

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА С ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Бедулева Л.В., Сидоров А.Ю., Абишева Н.Н., Гильманова Л.У., Горбушина А.Н.

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

Резюме. Регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) представляет собой отдельную популяцию ревматоидного фактора, имеющую потенциал использования в клинической диагностике, а лимфоциты, его продуцирующие, — перспективная терапевтическая биомишень при аутоиммунных заболеваниях. Поэтому важно знать условия его надежного выявления у человека и лабораторных животных. Для выявления регуляторного ревматоидного фактора был использован метод агглютинации таннизированных IgG-нагруженных эритроцитов, так как данный метод выявляет только регуляторный ревматоидный фактор, в отличие от метода латекс фиксации, который выявляет и регуляторный ревматоидный фактор и классический ревматоидный фактор, ассоциированный с ревматическими заболеваниями. Обнаружено, что для определения уровня регРФ у крыс следует использовать свежую или замороженную сыворотку. В свежеполученной плазме крови крыс, стабилизированной гепарином, цитратом натрия или ЭДТА, регРФ не выявляется, что возможно связано с присутствием фибриногена, имеющего, как известно, сродство к IgG. Гепарин также самостоятельно затрудняет выявление регРФ у крыс. У человека регРФ надежно выявляется в плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, предварительно замороженной. При использовании сыворотки крови для выявления регРФ у человека в небольшом количестве случаев были получены ложно-отрицательные результаты.

Ключевые слова: факторы иммунорегуляции, ревматоидный фактор, Fc-фрагменты IgG, плазма

DETECTION OF IMMUNOREGULATORY RHEUMATOID FACTOR

Beduleva L.M., Sidorov A.Yu., Abisheva N.N., Gilmanova L.U., Gorbushina A.N.

Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Regulatory rheumatoid factor (regRF) represents a separate rheumatoid factor population that might be potentially used for clinical diagnostics, whereas regRF-producing lymphocytes serve as a promising therapeutic target for autoimmune diseases. Hence, it is worth outlining conditions allowing to reliably detect regRF in humans and laboratory animals. The method of agglutination with tanned IgG-loaded red blood cells was used to measure level of regulatory rheumatoid factor, because it allows to identify solely regRF as compared to the latex fixation method detecting both the regulatory rheumatoid factor as well as the rheumatoid factor associated with rheumatic diseases. It was found that fresh or frozen serum should be used to detect regRF in rats. Freshly purified rat blood

Адрес для переписки:

Бедулева Любовь Викторовна
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Университетская, 1.
Тел.: 8 (3412) 91-64-26.
E-mail: blv76@mail.ru

Address for correspondence:

Beduleva Lyubov V.
Udmurt State University
426034, Russian Federation, Udmurt Republic, Izhevsk,
Universitetskaya str., 1.
Phone: 7 (3412) 91-64-26.
E-mail: blv76@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Бедулева, А.Ю. Сидоров, Н.Н. Абишева,
Л.У. Гильманова, А.Н. Горбушина «Метод определения
отдельной популяции ревматоидного фактора
с иммунорегуляторными свойствами» // Российский
иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 2. С. 187-190.
doi: 10.46235/1028-7221-267-DOI

© Бедулева Л.В. и соавт., 2020

For citation:

L.M. Beduleva, A.Yu. Sidorov, N.N. Abisheva,
L.U. Gilmanova, A.N. Gorbushina "Detection
of immunoregulatory rheumatoid factor", Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020,
Vol. 23, no. 2, pp. 187-190.
doi: 10.46235/1028-7221-267-DOI

DOI: 10.46235/1028-7221-267-DOI

plasma stabilized with heparin, sodium citrate or EDTA did not allow to detect regRF, potentially being linked to the presence of fibrinogen known to demonstrate IgG binding activity. In addition, heparin itself also complicates regRF detection in rats. In humans, regRF was reliably detected in pre-frozen plasma stabilized with sodium citrate. Finally, false-negative results were obtained in a small number of cases while using blood serum for detecting regRF in humans.

Keywords: immunologic factors, rheumatoid factor, immunoglobulin Fc fragments, plasma

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования (номер проекта 0827-2020-0012, государственное задание номер 075-00232-20-01).

Введение

Ревматоидный фактор, первоначально определенный как патологические аутоантитела к IgG, выявляемые при ревматоидном артрите, оказался мультиспецифичными антителами, некоторые из которых демонстрируют иммунорегуляторные свойства [3, 4, 5]. Недавно нами было показано, что ревматоидный фактор, выявляемый методом агглютинации танализированных IgG-нагруженных эритроцитов, является фактором негативной регуляции аутореактивности. Об этом свидетельствуют наличие ассоциации между продукцией данного ревматоидного фактора и устойчивостью к развитию экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний и их ремиссией [1], а также редукция симптомов коллаген-индуцированного артрита крыс в ответ на иммунизацию конформерами Fc-фрагментов, несущих эпитопы распознаваемые ревматоидным фактором, выявляемым методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов [6]. Сравнение специфичности ревматоидного фактора, выявляемого методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов со специфичностью ревматоидного фактора, выявляемого методом латекс фиксации и ассоциированного с аутоиммунными патологиями, показало, что ревматоидный фактор, выявляемый методом агглютинации танализированных IgG нагруженных эритроцитов, представляет собой отдельную популяцию ревматоидного фактора. Данная популяция ревматоидного фактора получила название регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) [6, 7]. Исследование специфичности регуляторного ревматоидного фактора показало, что он представляет собой поликлональные антитела с двойной специфичностью. Индивидуальный паратоп регРФ специфичен к идиотипам антител, и уникален для каждой молекулы регуляторного ревматоидного фактора [1]. Общий паратоп регРФ специфичен к неэпитопам конформеров Fc-фрагментов IgG [6, 7], и не связывается с нативным или измененным IgG, к которому специфичен ревматоидный фактор, выявляемый при ревматических заболеваниях методом латекс фиксации. Механизм действия регРФ заключается в сдерживании экспансии активированных CD4 Т-лимфоцитов, которые он убивает посредством комплемент-зависимого лизиса [8]. Так как регРФ-продуцирующие лимфоциты имеют перспективу использования

в качестве биоматериала для подавления патологических аутоиммунных реакций, а регРФ может иметь самостоятельное, отличное от патологического ревматоидного фактора, выявляемого методом латекс фиксации, клинико-диагностическое значение при аутоиммунных заболеваниях, то важно не допускать ошибок при определении уровня регРФ как у людей в ходе клинических лабораторных исследований, так и лабораторных животных в ходе экспериментальных исследований. Поэтому **целью исследования** было выяснить условия надежного выявления регРФ в крови.

Материалы и методы

Исследование уровня регРФ было проведено в крови интактных крыс (n = 20), здоровых людей (n = 13) и карантинизированной в течение 6 месяцев плазме крови человека (n = 5). Периферическая кровь крыс была разделена на несколько порций, в которые добавляли один из антикоагулянтов, используемых при рутинных лабораторных анализах крови (ЭДТА, цитрат натрия, гепарин), одна из порций служила для получения сыворотки. К образцам сыворотки также были добавлены антикоагулянты в тех же количествах, что и для получения плазмы крови. Образцы плазмы и сыворотки крови подвергали также замораживанию. Из крови человека получали плазму, стабилизированную цитратом натрия, или сыворотку, которые были немедленно заморожены и использованы для анализа в течение следующих 2 недель. Уровень регРФ в плазме или сыворотке крови определяли методом агглютинации танализированных IgG-нагруженных эритроцитов. Для этого эритроциты человека группы 0, полученные с Республиканской станции переливания крови, фиксировали глутаровым альдегидом, танализировали, нагружали IgG человека, либо крысы. Нагруженные эритроциты отмывали бычьим сывороточным альбумином, затем полученную 1,5% суспензию эритроцитов в объеме 50 мкл смешивали с 50 мкл сыворотки или плазмы крови предварительно раститрованными с шагом 2. Реакцию агглютинации учитывали через 3 часа. Для получения доказательств, что выявляемые антитела представляют собой регРФ, исследовали влияние на его связывание следующих антигенов: нативного гомологичного IgG, полученного шадящим методом осаждения сульфатом аммония и последующей эксклюзионной хроматографией, лиофилизированного препарата гомологичного IgG (Equitech-Био, США) и модифицированных Fc-фрагментов гомологичного IgG, несущих свободные SH группы в шарнирной области.

Результаты

Сравнительный анализ уровня регРФ в свежих, не подвергавшихся замораживанию сыворотках и свежих образцах плазмы крови крыс, полученных с использованием антикоагулянтов показал, что регРФ выявляется в свежей сыворотке крови крыс (его титр варьировал в диапазоне от 1:8 до 1:64) и почти не обнаруживается в свежей плазме крови крыс, полученной с добавлением к крови цитрата натрия, либо ЭДТА, либо гепарина (табл. 1).

Чтобы выяснить, антикоагулянт или белки плазмы крови, подвергающиеся изменению в ходе процесса свертывания крови, препятствуют выявлению регРФ в плазме крови, определение его уровня было проведено также в сыворотках крови, в которые были добавлены антикоагулянты. В таблице 1 показано, что уровень регРФ в интактной сыворотке и в сыворотке с добавлением цитрата натрия или ЭДТА не отличается. Уровень регРФ в сыворотке, содержащей гепарин в три раз ниже чем в интактной сыворотке. Следовательно, гепарин добавленный в сыворотку крови крыс препятствует выявлению регуляторного ревматоидного фактора. Таким образом, белки плазмы крови, которые модифицируются при свертывании крови, мешают выявлению регуляторного ревматоидного фактора в свежей плазме крови крыс. Гепарин является самостоятельным фактором, препятствующим выявлению регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс. Свежая плазма крови крыс не подходит для определения в ней регуляторного ревматоидно-

го фактора. Регуляторный ревматоидный фактор был также исследован в сыворотках и плазме крови крыс, подвергнутых замораживанию при -20°C в течение 7 дней. В сыворотке крови уровень регРФ в ходе хранения не изменился. Замораживание увеличило количество выявляемого регРФ в плазме, полученной с использованием цитрата натрия или ЭДТА, однако его уровни не достигли тех, что были выявлены в сыворотке крови (табл. 1). В плазме крови крыс, полученной с добавлением гепарина, регРФ после замораживания не определяется, также как и в свежей гепаринизированной плазме. Таким образом, замораживание плазмы, стабилизированной цитратом натрия или ЭДТА, способствует выявлению регРФ, но уровень остается ниже того, что выявляется в сыворотке. Voehtn было показано, что фибриноген способен связывать с иммобилизованным IgG [2], поэтому можно предположить что в плазме крови связыванию регРФ с таннизированными нагруженными IgG эритроцитами, а следовательно выявлению регРФ может мешать фибриноген, который связываясь с IgG иммобилизованным на эритроцитах может экранировать эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором. Замораживание плазмы может приводить к разрушению фибриногена и способствовать выявлению регРФ.

Сравнительный анализ уровня регРФ в сыворотке крови и плазме крови здоровых людей, полученной с использованием цитрата натрия, подвергнутых замораживанию, показал, что регРФ выявляется как в сыворотке, так и цитратной плазме, а также и карантинизированной плазме.

ТАБЛИЦА 1. РЕГУЛЯТОРНЫЙ РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ИНТАКТНЫХ КРЫС И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 1. REGULATORY RHEUMATOID FACTOR IN SERUM AND PLASMA OF INTACT RATS AND HEALTHY PEOPLE

	Сыворотка крови крыс Rat serum	Плазма крови крыс Rat plasma			Сыворотка крови крыс Rat serum		
		Гепарин Heparin	Цитрат натрия Sodium citrate	ЭДТА EDTA	Гепарин Heparin	Цитрат натрия Sodium citrate	ЭДТА EDTA
Свежая (среднее \pm SD) Fresh (mean \pm SD)	32,8 \pm 19,7	1,4 \pm 2,5	1,5 \pm 1,3	5,2 \pm 4,5	10,4 \pm 20,6	31,0 \pm 25,7	38,6 \pm 25,7
Замороженная при -20°C , 7 дней (среднее \pm SD) Frozen at -20°C , 7 days (mean \pm SD)	37,3 \pm 21,1	2,0 \pm 4,9	16,4 \pm 14,1	16,2 \pm 7,1			
	Сыворотка крови человека Human serum	Плазма крови здоровых людей, стабилизированная цитратом натрия Plasma of healthy people, stabilized with sodium citrate			Карантинизированная плазма крови человека Quarantined human blood plasma		
(среднее \pm SD) (mean \pm SD)	92,7 \pm 143,7	103,3 \pm 138,2			70,4 \pm 35,0		

Однако в нескольких образцах сыворотки регРФ не определялся не смотря на то, что в плазме крови, полученной от тех же людей, обнаруживался. Поэтому у людей, для избегания ложно отрицательных результатов, выявление регРФ желательнее проводить не в сыворотке, а в плазме крови стабилизированной цитратом натрия.

Чтобы убедиться, что в плазме и сыворотках крови человека и сыворотках крыс был выявлен регРФ, а не другие антитела, был проведен анализ подавления реакции агглютинации гомологичными конформерами Fc-фрагментов IgG, нативным и лиофилизированным IgG. Выявлено, что конформеры Fc-фрагментов IgG подавляют, а нативный и лиофилизированный

IgG не влияют на связывание сыворотки или плазмы крови с танализованными IgG-нагруженными эритроцитами. Следовательно, выявляемые в реакции агглютинации танализованных IgG-нагруженных эритроцитов антитела как у крыс, так и человека являются регуляторным ревматоидным фактором.

Заключение

Для выявления регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс следует использовать свежую или замороженную при -20°C сыворотку крови. У людей выявление регРФ желательнее проводить в прошедшей замораживании плазме крови, стабилизированной цитратом натрия.

Список литературы / References

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, pp. 408-420.
2. Boehm T.K., DeNardin E. Fibrinogen binds IgG antibody and enhances IgG-mediated phagocytosis. *Hum. Antibodies*, 2008, Vol. 17, no. 3-4, pp. 45-56.
3. Fong S., Chen P.P., Crowley J.J., Silverman G.J., Carson D.A. Idiotypes and the structural diversity of human rheumatoid factors. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1988, Vol. 10, pp. 189-201.
4. Mageed R.A., Moyes S.P., Thompson K.M., Natvig J.B. Molecular and cellular aspects of human rheumatoid factor production and idiotypes. In: Shoenfeld Y., Kennedy R.C., Ferrone S. (ed) *Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer*. Elsevier, 1997, pp. 135-155.
5. Monestier M., Bellon B., Manheimer A.J., Bona C.A. Rheumatoid factors. Immunochemical, molecular, and regulatory properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, Vol. 475, pp. 106-113.
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.
7. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I., Terentiev A., Cherepanov I. Physicochemical characteristics of human IgG Fc fragments that expose regulatory rheumatoid factor neoepitopes and may show promise as antirheumatic agents. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2019, Vol. 67, no. 2, pp. 287-293.
8. 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, pp. 596-601.

Авторы:

Бедулева Л.В. — д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Сидоров А.Ю. — научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Абишева Н.Н. — научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Гильманова Л.У. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Горбушина А.Н. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Beduleva L.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Sidorov A.Yu., Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abisheva N.N., Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Gilmanova L.U., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Gorbushina A.N., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cell Immunology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation