

**РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА КРЫС**

Иванов П. В. ¹,
Сидоров А. Ю. ^{1, 2},
Терентьев А. С. ^{1, 2},
Черепанов И. С. ¹

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия.

² ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия.

**REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN RAT EXPERIMENTAL
MODEL OF SJOGREN'S SYNDROME**

Ivanov P. V. ^a,
Sidorov A. Yu. ^{a, b},
Terentiev A. S. ^{a, b},
Cherepanov I. S. ^a

^a Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation.

^b Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Izhevsk, Russian Federation.

Резюме

Ранее нами был обнаружен новый фактор регуляции аутореактивности, получивший название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ). Он представлен популяцией антиидиотипических антител, которые объединяет наличие общего паратопа, специфичного к PD1 молекуле. РегРФ оказывает цитотоксическое действие на активированные PD-1+ CD4 Т лимфоциты, посредством которого контролирует экспансию лимфоцитов. Было замечено, что продукция регРФ в период индукции таких экспериментальных аутоиммунных заболеваний, так коллаген-индуцированный артрит, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит и атеросклероз крыс предотвращает развитие заболевания. Ассоциация между регРФ и устойчивостью к развитию заболевания предполагает, что стимуляция продукции регРФ может быть эффективным средством лечения данных аутоиммунных заболеваний, чему были получены экспериментальные доказательства. Синдром Шегрена (СШ) - аутоиммунное заболевание, сопровождающее другие аутоиммунные заболевания или возникающее самостоятельно. При СШ поражаются слюнные железы (СЖ) и может развиваться лимфоцитопения. Является ли регуляторный ревматоидный фактор фактором устойчивости крыс к развитию синдрома Шегрена и может ли быть использована стимуляция продукции регРФ для лечения синдрома Шегрена не известно.

Целью данной работы было выяснение роли регуляторного ревматоидного фактора в обеспечении устойчивости крыс к развитию синдрома Шегрена.

Материалы и методы: СШ индуцировали у крыс Wistar иммунизацией белками, выделенными из слюнных желез мыши. Ежедневно до и после иммунизации забирали кровь из хвостовой вены. Гистологический анализ поднижнечелюстных слюнных желез проводили через 12 недель после первой иммунизации. В сыворотке крови определяли уровень регРФ методом пассивной гемагглютинации таннизированных нагруженных IgG эритроцитов, а также уровень аутоантител к CD4 методом ИФА. В крови измеряли количество CD3, CD4 и CD8 лимфоцитов методом проточной цитометрии.

Полученные результаты: У 40% крыс иммунизированных белками слюнных желез мыши выявлены повреждения слюнных желез, характерные для неспецифического хронического сиалоаденита, развивающегося при синдроме Шегрена. У 50% крыс в ответ на иммунизацию белками СЖ мыши развивалась хроническая CD3, CD4 и CD8 лимфоцитопения. Аутоантитела к CD4 у крыс с CD4 лимфоцитопенией найдены не были. Выявлена ассоциация между высоким уровнем регуляторного ревматоидного фактора на 7 день после иммунизации белками слюнных желез мыши и устойчивостью крыс к сиалоадениту. Однако развитие лимфоцитопении не зависело от продукции регРФ в период индукции синдрома Шегрена.

Обсуждения и выводы: Таким образом, регуляторный ревматоидный фактор является фактором устойчивости крыс к развитию сиалоаденита, но не лимфоцитопении в модели синдрома Шегрена.

Ключевые слова: синдром Шегрена, ревматоидный фактор, лимфоцитопения, иммунорегуляция, аутоантитела, Т-лимфоциты.

Abstract

Earlier, we discovered a new factor of autoreactivity regulation called regulatory rheumatoid factor (regRF), which is represented by a population of anti-idiotypic antibodies that have a common paratope specific to the PD1 molecule. RegRF has a cytotoxic effect on activated PD-1+CD4 T lymphocytes and controls the lymphocytes expansion. Its production during the induction period prevents experimental autoimmune diseases in rats. The association between regRF and resistance to the diseases suggests that regRF stimulation may be an effective treatment of autoimmune diseases. Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune disease that may follow other autoimmune diseases or occur independently. In SS, salivary gland (SG) lesions and lymphocytopenia may develop. It is not known whether the regulatory rheumatoid factor is a resistance factor to Sjögren's syndrome, and whether regRF stimulation can be used to treat this condition. The aim of this study was to clarify the role of regRF in ensuring resistance to Sjogrens syndrome in rats. SS was induced in Wistar rats through immunization with proteins isolated from mouse salivary glands. Blood samples were taken from the caudal vein each week before and after the immunization. Histological analysis of submandibular salivary gland tissue was performed 12 weeks after the initial immunization. Autoantibodies to CD4 were detected in serum by ELISA; regRF levels were measured by agglutination of IgG-coated erythrocytes; CD3, CD4 and CD8 lymphocyte counts were determined by flow cytometry in blood samples.

40% of rats immunized with mouse salivary gland proteins, salivary gland lesions typical of sialoadenitis occurring in Sjogren's syndrome have been detected. 50% of rats developed chronic CD3, CD4 and CD8 lymphocytopenia in response to immunization with mouse SG proteins. No autoantibodies to CD4 have been found in rats with CD4 lymphocytopenia. An association has been found between a high level of regulatory rheumatoid factor on day 7 following immunization with mouse salivary gland proteins and resistance to sialadenitis in rats. However, lymphocytopenia did not depend on regRF production during induction of Sjögren's syndrome. Thus, regulatory rheumatoid factor is a resistance factor to sialoadenitis, but not to lymphocytopenia in rat Sjogren's syndrome model.

Keywords: Sjogren's syndrome, rheumatoid factor, lymphocytopenia, immune regulation, autoantibodies, CD4.

1 Введение

Регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) - популяция антиидиотипических антител, направленных к уникальным антигенсвязывающим участкам Т- и В-клеточных рецепторов лимфоцитов. Особенностью регРФ, отличающих его от других антиидиотипических антител является наличие общего паратопа, специфичного к молекуле PD-1 [2], обеспечивающего механизм иммуносупрессивного действия регРФ. Регуляторный ревматоидный фактор оказывает цитотоксическое действие на активированные PD-1-экспрессирующие CD4-лимфоциты, которые при ряде аутоиммунных заболеваний выполняют основные эффекторные функции, либо активируют CD8-лимфоциты [2, 7]. В экспериментальных моделях коллаген-индуцированного артрита, аутоиммунного энцефаломиелита и атеросклероза крыс продукция регРФ в период индукции заболевания предотвращает их развитие [1]. Стимуляции продукции регРФ Fc фрагментами гомологичного IgG была применена для успешной терапии экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний [6].

Синдром Шегрена (СШ) представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии. Как у людей, так и в экспериментальных моделях синдром Шегрена характеризуется инфильтрацией и повреждением тканей слюнных желез (СЖ) CD4-лимфоцитами и В-лимфоцитами [4]. Предполагается, что основными аутоиммунными мишенями при СШ являются ацинарные, вставочные и исчерченные протоковые эпителиальные клетки [9]. Примерно у 5 % пациентов с синдромом Шегрена диагностируется идиопатическая CD4 Т лимфоцитопения, не связанная с иммунодефицитом или терапией, влияющей на уровень CD4 Т клеток. Кроме CD4 лимфоцитопении, может иметь место и снижение количества CD8 Т лимфоцитов в периферической крови [8]. Типичными серологическими показателями при СШ являются гиперглобулинемия, анти-Ro/SSA антитела у 33%–74% и анти-La/SSB антитела у 23%–52%, антинуклеарные антитела у 59%–85%, ревматоидный фактор у 36%–74% пациентов [5].

Является ли регРФ фактором устойчивости крыс к развитию синдрома Шегрена и может ли быть использована стимуляция продукции регРФ для лечения синдрома Шегрена, не известно.

Целью работы было выяснение роли регуляторного ревматоидного фактора в модели синдрома Шегрена.

2 Материалы и методы

Для индукции синдрома Шегрена 6 крыс Wistar были иммунизированы внутрикожно белками слюнных желез мышей (по 100 мкг белка). Крысы получили 3 инъекции с интервалом в 1 неделю, первые две в составе ПАФ, третью – в составе НАФ. 3 крысы контрольной группы получили инъекцию ПАФ. До и после иммунизации у животных еженедельно забирали кровь, определяли уровень регуляторного ревматоидного фактора, аутоантител к CD4, количество CD3, CD4 и CD8 Т лимфоцитов. Через 12 недель после

первой иммунизации проводили гистологический анализ подчелюстных слюнных желез.

Гистологические срезы готовили по стандартной методике и окрашивали гематоксилином-эозином.

Белки для иммунизации готовили из слюнных желез мыши, смешивали с ПАФ или НАФ в соотношении 1:1 до получения стойкой эмульсии.

Кровь забирали из хвостовой вены под легкой эфирной анестезией перед иммунизацией и еженедельно в течение всего эксперимента.

Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX Beckman Coulter в суспензии мононуклеров, выделенных из свежей крови на фиколле, после добавления к ним антител к CD3- PE/Elab Fluor® 594, к CD4-PE/Cyanine7, к CD8-PE/Cyanine5.5 (Elabscience).

Регуляторный ревматоидный фактор определяли в реакции пассивной гемагглютинации фиксированных танализированных нагруженных IgG крысы эритроцитов человека.

IgG крысы выделяли из сыворотки крови интактных крыс осаждением сульфатом аммония и эксклюзионной хроматографией.

Наличие и уровень антител к рекомбинантному CD4 белку крысы, определяли методом непрямого твердофазного ИФА.

Статистический анализ проведен с использованием ПО GraphPad Prism. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Гистопатологические изменения в слюнных железах выявлены у 40% крыс. Обнаружены множественные очаги гиперплазии протокового эпителия, а также визуальное расширение зернистых протоков, что соответствует повреждению эпителия в них (рис. 1А). Выявленное увеличение просвета протоков характерно для неспецифического хронического сиалоаденита, развивающегося у пациентов с синдромом Шегрена [3]. Гиперплазия эпителия протоков, в свою очередь, служит показателем лимфоэпителиальных поражений, возникающих при СШ [3].

На основании гистопатологической картины крысы были разделены на две группы – с изменениями в слюнных железах и без изменений.

Сравнительный анализ уровня регуляторного ревматоидного фактора в группах с изменениями в слюнных железах и без изменений показал что, у животных без изменений в СЖ происходило увеличение уровня регРФ на 7 день после иммунизации белками-индукторами СШ ($p \leq 0,05$), у крыс с изменениями в СЖ, характерными для синдрома Шегрена, уровень регРФ в ответ на иммунизацию не изменялся (рисунок 1.В). Таким образом выявлена ассоциация между высоким уровнем регуляторного ревматоидного фактора в период индукции синдрома Шегрена и устойчивостью крыс к сиалоадениту.

У половины крыс, иммунизированных белками слюнных желез мыши, выявлена хроническая лимфоцитопения. Снижению подверглись и CD4 и CD8 Т лимфоциты (рисунок 2.В, 2Б). Аутоантитела к CD4 не были найдены у крыс

с CD4 лимфоцитопенией (рисунок 2.В). Возможно, аутоиммунная атака в модели Шегрена направлена против дифференцированных антигенов Т лимфоцитов.

Чтобы выяснить, играет ли регРФ роль в обеспечении устойчивости крыс к развитию Т лимфоцитопении, был проведен сравнительный анализ уровня регРФ у крыс с лимфоцитопенией и без неё. Обнаружено, что развитие Т лимфоцитопении не зависит от продукции регРФ в период индукции синдрома Шегрена (рисунок 2.Г).

4 Выводы

В экспериментальной модели синдрома Шегрена крыс продукция регуляторного ревматоидного фактора в период индукции заболевания предотвращает развитие неспецифического хронического сиалоаденита, но не влияет на развитие Т лимфоцитопении у крыс.

РИСУНКИ

Рисунок 1. А, Б – Срезы поднижнечелюстных слюнных желез крыс, иммунизированных гетерологичным гомогенатом слюнных желез мыши. А. Крысы с гистопатологическими изменениями, подобными синдрому Шегрена. Б. Крысы без изменений. Окраска - Н&Е. *- места разрушения эпителия зернистых протоков. Стрелки - очаги гиперплазии. В - Кинетика регуляторного ревматоидного фактора у крыс с изменениями в слюнных железах, чувствительных к развитию синдрома Шегрена и крыс без изменений в слюнных железах, резистентных к развитию синдрома Шегрена. Каждая точка представлена как среднее $\pm$ SD. * - $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

Figure 1. A, B – Sections of the submandibular salivary glands of rats immunized with heterologous homogenate of mouse salivary glands. A. Rats with histopathological changes similar to Sjogren's syndrome. B. Rats without changes. Coloring - N&E. *- sites of destruction of the epithelium of granular ducts. Arrows - foci of hyperplasia. C - Kinetics of regulatory rheumatoid factor in rats with changes in salivary glands sensitive to the development of Sjogren's syndrome and rats without changes in salivary glands resistant to the development of Sjogren's syndrome. Each point is represented as the average $\pm$ SD. * - $p < 0.05$, Mann-Whitney criterion.

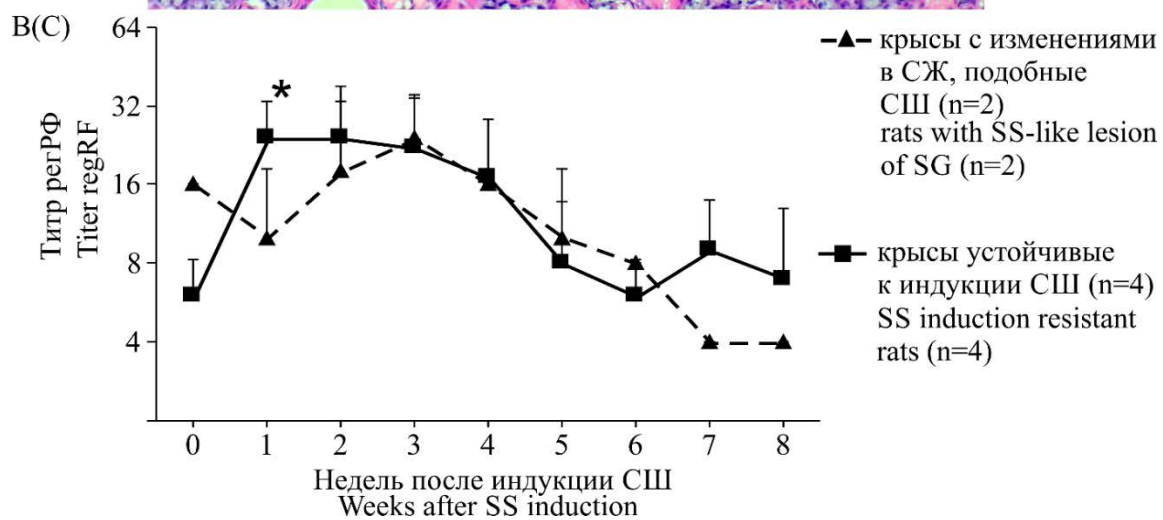
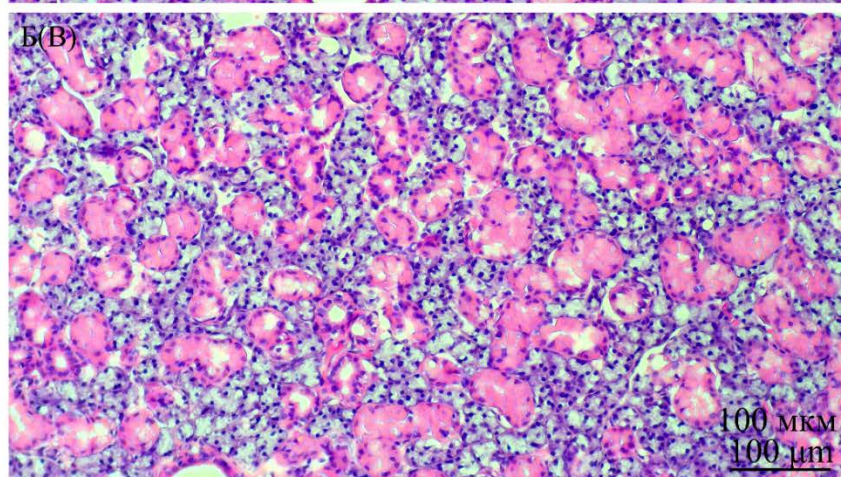
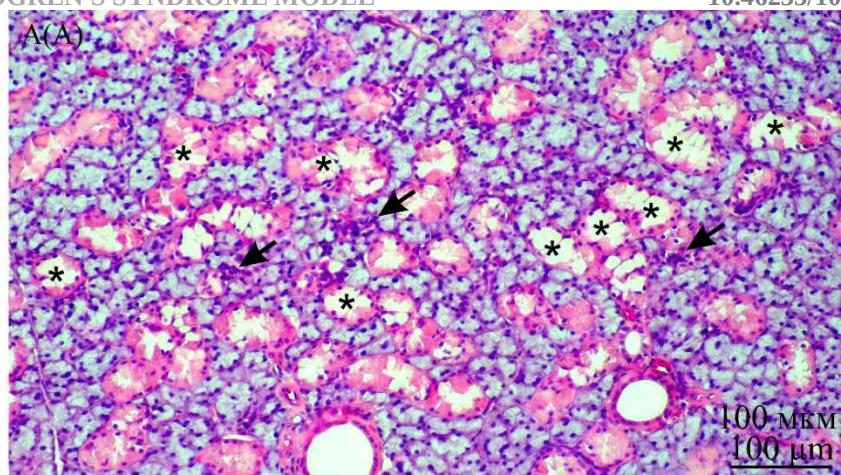
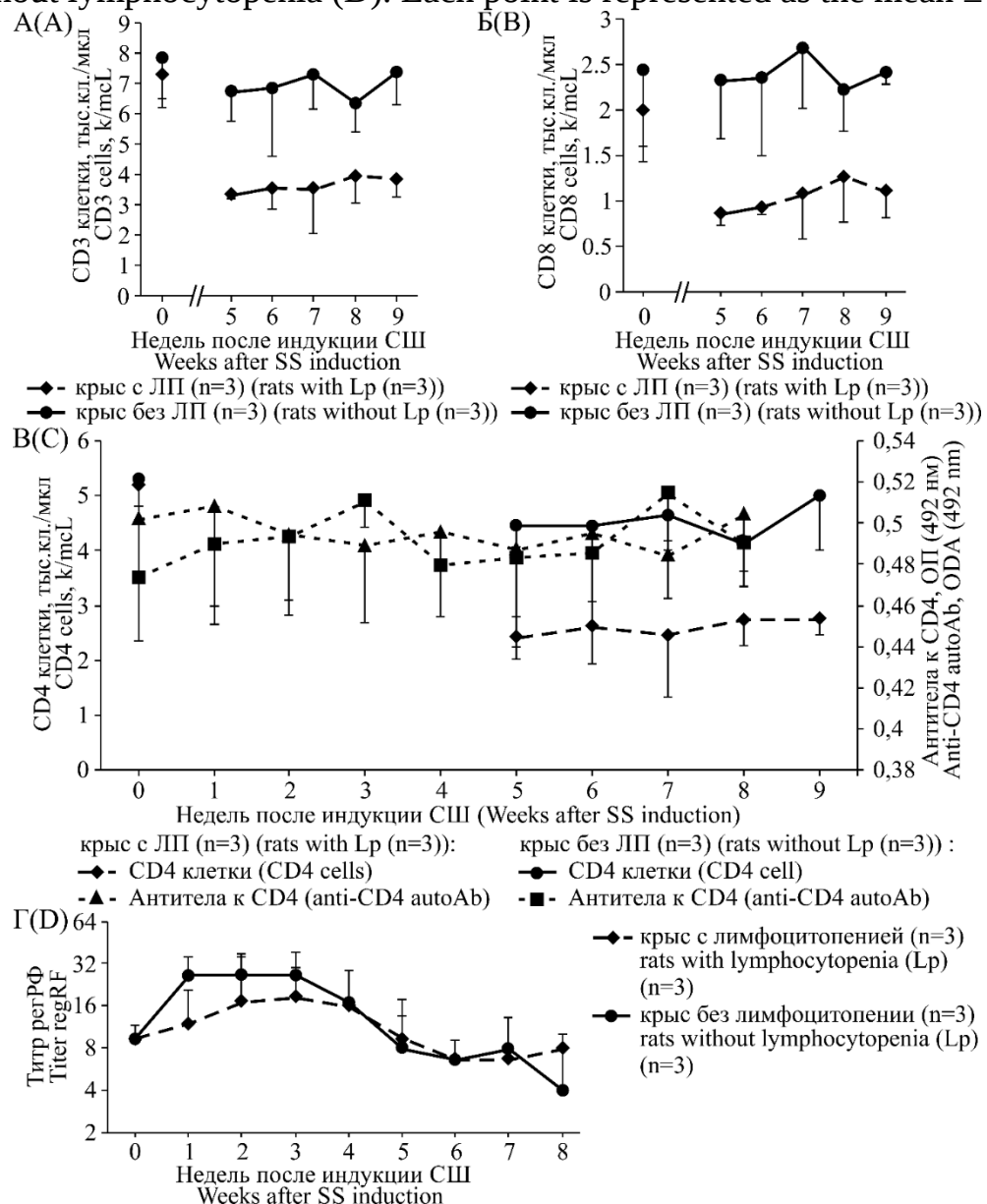


Рисунок 2. Количество CD3 Т лимфоцитов (А), CD8 Т лимфоцитов (Б) и CD4 Т лимфоцитов (В) в крови крыс, иммунизированных гомогенатом слюнных желез мыши. Кинетика аутоантител к CD4 у крыс с CD4 Т-лимфоцитопенией и без нее (В). Кинетика регуляторного ревматоидного фактора у крыс с лимфоцитопенией и без нее (Г). Каждая точка представлена как среднее $\pm$ SD.

Figure 2. The number of CD3 T lymphocytes (A), CD8 T lymphocytes (B) and CD4 T lymphocytes (C) in the blood of rats immunized with mouse salivary gland homogenate. Kinetics of CD4 autoantibodies in rats with and without CD4 T-lymphocytopenia (B). Kinetics of regulatory rheumatoid factor in rats with and without lymphocytopenia (D). Each point is represented as the mean $\pm$ SD.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Иванов Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия
Адрес для переписки: Иванов Павел Владимирович. ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»;

адрес: 426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1;

факс: 8(3412)916426;

телефон: 8(3412)916426;

e-mail: aka.ven1k@gmail.com

Ivanov P.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Address for correspondence: Pavel V. Ivanov. Udmurt State University;

address: 1 Universitetskaya St, Izhevsk, 426034 Russian Federation;

fax: 8(3412)916426;

telephone: 8(3412)916426;

e-mail: aka.ven1k@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Сидоров Александр Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия;

Sidorov Alexandr Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Senior Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation;

Терентьев Алексей Семенович, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Ижевск, Россия;

Terentiev Alexey S., Senior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University; Research Associate, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian Federation;

Черепанов Игорь Сергеевич, кандидат химических наук, доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия;

Cherepanov Igor S., PhD (Chemistry), Associate Professor, Department of Fundamental and Applied Chemistry, Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation;

Блок 3. Метаданные статьи

РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА КРЫС
REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN RAT EXPERIMENTAL MODEL
OF SJOGREN'S SYNDROME

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

РЕГРФ В МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА
REGRF IN SJOGREN'S SYNDROME MODEL

Ключевые слова: синдром Шегрена, ревматоидный фактор, лимфоцитопения, иммунорегуляция, аутоантитела, Т-лимфоциты.

Keywords: Sjogren's syndrome, rheumatoid factor, lymphocytopenia, immune regulation, autoantibodies, CD4.

Иммунологические чтения в Челябинске 2025.

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

25.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядк овый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английско м	Полный интернет-адрес цитируемой статьи или ее doi. (URL)
1	Beduleva L, Menshikov I, Stolyarova E, Fomina K, Lobanova O, Ivanov P, Terentiev A. Rheumatoid factor in idiopathic regulation of autoimmunity. Int J Rheum Dis., 2015, Vol. 18, no. 4, pp. 408-20.	-	https://doi.org/10.1111/1756-185X.12335
2	Khramova T, Beduleva L, Sidorov A, Terentiev A, Menshikov I. Regulatory Rheumatoid Factor is Specific to PD-1 and Uses PD-1 Pathway to Control CD4 T Lymphocytes. Immunol Invest., 2023, Vol. 52, no. 7, pp.897-908.	-	https://doi.org/10.1080/08820139.2023.2250818
3	Liao R, Yang HT, Li H, Liu LX, Li K, Li JJ, Liang J, Hong XP, Chen YL, Liu DZ. Recent Advances of Salivary Gland Biopsy in Sjögren's Syndrome. Front Med (Lausanne)., 2022, Vol. 8, pp. 792593.	-	https://doi.org/10.3389/fmed.2021.792593
4	Negrini S, Emmi G, Greco M, Borro M, Sardanelli F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. Sjögren's syndrome: a	-	https://doi.org/10.1007/s10238-021-00728-6

	systemic autoimmune disease. Clin Exp Med., 2022, Vol. 22, no. 1, pp. 9-25.		
5	Patel R, Shahane A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. Clin Epidemiol., 2014, Vol. 6, pp. 247-55.	-	https://doi.org/10.2147/CLEP.S47399
6	Sidorov A, Beduleva L, Menshikov I, Terentiev A, Stolyarova E, Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inducer of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. Int J Biol Macromol., 2017, Vol. 95, pp. 938-945.	-	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.081
7	Stolyarova E, Beduleva L, Menshikov I, Snigiryev A, Khramova T. Mechanism by which Regulatory Rheumatoid Factor Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets., 2018, Vol. 18, no. 6, pp.596-601.	-	https://doi.org/10.2174/1871530318666180308123350
8	Sudzius G, Mieliauskaite D, Siaurys A, Viliene R, Butrimiene I, Characiejus D, Dumalakiene I. Distribution of Peripheral Lymphocyte Populations in Primary Sjögren's Syndrome Patients. J Immunol Res.. 2015, Vol. 2015, pp.:854706.	-	https://doi.org/10.1155/2015/854706
9	Yura Y, Hamada M. Outline of Salivary Gland Pathogenesis of Sjögren's Syndrome and Current Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci. 2023, Vol. 24, no. 13, pp. 11179.	-	https://doi.org/10.1371/10.3390/ijms241311179

