

# РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В КРОВИ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ, АКТИВИРОВАННЫМИ *IN VITRO* ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

**Кряжевских А.В., Абишева Н.Н.**

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

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

**Резюме.** Поиск подходов для решения проблем острого и хронического отторжения трансплантата, преодоления тканевой несовместимости, является одним из важных вопросов клинической трансплантологии и регенеративной медицины. Индукция толерантности к естественным и искусственным трансплантационным антигенам является желаемой целью уже не одно столетие. Недавно было показано, что антилимфоцитарные антитела к активированным лимфоцитам, названные регуляторным ревматоидным фактором (регРФ), участвуют в контроле аутореактивных лимфоцитов в норме, поддерживая естественную толерантность. Было отмечено, что относительно быстрый подъем уровня регРФ в крови (3-5-й день) после иммунизации наблюдается при аутооттрансплантации. Также его раннее повышение ассоциировано с нечувствительностью животных к экспериментально вызываемым аутоиммунным заболеваниям. Целью нашего исследования было выяснить, возможно ли индуцировать продукцию регРФ у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши). Для этого одну группу крыс иммунизировали внутривенно смешанной культурой аутологичных и гетерологичных (мышинных) лимфоцитов (СКЛ), после 5 дней совместной инкубации. Другую группу иммунизировали только лимфоцитами мыши. РегРФ в крови определяли на 3-й, 5-й, 7-й, 14-й, 21-й, 28-й и 35-й дни после иммунизации. Предполагали, что внутривенное введение крысам активированных в СКЛ аутологичных лимфоцитов крыс и лимфоцитов мышей вызовет ранний ответ регРФ на аутологичные лимфоциты и более поздний на гетерологичные лимфоциты мыши. По средним данным титр регРФ в ответ на иммунизацию крыс мышинными лимфоцитами практически не изменялся, однако только на 7-й день отмечается значительное увеличение стандартного отклонения, что указывает на ярко выраженный индивидуальный характер реакции крыс на введение гетерологичных мышинных лимфоцитов. Иммунизация животных

## Адрес для переписки:

Кряжевских Анастасия Вадимовна  
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»  
426034, Россия, Удмуртская Республика,  
г. Ижевск, ул. Университетская, 1.  
Тел./факс: 8 (3412) 91-64-26.  
E-mail: krav526@gmail.com

## Address for correspondence:

Anastasia V. Kryazhevskikh  
Udmurt State University  
1 Universitetskaya St  
Izhevsk, Udmurt Republic  
426034 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (3412) 91-64-26.  
E-mail: krav526@gmail.com

## Образец цитирования:

А.В. Кряжевских, Н.Н. Абишева «Регуляторный ревматоидный фактор в крови крыс, иммунизированных аутологичными лимфоцитами, активированными *in vitro* гетерологичными лимфоцитами» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 449-454.  
doi: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

© Кряжевских А.В., Абишева Н.Н., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

A.V. Kryazhevskikh, N.N. Abisheva "Rheumatoid regulatory factor in the blood of rats immunized with autologous lymphocytes, activated *in vitro* by heterologous lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 449-454.  
doi: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

© Kryazhevskikh A.V., Abisheva N.N., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17142-RRF

СКЛ вызвала двухфазный подъем регРФ в крови, на 5-й и 21-й дни. Повышение регРФ на 5-й день после иммунизации СКЛ свидетельствует о реакции на активированные гетерологичным антигеном аутологичные лимфоциты. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейших исследований, направленных на разработку методов индукции приобретенной толерантности.

*Ключевые слова:* аутологичные лимфоциты, гетерологичные лимфоциты, смешанная культура лимфоцитов, регуляторный ревматоидный фактор, аутотрансплантация, ксенотрансплантация

## RHEUMATOID REGULATORY FACTOR IN THE BLOOD OF RATS IMMUNIZED WITH AUTOLOGOUS LYMPHOCYTES, ACTIVATED *IN VITRO* BY HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES

Kryazhevskikh A.V., Abisheva N.N.

*Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation*

*Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation*

**Abstract.** The approaches to prevention of acute and chronic transplant rejection are among the important challenges in clinical transplantology and regenerative medicine. For more than a century, induction of tolerance to natural and artificial transplant antigens has been a desired goal. Recently, anti-lymphocytic antibodies to activated lymphocytes, called regulatory rheumatoid factor (regRF), are shown to be involved in control of autoreactive lymphocytes under normal conditions, thus maintaining natural immune tolerance. A relatively rapid increase in the level of regRF in the blood (3-5 days) after immunization is observed during autotransplantation. Its early rise is also associated with non-reactivity of animals to experimentally induced autoimmune disorders. The aim of our study was to search an opportunity of regRF production in rats by injecting autologous lymphocytes activated *in vitro* by a heterologous antigen (murine lymphocytes). To achieve this result, a group of rats was immunized intravenously with a mixed culture of autologous and heterologous (murine) lymphocytes (MLC), after 5 days of co-incubation. Another group was immunized with murine lymphocytes only. RegRF in the blood was determined by days 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 35 after immunization. It was hypothesized that the intravenous injection of autologous MLC-activated rat lymphocytes and mouse lymphocytes to the rats would cause an early regRF response to autologous lymphocytes, and a later response to heterologous mouse lymphocytes. On average, the regRF titer in rats following immunization with murine lymphocytes did not show significant changes. However, a significant increase in the standard deviation was seen only on day 7, thus indicating to a pronounced individual response of rats to the injection of heterologous murine lymphocytes. Immunization of animals with MLC-activated cells caused a two-phase increase of regRF in blood observed on days 5 and 21. An increase in regRF on day 5 after MLC immunization suggests a response to autologous lymphocytes activated by a heterologous antigen. The obtained results open up a prospect for further research aimed at developing novel techniques for inducing acquired tolerance.

*Keywords:* autologous lymphocytes, heterologous lymphocytes, mixed lymphocyte culture, regulatory rheumatoid factor, autotransplantation, xenotransplantation

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FEWS-2024-0002).

### Введение

Отторжение трансплантата, вне зависимости от его природы, является одной из главных проблем, которая сдерживает развитие клинической

трансплантологии. Приоритетной задачей в области трансплантологии и иммунологии остается поиск способов индукции иммунологической толерантности у реципиентов к трансплантатам. Наряду с исследованиями в области иммуносупрессивной терапии, в настоящее время разрабатываются альтернативные подходы к индукции иммунологической толерантности на основе клеточных технологий [2, 8]. В некоторых экспе-

риментальных моделях на животных удалось достигнуть толерантность к аллотрансплантатам солидных органов, но последовательное формирование толерантности у пациентов все еще остается труднодостижимой целью. Установлено, что для обеспечения острого отторжения большинства аллотрансплантатов необходимы мощные адаптивные иммунные реакции, инициированные провоспалительными Т-клетками, активированными через прямые и непрямые пути во вторичных лимфоидных органах [5].

Изучение методов индукции приобретенной толерантности к естественным и искусственным антигенам невозможно без понимания механизмов формирования и поддержания в ходе онтогенеза естественной толерантности к собственным антигенам. В ряде экспериментов показано, что толерантность можно индуцировать длительным введением малых доз антигена или однократным введением большой дозы антигена [3, 6]. Также много работ посвящено роли Treg клеткам в индукции и поддержании толерантности [9, 11, 12]. Вместе с тем активно развиваются методы тканевого типирования [7] и выявления предрасполагающих донор-специфических антител [10].

Недавно открытый новый фактор регуляции аутореактивности получил название регуляторный ревматоидный фактор (регPФ). РегPФ представляет собой популяцию антиидиотипических антител, несущих дополнительную общую специфичность к Fc-фрагментам IgG, которая ассоциирована с иммуносупрессивными свойствами данных антител по отношению к аутореактивным лимфоцитам. Будучи антиидиотипическими антителами, регPФ ограничивает экспансию CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов тем идиотипом, для которого он специфичен, в соответствии с принципом отрицательной обратной связи. Показано, что мишенью регPФ являются только активированные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты [4]. Ранняя продукция регPФ была ассоциирована с нечувствительностью животных к экспериментально вызванным аутоиммунным реакциям [13]. Поэтому регPФ может рассматриваться как перспективная мишень для индукции приобретенной толерантности к чужеродным антигенам.

**Целью нашего исследования** было выяснить, можно ли индуцировать продукцию регPФ у крыс введением аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичным антигеном (лимфоциты мыши).

Идея эксперимента заключалась в том, что, если крысам ввести аутологичные лимфоциты, активированные гетерологичными (мышинными) лимфоцитами *in vitro*, это вызовет относительно раннюю продукцию регPФ в ходе иммунного ответа, по продукции которого можно судить об

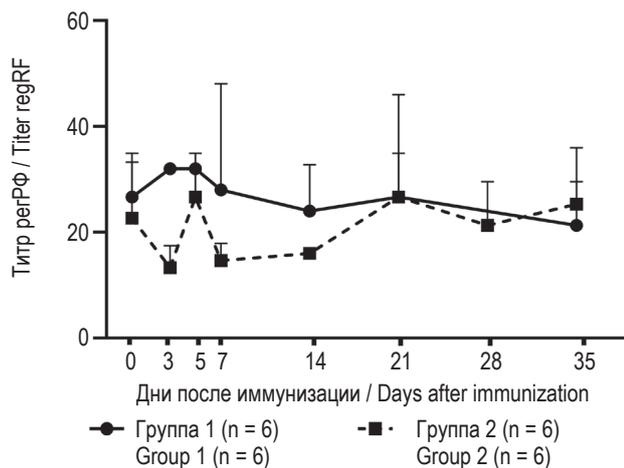
иммуносупрессии аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичными лимфоцитами. Тогда как введение гетерологичного антигена вызовет более поздний иммунный ответ.

## Материалы и методы

Крысы популяции Wistar были доставлены из племенного комплекса «Рапполово» (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово», Россия). Белые беспородные мыши приобретены из БУ УР «Удмуртский ветеринарно-диагностический центр» (БУ УР «УВДЦ», г. Ижевск, Россия). Эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами ARAR, Законом Великобритании о животных (научные процедуры) 1986 года и Директивой ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных. Применяемые протокол и процедуры были этически проверены и одобрены Комитетом по биоэтике Удмуртского государственного университета (дата 18.01.2021/№ 2102).

Для проведения исследования крысы популяции Wistar были поделены на две группы. Первую группу (n = 6) иммунизировали внутривенно гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Кровь у мыши забирали в объеме 1-1,5 мл декапитацией с 3,8% цитратом натрия (НПП «ПанЭко», Россия), разводили до необходимого объема средой RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), перемешали и нанесли на фиколл ( $\rho = 1,077$ ) (НПП «ПанЭко», Россия) в соотношении 1:2. Центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об/мин. Лимфоциты отобрали и отмыли в среде RPMI-1640 трижды (1 раз – при 1500 об/мин в течение 10 минут, 2 и 3 раз – при 1500 об/мин в течение 7 минут). Приготовили суспензию лимфоцитов – развели клетки от каждого образца в 1 мл среды RPMI-1640. Подсчитали количество выделенных клеток в камере Горяева, с помощью красителя трипановый синий (0,2%-ный раствор на 3ФР). Полученное количество клеток доводили до 100 мкл, иммунизировали крыс внутривенно. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли регPФ. Определение титра регPФ методом агглютинации танализированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов проводили по методике [1].

Вторую группу (n = 6) иммунизировали аутологичными лимфоцитами, предварительно активированными *in vitro* гетерологичными (мышинными) лимфоцитами. Все этапы работы проводили в стерильных условиях под ламинаром. Кровь у мыши забрали в объеме 1-1,5 мл декапитацией, у крысы в объеме 3-5 мл методом кардиальной пункции с 3,8% цитратом натрия.

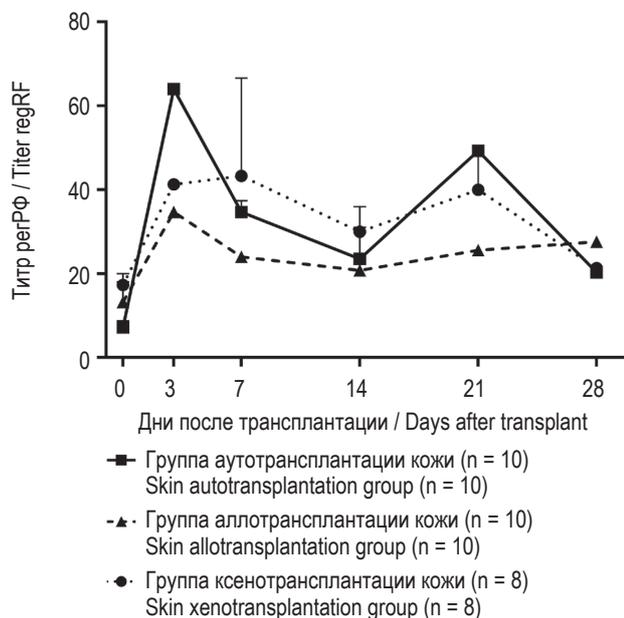


**Рисунок 1. Уровень регРФ в крови крыс после введения гетерологичных (мышинных) лимфоцитов (группа 1), после введения аутологичных лимфоцитов, активированных *in vitro* гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 2)**

**Примечание.** На рисунке представлены средние значения  $\pm$  SD. Оценивали регРФ методом агглютинации таннизированных, нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Figure 1. The level of regRF in the blood of rats after the introduction of heterologous (mouse) lymphocytes (group 1), after the introduction of autologous lymphocytes activated *in vitro* by heterologous (mouse) lymphocytes (group 2)

Note. The figure shows the average values  $\pm$  SD. RegRF was assessed by the agglutination method of tanized erythrocytes loaded with homologous IgG.



**Рисунок 2. Уровень регРФ у крыс при ауто- (n = 10), алло- (n = 10) и ксенотрансплантации (n = 8) кожи в течение 28 дней эксперимента**

**Примечание.** См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. The level of regRF in rats with auto- (n = 10), allo- (n = 10), and xenotransplantation (n = 8) of skin during 28 days of the experiment

Note. As for Figure 1.

Выделение лимфоцитов и подсчет клеток производили аналогично первой экспериментальной группе. В 24-луночном культуральном планшете (Corning, США) ставили смешанную культуру лимфоцитов (СКЛ), в которой содержалось по  $5 \times 10^5$  клеток от каждого образца лимфоцитов крысы и мыши. Так, конечная концентрация клеток в одной лунке 24-луночного культурального планшета составила  $1 \times 10^6$  клеток. Суспензия лимфоцитов была разлита на 4 лунки, следовательно, общее количество клеток в смешанной культуре от одной пары «крыса-мышь» составило  $4 \times 10^6$ . Инкубировали полученные культуры в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Eppendorf, Германия), а через 5 суток от начала культивирования вводили крысам внутривенно после доведения клеток до 100 мкл. Проводили забор крови у крыс для получения сыворотки, в сыворотке определяли регРФ. Оценку метаболической активности выполняли с помощью набора «Глюкоза ФКД» (ООО «Фармацевтика и Клиническая Диагностика», Россия). Определение титра регРФ проводили по методике [1].

## Результаты и обсуждение

Измерение метаболической активности лимфоцитов по потреблению глюкозы в питательной среде после 5 дней инкубации показало, что концентрация глюкозы соответствует норме — наблюдается небольшое ее снижение в питательной среде, в среднем на 1,57 ммоль/л, что говорит об адекватной метаболической активности лимфоцитов и является позитивным фактором жизнедеятельности клеточной культуры.

При анализе жизнеспособности клеток после 5 дней инкубации было обнаружено, что процент живых клеток от общего количества клеток составляет 34-70%.

Для проверки гипотезы о том, что толерантность можно индуцировать введением животным активированных аутологичных лимфоцитов, что, в свою очередь, должно привести к повышению уровня регРФ, крысам внутривенно вводили СКЛ. Результаты измерения уровня регРФ представлены на рисунке 1.

В группе 1 можно наблюдать рост титра регРФ на 3-5-й день после начала иммунизации, далее его уровень постепенно снижается и уже не поднимается в течение всего эксперимента. График изменения уровня регРФ в группе животных, иммунизированных гетерологичными (мышинными) лимфоцитами (группа 1) (рис. 1) очень схож с графиком изменения уровня регРФ в группе животных, которым была проведена ксенотрансплантация кожи (рис. 2). В качестве ксенотрансплантата был использован лоскут кожи мыши.



13. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Stolyarova E., Abisheva N. Fc fragments of immunoglobulin G are an inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, Vol. 95, pp. 938-945.

---

**Авторы:**

**Кряжевских А.В.** — инженер-исследователь лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; аспирант кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

**Абишева Н.Н.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биосовместимых материалов ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии, доцент кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

---

**Authors:**

**Kryazhevskikh A.V.**, Research Engineer, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

**Abisheva N.N.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Biocompatible Materials, Udmurt Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, Associate Professor, Department of Immunology and Cell Biology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

---

Поступила 27.03.2025  
Отправлена на доработку 01.04.2025  
Принята к печати 25.05.2025

---

Received 27.03.2025  
Revision received 01.04.2025  
Accepted 25.05.2025