител к коллагену и ревматоидного фактора при коллаген-индуцированном артрите у крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Иммунология Урала : мат. V конф. иммунологов Урала. - 2006. - № 1(5). - С. 2-3.

13. Бедулева Л.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия в патогенезе коллаген-индуцированного артрита у крыс / Л.В. Бедулева, Н.Н. Лекомцева // Материалы 4 съезда биотехнологов. - Пущино, 2006. - С. 26.

14. Бедулева Л.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия в экспериментальных моделях аутоиммунной гемолитической анемии и коллаген-индуцированного артрита / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Тез. докл. XX Съезда Физиологического общества им. Павлова. – М., 2007. - С. 142.

15. Меньшиков И.В. Иммунная сеть в механизмах иммунорегуляции. Теоретические и экспериментальные исследования / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, В.В. Иванов // Математика. Компьютер. Образование. – М.; Ижевск, 2007. - Вып.14. - С. 171.

16. Бедулева Л.В. Исследование кинетики идиотипических и антиидиотипических антител при коллаген-индуцированном артрите крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, Н.Н. Лекомцева // Иммунология Урала: мат. VI конф. иммунологов Урала. – 2007. - № 1 (6). - С. 3

17. Иванов В.В. Использование математической модели иммунной сети для объяснения особенностей динамики иммунного ответа на введение аллоантигена у мышей / В.В. Иванов, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Иммунология Урала: мат. VI конф. иммунологов Урала. - 2007. - № 1 (6). - С. 13

18. Лекомцева Н.Н. Экспериментальная модель аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, вызванной введением аллогенных эритроцитов мыши / Н.Н. Лекомцева, И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева // Иммунология Урала: мат. VI конф. иммунологов Урала. - 2007. - С. 15.

19. Бедулева Л.В. Механизм индукции и роль ревматоидного фактора, аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита у крыс / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, В.В. Иванов, Н.Н. Лекомцева // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: тез. докл. VIII межд. конгресса. – М., 2007. – С. 37

20. Меньшиков И.В. Роль идиотип-антиидиотипических взаимодействий лимфоцитов в индукции аутореактивных клонов при экспериментально вызванной аутоиммунной гемолитической анемии у мышей / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева, В.В. Иванов // Российский иммунологический журнал. - 2008. - Т.2, №2-3. - С 235.

21. Бедулева Л.В. Механизм индукции ревматоидного фактора при коллаген-индуцированном артрите Российский иммунологический журнал / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, И.М. Моисеева, М.А. Борисова // Российский иммунологический журнал. - 2008. - Т.2., №2-3. - С. 231.

22. Лекомцева Н.Н. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия между аутоантителами к эритроцитам и антителами к эритроцитам крыс / Н.Н. Лекомцева, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, А.Е. Шмыков // Российский иммунологический журнал. - 2008. - Т.2, №2-3. - С. 234.

23. Beduleva L. Idiotypic dysregulation as a cause of collagen–induced arthritis. A new viewpoint on the mechanism of immunological tolerance loss / L. Beduleva, I. Menshikov // 6<sup>th</sup> International congress on autoimmunity. – Porto, 2008. - P.908.

24. Menshikov I. Evidence in favor of a role of idiotypic network in autoimmune hemolytic anemia induction: theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva // 6<sup>th</sup> International congress on autoimmunity. - Porto, 2008. - P.909.

25. Меньшиков И.В. Практикум по экспериментальному моделированию в иммунологии: учебное пособие / И.В. Меньшиков, Л.В. Бедулева. - Ижевск, 2008. – 101 с.

#### Патенты

26. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Применение Fc-фрагментов IgG человека в качестве вакцины для лечения ревматоидного артрита, вакцина и способ лечения на ее основе // Заявка на патент РФ 2008138592 от 29.09.2008.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Российской Федерации Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008 годы)». Проект «Разработка модели организации иммунной сети, как ключевого механизма иммунорегуляции. Теоретическое и экспериментальное обоснование»; грантом РФФИ «Участие молодых российских ученых в научных мероприятиях, проводимых за рубежом», 2008 г.