

На правах рукописи

Храмова Татьяна Владимировна

**МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ CD4⁺-ЛИМФОЦИТОПЕНИИ У КРЫС,
ВЫЗВАННОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ GP120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ижевск - 2021

Работа выполнена на кафедре иммунологии и клеточной биологии института естественных наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Удмуртский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Бедулева Любовь Викторовна

Официальные оппоненты:

Семенов Александр Владимирович - доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по инновационной работе, лаборатория иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, заведующий лабораторией.

Носик Марина Николаевна - кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова", лаборатория биологии лентивирусов, заведующая лабораторией.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «_____» 2021 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Прогрессивная потеря CD4⁺ Т-лимфоцитов в ходе ВИЧ-инфекции, ведущая к развитию иммунодефицита, не может быть полностью предотвращена существующей антиретровирусной терапией (Battegay M. et al., 2006). Причиной невозможности полного восстановления CD4⁺ Т-клеток при ВИЧ-инфекции, особенно в долгосрочной перспективе, является механизм их гибели, необычный для вирусной инфекции. Если еще недавно считалось, что истощение пула CD4⁺ Т-лимфоцитов происходит в результате их инфицирования или действия апоптогенных белков вируса, то сегодня ясно, что основную массу гибнущих CD4⁺ Т-лимфоцитов составляют неинфицированные клетки (Kuwata T. et al., 2009; Fevrier M. et al., 2011).

Еще в 90-е годы 20-го века была предложена аутоиммунная гипотеза СПИДа, согласно которой причиной гибели неинфицированных CD4⁺ Т-лимфоцитов и развития иммунодефицита является запускаемая вирусом аутоиммунная реакция против CD4⁺-лимфоцитов (Kennedy J.R., 1990). Индукция аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4⁺ Т-лимфоцитам, происходит через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против gp120 гликопротеина ВИЧ, активируемыми при инфицировании. Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между аутореактивными лимфоцитами против CD4 и лимфоцитами против gp120 ВИЧ является следствием комплементарности между CD4 связывающим доменом gp120 гликопротеина ВИЧ и CD4 молекулой (Corre J.P. et al., 1991; Keay. S. et al., 1992). В пользу аутоиммунной гипотезы получено большое количество фактов. У ВИЧ-инфицированных людей обнаружены аутоантитела и аутореактивные лимфоциты, специфичные к CD4⁺-лимфоцитам, показана их связь с гибелью CD4⁺-лимфоцитов, стадией ВИЧ-инфекции и нечувствительностью ВИЧ-инфицированных больных к антиретровирусной терапии (Muller C. et al., 1993; Abulafia-Lapid R. et al., 2004; Luo Z. et al., 2017). На моделях ВИО-инфицированных обезьян показано, что прогрессирующее истощение наивных CD4⁺ Т-клеток ассоциировано с наличием сывороточных аутореактивных антител против CD4⁺ Т-клеток, а также с повышенным количеством CD4⁺ Т-клеток, связавших на своей поверхности IgG (Kuwata T. et al., 2009). Однако гипотеза не является общепринятой.

Среди причин можно назвать противоречивость данных об уровне аутоантител у ВИЧ-инфицированных больных, что возможно связано с отсутствием стандартизированного метода их измерения; отсутствие прямой корреляции между уровнем аутоантител к CD4 и снижением количества клеток; отсутствие описанного в литературе механизма, посредством которого аутореактивные антитела и лимфоциты вызывают гибель CD4⁺-лимфоцитов; а также отсутствие эффективной стратегии предотвращения развития иммунодефицита при ВИЧ-инфекции, основанной на блокировании индукции или подавлении аутоиммунной реакции против CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Для получения доказательств аутоиммунной гипотезы СПИДа одним из подходов может быть изучение роли аутоантител против CD4, индуцированных ВИЧ, в условиях, исключающих вклад вируса или его апоптогенных белков в истощение CD4⁺ Т-лимфоцитов. Таким условиям могут удовлетворять экспериментальные модели аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов, запускаемой не ВИЧ, а gp120 гликопротеином его оболочки.

Аутореактивные лимфоциты в норме находятся под негативным контролем, который предотвращает развитие агрессивных аутоиммунных реакций, сопровождающихся клиническими проявлениями (Anderton S.M., 2006). Специфический контроль над лимфоцитами в организме осуществляют Т-регуляторные клетки (Yang S.H. et al., 2018), В-регуляторные клетки (Rosser E.C., Mauri C., 2015), а также антиидиотипические антитела (Coutinho A., 2003), в частности, регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) – естественные антиидиотипические антитела, характеризующиеся наличием общего паратопа, специфичного к конформерам Fc фрагментов IgG, функцией которых является сдерживание экспансии активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов (Beduleva L. et al., 2015; Sidorov A. et al., 2017; Stolyarova E. et al., 2018). Если рассматривать ВИЧ-индуцированный иммунодефицит как результат развития аутоиммунной реакции против CD4⁺ Т-лимфоцитов, то необходимо проверить, находится ли данная аутоиммунная реакция под контролем регуляторного ревматоидного фактора. Другие антиидиотипические антитела к аутореактивным лимфоцитам против CD4,

например, антитела к МНС-II (Atlan H. et al., 1994), тоже могут быть факторами регуляции аутоиммунной реакции против CD4.

Таким образом, выяснение причины и механизма гибели незараженных CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции остается актуальным вопросом, решение которого может позволить найти более эффективные средства профилактики и терапии ВИЧ-инфекции/СПИДа.

Цель исследования

Изучение роли аутоантител к CD4, индуцируемых gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, а также механизма регуляции продукции аутоантител к CD4, вызываемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Задачи исследования

1. Изучить возможность индукции аутоиммунной реакции против CD4 и развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс Wistar посредством их иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

2. Выяснить, участвуют ли регуляторный ревматоидный фактор и антитела к HLA-II в регуляции иммунного ответа, вызываемого gp120 гликопротеином ВИЧ-1 у крыс Wistar.

3. Исследовать роль аутоантител к CD4 в гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

4. Выяснить механизм гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Проверка аутоиммунной гипотезы СПИДа, согласно которой истощение CD4⁺-лимфоцитов вызывает не вирус, а запускаемые им аутоантитела к CD4, на ВИЧ-инфицированных людях или ВИО-инфицированных обезьянах затруднена, так как не позволяет дифференцировать вклад вируса и его белков от вклада аутоантител к CD4 в гибель CD4⁺-лимфоцитов. Для решения этой проблемы была исследована возможность создания крысиной неинфекционной экспериментальной модели аутоиммунной

реакции против CD4, запускаемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Для индукции аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов использовали иммунизацию крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1, который, как известно, индуцирует аутоиммунную реакцию к CD4 у ВИЧ-инфицированных людей. В работе были использованы различные иммунологические, иммунохимические методы, методы выделения и культивирования клеток, а также статистические методы. Аутоантитела к CD4 определяли методом иммуноферментного анализа, количество CD4⁺-лимфоцитов в крови методом проточной цитофлуориметрии. Влияние аутоантител к CD4 на CD4⁺-лимфоциты было изучено *in vivo* и *in vitro*. Была также исследована кинетика регуляторного ревматоидного фактора и антител к МНС-II у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, так как специфичность регуляторного ревматоидного фактора и антител к МНС-II позволяет ожидать наличие у данных антител регуляторных свойств в отношении аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4.

Степень достоверности, апробация результатов

Результаты получены с помощью стандартизованных методов, на выборках достаточного объема, воспроизведены в нескольких сериях экспериментов. Для оценки достоверности выявленных различий использованы адекватные статистические критерии. Результаты экспериментов анализировались и сопоставлялись с известными экспериментальными данными других исследователей. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы согласуются с известными фактами, обоснованы теоретическими решениями и экспериментальными данными, полученными в работе, и не противоречат известным положениям иммунологии.

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры иммунологии и клеточной биологии института естественных наук ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет» (протокол №8 от 23.06.2020).

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XLIII и XLVII итоговых студенческих научных конференциях (Ижевск, 2015, 2019), XV и XVI Всероссийских научных форумах с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015, 2017),

XII конференции иммунологов Урала (Пермь, 2015), Первой междисциплинарной конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), VIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016).

Личный вклад автора

Формулировка основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии диссертационного исследования, а также интерпретация и анализ полученных результатов, представление результатов в научных публикациях проводились диссертантом совместно с научным руководителем. Цель, задачи и дизайн исследования сформулированы и разработаны автором самостоятельно. Анализ, систематизация, обобщение литературы по изучаемой проблеме, экспериментальные исследования проводились соискателем самостоятельно. Статистическая обработка данных, оформление рукописи диссертации, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Продукция аутоантител к CD4, сопровождающаяся CD4⁺-лимфоцитопенией у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является неинфекционной экспериментальной моделью аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении, возникающей при ВИЧ-инфекции.

2. Гибель неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител против CD4 и регуляторного ревматоидного фактора.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar продукцию аутоантител к CD4, сопровождающуюся развитием CD4⁺-лимфоцитопении. Развивающаяся аутоиммунная CD4⁺-лимфоцитопения у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является новой экспериментальной моделью аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении, запускаемой ВИЧ у человека. Аутоиммунная CD4⁺-лимфоцитопения крыс Wistar возникает в

ответ на иммунизацию антигеном ВИЧ, без инфицирования животных, поэтому, в отличие от существующих инфекционных экспериментальных моделей CD4⁺ Т-лимфоцитопении, впервые однозначно демонстрирует ключевую роль аутоантител против CD4, индуцируемых ВИЧ, в гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции.

Впервые показана роль антител против МНС II в регуляции продукции аутоантител против CD4, индуцируемых иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Изучена роль регуляторного ревматоидного фактора – аутоантител, сдерживающих агрессивные аутоиммунные реакции в норме – в развитии иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1. Показано, что регуляторный ревматоидный фактор не участвует в регуляции иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 и не контролирует развитие аутоиммунной реакции против CD4 у крыс.

Представлена новая гипотеза о механизме гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Согласно данной гипотезе гибель CD4⁺-лимфоцитов является результатом совместного действия аутоантител к CD4, индуцируемых gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и регуляторного ревматоидного фактора, естественно присутствующего в крови.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в получении новых данных, проясняющих иммунопатогенез ВИЧ-инфекции у человека. Факт развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс Wistar на фоне продукции аутоантител к CD4, индуцированных иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в отсутствие ВИЧ-инфекции, подтверждает аутоиммунную гипотезу истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции у людей и поднимает вопрос о профилактике и лечении ВИЧ-инфекции как аутоиммунного заболевания, вызываемого вирусной инфекцией.

Представленная гипотеза о механизме гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, согласно которой регуляторный ревматоидный фактор является кофактором цитопатического действия аутоантител к CD4, объясняет молекулярно-клеточный механизм цитопатического действия аутоантител к CD4 на CD4⁺ Т-лимфоциты при ВИЧ-инфекции, а также конкретизирует современную гипотезу

активационно-индуцированной гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей.

Полученная экспериментальная модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, запускаемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, расширяет знания о патогенезе ВИЧ-инфекции, а именно, о механизме индукции аутоантител к CD4, механизмах истощения неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Практическая значимость настоящего исследования заключается в возможности использования новой неинфекционной экспериментальной модели аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс для испытания эффективности новых анти-ВИЧ вакцин и средств лечения ВИЧ-инфекции, основанных на принципиально новом подходе – предотвращении или подавлении развития аутоиммунной реакции к CD4⁺-лимфоцитам, запускаемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс, в курсы «Иммунология», «Клиническая иммунология», «Экспериментальные модели иммунопатологий», в темы магистерских диссертаций, дипломных, курсовых работ, в тематику НИОКР кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», в НИР научной лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет».

Конкурсная поддержка исследования

Часть исследования выполнена в рамках научного проекта, выполняемого коллективами научных лабораторий образовательных организаций высшего образования, подведомственных Минобрнауки России, по государственному заданию в сфере науки (проект № 0827-2020-0012, государственное задание № 075-00232-20-01, тема «Разработка терапевтической вакцины, на основе конформеров Fc фрагментов IgG человека для лечения аутоиммунных заболеваний», 02.09.19-01.09.23).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ общим объемом 3 печатных листа, в том числе 3 статьи в зарубежных научных изданиях,

индексируемых в базах данных научного цитирования Web of Science, Scopus, 5 публикаций (тезисы) в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, 1 статья в сборнике статей всероссийской конференции, а также 2 публикации (тезисы) опубликованы в материалах вузовских конференций.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 107 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания организации, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов. Список литературы включает 202 источника, среди которых 9 отечественных и 193 иностранных. Работа иллюстрирована 17 рисунками, 1 таблицей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Исследование выполнено на крысах Wistar обоего пола. Материалом исследования служила цельная кровь и плазма крови крыс, а также фракции мононуклеаров, полученных из периферической крови крыс. С целью индукции аутоиммунной реакции против CD4 8-10-недельных крыс иммунизировали gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (ACROBiosystems, США) внутрикожно (n=33) или подкожно (n=5) однократно в составе неполного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) в дозе 20 мкг на животное. Контрольной группе животных вводили неполный адьювант Фрейнда (НАФ) внутрикожно (n=14). В крови исследуемых крыс измеряли количество CD4⁺-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии на приборах BD FACS Canto II Flow Cytometer (БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Удмуртской Республики») и COULTER EPICS XL4 (БУЗ УР «Удмуртский Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями»). В плазме крови определяли уровень антител к gp120 ВИЧ-1 (ACROBiosystems, США), аутоантител к рекомбинантному CD4 крысы (R&D Systems, США), антител к HLA-DR (Abcam, Великобритания) с помощью сконструированной нами тест-системы, основанной на принципах непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (Beduleva L. et al., 2016).

Также в плазме крови определяли титр регуляторного ревматоидного фактора с помощью реакции пассивной агглютинации танализированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов.

Исследование механизма гибели лимфоцитов *in vitro* включало обработку лимфоцитов интактных крыс плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от gp120 иммунизированных крыс, в течение суток при 37 °С в 5% CO₂, затем клетки инкубировали с регРФ-содержащей плазмой, полученной от интактных крыс. Определяли выживаемость лимфоцитов.

Результаты анализировали с помощью программ Statistica 10, Prisma 5 для Windows. Для оценки достоверности различий использовали критерии Манна-Уитни, Стьюдента. Отличия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Продукция аутоантител к CD4 и CD4⁺-лимфоцитопения у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1

Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа лимфоциты, специфичные к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, и активируемые им при заражении, вызывают активацию аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4⁺ Т-лимфоцитам, с которыми они находятся в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях, следствием чего является истощение CD4⁺-лимфоцитов (Kennedy J.R., 1992). Для того чтобы проверить, может ли иммунный ответ против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 вызывать развитие аутоиммунной реакции против CD4 и приведет ли такая аутоиммунная реакция к истощению CD4⁺-клеток, крысы Wistar были иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1 внутрикожно или подкожно.

Внутрικοжная однократная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 в НАФ вызвала продукцию аутоантител к рекомбинантному CD4 (rCD4) крысы у 11 из 14 животных (рисунок 1А). Аутоантитела к rCD4 начинают выявляться в крови через 2 недели после иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1, их продукция не завершается в течение 16 недель наблюдения. Подкожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не вызывает продукцию аутоантител к CD4. В контрольной группе крыс, получивших инъекцию НАФ, ни антител к gp120 ВИЧ-1, ни аутоантител к rCD4 обнаружено не было (Рисунок 1Б).

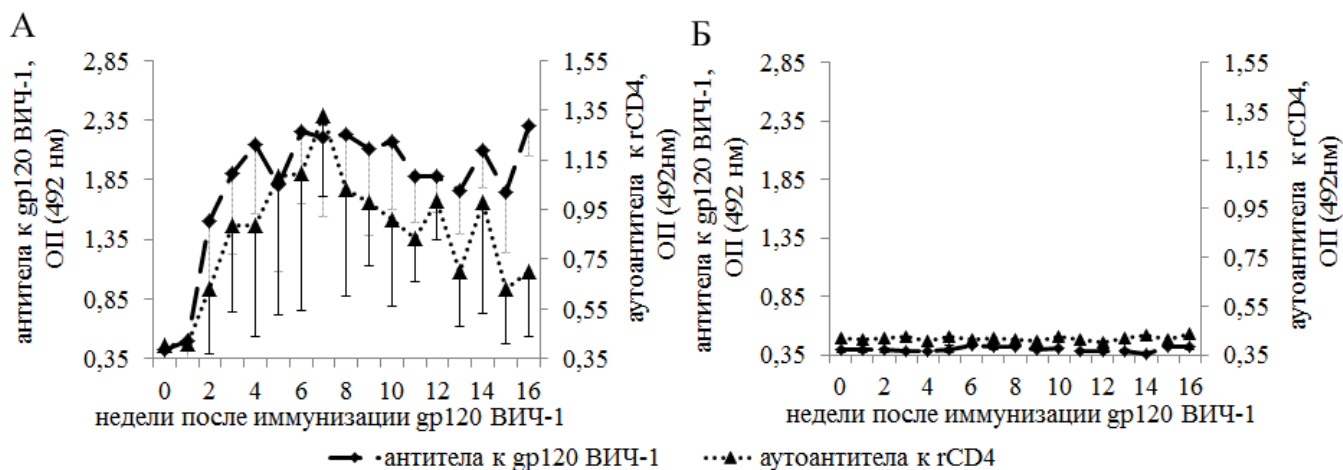


Рисунок 1 - Аутоантитела к rCD4 и антитела к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 внутрикожно и развивших аутоиммунную реакцию против CD4 (А) (n=11), или получивших внутрикожную инъекцию НАФ (Б) (n=10). Каждая точка представлена средним \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 200 раз (для антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1) и в 100 раз (для аутоантител к rCD4).

Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа аутоантитела к CD4 должны индуцировать гибель CD4⁺-лимфоцитов крысы. Поэтому у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, было исследовано количество CD4⁺-лимфоцитов в крови. На рисунке 2А видно, что почти в каждой точке измерения количество CD4⁺-клеток меньше в крови у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, чем в контрольной группе крыс, получивших инъекцию НАФ (рисунок 2А). Кроме того, среднее количество CD4⁺-лимфоцитов в крови за весь период наблюдения у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и продуцирующих аутоантитела к rCD4, достоверно ниже, чем среднее количество CD4⁺-лимфоцитов у крыс, получивших инъекцию НАФ (p=0,003, t-критерий Стьюдента) (рисунок 2Б).

Таким образом, однократная внутрикожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar хроническую продукцию аутоантител к CD4 и развитие транзиторной CD4⁺-лимфоцитопении.

Роль регуляторного ревматоидного фактора в развитии аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1

У крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был исследован уровень регуляторного ревматоидного фактора (регРФ) в крови. РегРФ представляет

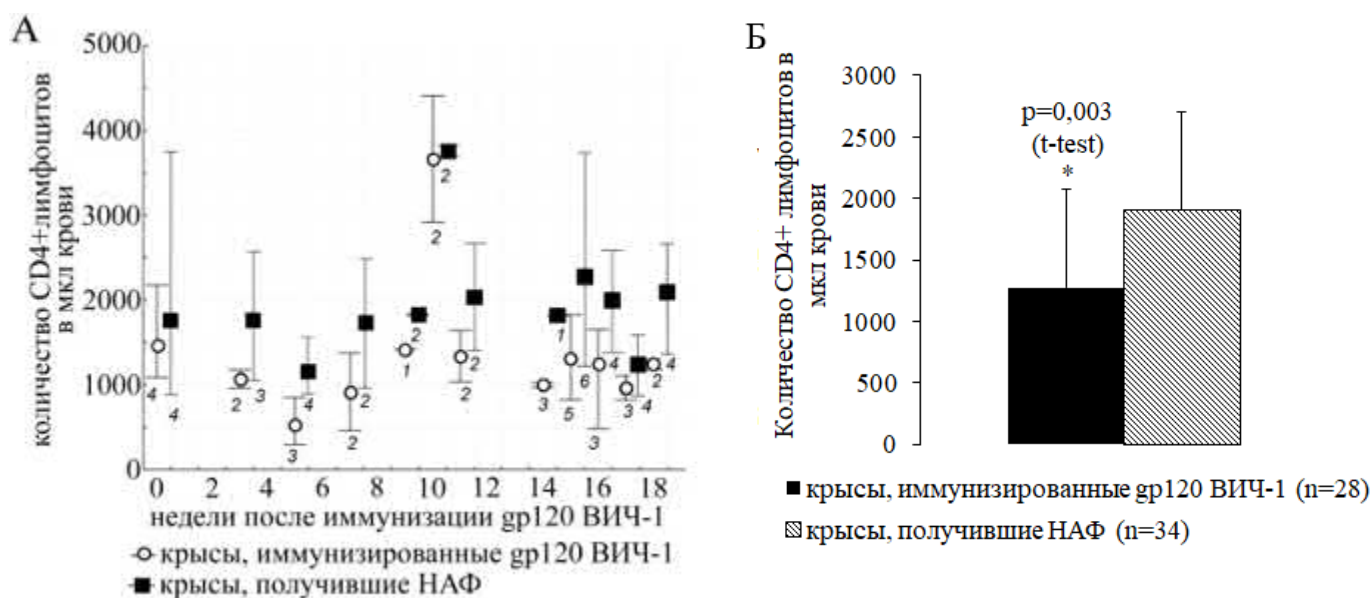


Рисунок 2 – А. Количество CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и у крыс, получивших НАФ. Цифрой указано, сколько животных было исследовано в каждой точке. Б. Среднее количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, и крыс, получивших НАФ, за весь период наблюдения. Данные представлены как среднее ± SD. n – количество исследованных образцов крови. * - достоверные различия, t-критерий Стьюдента.

собой популяцию антиидиотипических антител, специфичных к антиген-распознающим рецепторам лимфоцитов, в том числе аутореактивных. Особенностью молекул регРФ, отличающей их от других антиидиотипических антител, является наличие, помимо индивидуального паратопа, общего паратопа, специфичного к неопитомам конформеров Fc фрагментов IgG. Ранее было показано, что продукция регРФ обеспечивает устойчивость к экспериментальным аутоиммунным заболеваниям и ассоциирована с их ремиссией (Menshikov I. et al., 2015; Beduleva L. et al., 2015). Стимуляция продукции регРФ конформерами Fc фрагментов IgG редуцирует коллаген-индуцированный артрит у крыс (Sidorov A. et al., 2017). Поэтому ожидалось, что регРФ может участвовать и в обеспечении устойчивости к развитию аутоиммунной реакции против CD4, вызываемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Анализ уровня регРФ в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, показал, что продукция регРФ в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не отличается у крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4, и крыс, устойчивых к индукции аутоиммунной реакции, вызываемой

иммунизацией gp120 ВИЧ-1 и контрольных крыс, инъецированных НАФ. Следовательно, регуляторный ревматоидный фактор не принимает участие в регуляции иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 у крыс.

Антитела к альфа-цепи HLA-DR у крыс в ходе развития аутоиммунной реакции к CD4, индуцированной посредством иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1

Чтобы выяснить, участвуют ли антитела к МНС-II в регуляции аутоиммунной реакции против CD4, запускаемой в ходе иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 у крыс Wistar, у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был исследован уровень антител к альфа-цепи HLA-DR и их связь с продукцией аутоантител к rCD4.

По уровню антител к HLA-DR исследуемые животные поделились на 2 группы: 1) крысы, у которых наблюдалось повышение уровня антител к HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (n=8); 2) крысы, у которых в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 уровень антител к HLA-DR не изменялся (n=8). Сравнительный анализ уровня аутоантител к CD4 у данных групп крыс, показал, что у крыс с повышением уровня антител к HLA-DR уровень аутоантител к rCD4 на 5 неделе после иммунизации ниже, чем у крыс, не отреагировавших повышением уровня антител к HLA-DR ($p < 0,05$, Mann Whitney test) (рисунок 3).

Таким образом, у крыс, продуцирующих антитела к HLA-DR, уровень аутоантител к CD4 ниже, чем у крыс, не продуцирующих антитела к HLA-DR, что позволяет предполагать, что антитела к HLA-DR и лимфоциты, их продуцирующие, могут участвовать в негативной регуляции продукции аутоантител к CD4, возникающей в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий с аутореактивными лимфоцитами против CD4.

Роль аутоантител к rCD4, индуцированных иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в гибели CD4⁺-лимфоцитов

Для выяснения существования непосредственной связи между содержанием аутоантител к rCD4 и числом CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных

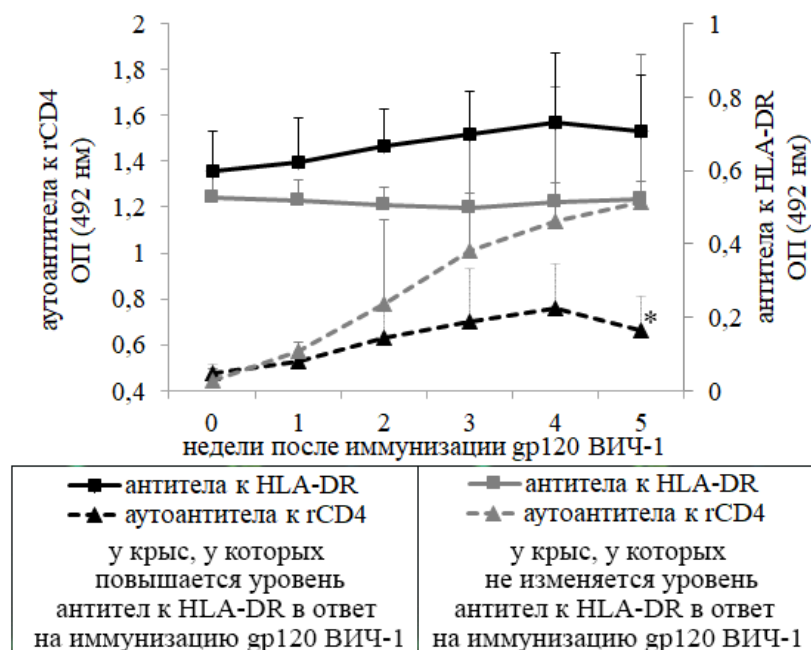


Рисунок 3 – Сравнение уровня аутоантител к гCD4 у крыс, продуцирующих и не продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Каждая точка представлена средним от 8 крыс \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 100 раз. * - достоверные различия в уровне аутоантител к CD4 между крысами, продуцирующими и не продуцирующими антитела к альфа-цепи HLA-DR, $p < 0,05$, Mann Whitney test.

gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был проведен корреляционный анализ. Достоверной корреляции между количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и уровнем аутоантител к гCD4 ($r = 0,426$), не выявлено.

Механизм гибели CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1

При индивидуальном анализе кинетики аутоантител к гCD4, регуляторного ревматоидного фактора и изменения количества CD4⁺-лимфоцитов в периферической крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, было замечено, что снижение количества CD4⁺-лимфоцитов в крови совпадает со спонтанным повышением уровня регРФ в крови крыс (рисунок 4А).

Чтобы выяснить, действительно ли количество CD4⁺-лимфоцитов связано с уровнем регРФ в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к гCD4 в ответ на иммунизацию gp120 ВИЧ-1, исследованные образцы крови крыс, продуцирующих аутоантитела к гCD4, были поделены на две группы: группу, характеризующуюся относительно низким уровнем регРФ в крови (титр регРФ $\leq 1:16$), и группу,

характеризующуюся относительно высоким уровнем регРФ в крови (титр регРФ > 1:16) (рисунок 4Б).

Сравнительный анализ количества CD4⁺-лимфоцитов в образцах крови с относительно высоким уровнем регРФ (титр >1:16) и в образцах крови с относительно низким уровнем регРФ (титр ≤1:16) показал, что количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gr120 ВИЧ-1, при относительно высоком уровне регРФ ниже, чем при относительно низком уровне регРФ (рисунок 4Б). У контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ, различий в количестве CD4⁺-лимфоцитов между группами с относительно высоким и относительно низким уровнем регРФ не обнаружено (рисунок 4Б).

Анализ связи между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови крыс выявил достоверную отрицательную связь между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови крыс, иммунизированных gr120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против rCD4 ($r = 0,7370$). У крыс, инъецированных НАФ, связи между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови не выявлено ($r = -0,239$).

Полученные данные позволяют предположить, что гибель CD4⁺-лимфоцитов у

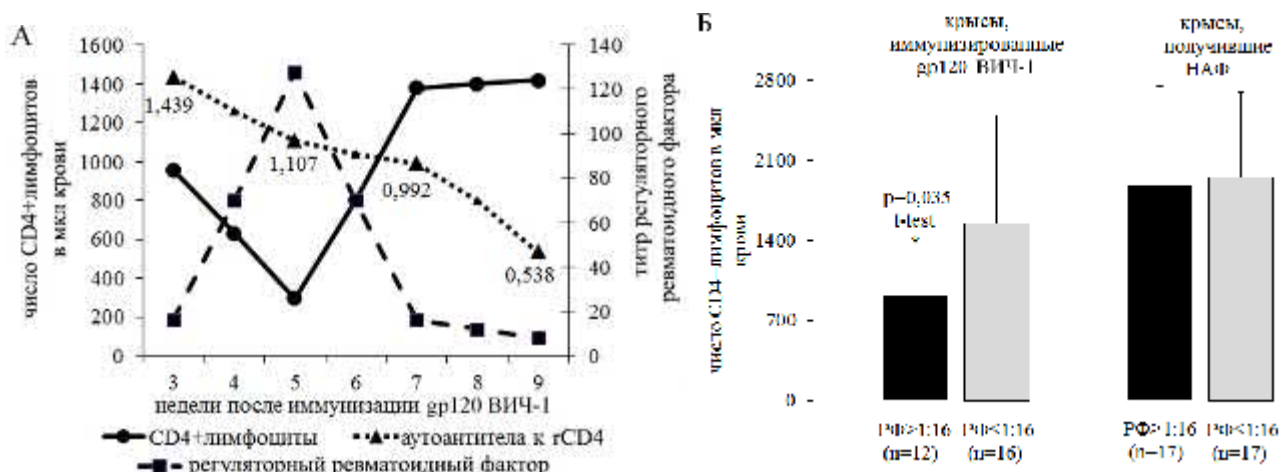


Рисунок 4 – А. Связь между уровнем регуляторного ревматоидного фактора, уровнем аутоантител к rCD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gr120 гликопротеином ВИЧ-1 (типичный пример индивидуальных данных). Б. Среднее количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс иммунизированных gr120 гликопротеином ВИЧ-1, и в крови крыс, получивших инъекцию неполного адьюванта Фрейнда (НАФ), при относительно высоком (титр >1:16) и при относительно низком (титр ≤1:16) уровне регуляторного ревматоидного фактора. n – количество исследованных образцов. Данные представлены как среднее ± SD. * - достоверные различия, t-критерий Стьюдента.

крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, происходит в результате совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Чтобы проверить данное предположение, был проведен дополнительный эксперимент *in vitro*.

Лимфоциты, полученные из периферической крови интактных крыс (n=11), инкубировали в течение 24 часов с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Затем добавляли плазму, содержащую регРФ (титр>1:16), полученную от интактных крыс. Было обнаружено, что лимфоциты, предварительно инкубированные с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, гибнут после обработки их плазмой, содержащей регРФ (рисунок 5). Не наблюдается гибели клеток, если плазму, не содержащую регРФ, добавить к лимфоцитам, предварительно инкубированным с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4. Также клетки остаются живыми, если плазму, содержащую регРФ, добавить к лимфоцитам, предварительно инкубированным с плазмой, не содержащей аутоантитела к CD4. То есть ни аутоантитела к CD4, ни регуляторный ревматоидный фактор по отдельности не индуцируют гибель CD4⁺-лимфоцитов.

Таким образом, *in vitro* исследования роли аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺-лимфоцитов, как и результаты, полученные

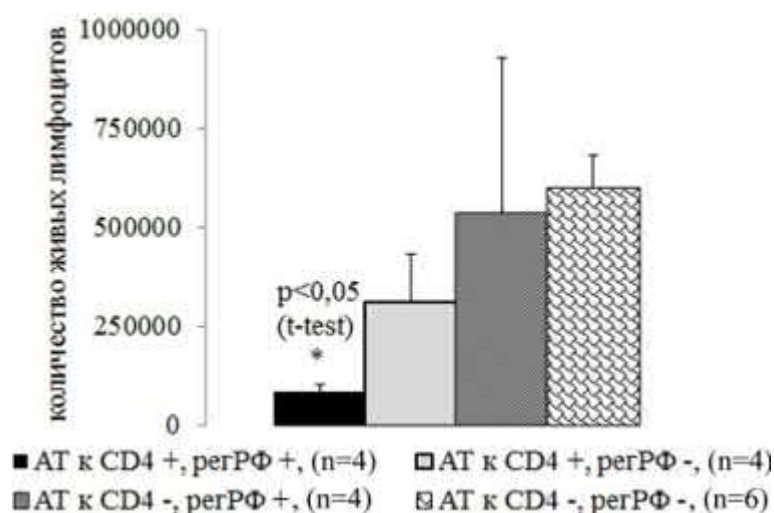


Рисунок 5 - Гибель лимфоцитов, инкубированных с плазмой, полученной от gp120-иммунизированных крыс и содержащей аутоантитела против CD4, и впоследствии обработанных плазмой, содержащей регуляторный ревматоидный фактор (среднее ± SD). * - достоверные различия, Mann Whitney test.

на экспериментальной модели аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, вызванной иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, свидетельствуют о том, что причиной развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является совместное действие аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Аутоантитела к CD4 могут выступать фактором поликлональной активации CD4⁺ Т-лимфоцитов (Luo Z. et al., 2017), а регРФ - фактором гибели активированных лимфоцитов (Stolyarova E. et al., 2018). Действие этих факторов может быть разделено во времени. Полученные данные не противоречат доминирующей сегодня гипотезе активационно-индуцированной гибели неинфицированных CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, согласно которой гибель незараженных CD4⁺ Т-лимфоцитов – результат последовательного действия на них двух факторов: фактора активации клеток и фактора, который убивает активированные клетки. Гипотетическая схема, объясняющая механизм совместного действия аутоантител к CD4 и регРФ на CD4⁺ Т-лимфоциты показана на рисунке 6.

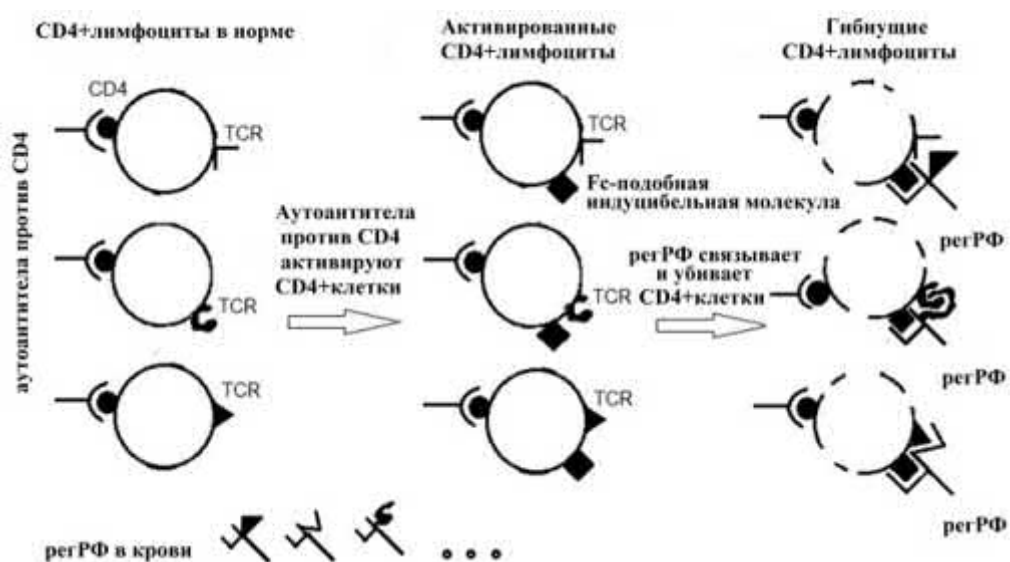


Рисунок 6 - Гипотетическая схема гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. В норме в крови присутствует регуляторный ревматоидный фактор, функцией которого является сдерживание экспансии активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов посредством их киллинга. Аутоантитела к CD4, продуцируемые в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, вызывают поликлональную активацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и тем самым делают CD4⁺ Т-лимфоциты мишенью цитопатического действия регуляторного ревматоидного фактора. Антигеном, который узнает регуляторный ревматоидный фактор на активированных лимфоцитах, может быть молекула активации, подобная конформерам Fc-фрагментов IgG, к которым специфичен общий паратоп регуляторного ревматоидного фактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования указывают на то, что gp120 гликопротеин ВИЧ-1 может вызывать продукцию аутоантител против CD4 вследствие наличия между лимфоцитами, специфичными к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, и аутореактивными лимфоцитами против CD4 идиотип-антиидиотипических взаимодействий, даже у крыс Wistar. Индуцируемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1 аутоиммунная реакция против CD4, как и ожидалось, приводит к развитию CD4⁺-лимфоцитопении у иммунизированных крыс. Также, как и многие исследователи, измерявшие аутоантитела к CD4 у ВИЧ-инфицированных больных, мы не выявили корреляции между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1. Таким образом, аутоантитела к CD4, образующиеся в ходе иммунного ответа к gp120 ВИЧ-1, непосредственно не убивают CD4⁺ Т-лимфоциты.

В ходе исследования обнаружено, что гибель CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 и продуцирующих аутоантитела против CD4, ассоциирована с повышением уровня регуляторного ревматоидного фактора. В эксперименте *in vitro* показано, что мононуклеары, полученные от интактных крыс, гибнут после обработки их плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и последующего воздействия плазмы, содержащей регРФ. Таким образом, истощение CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Мы предполагаем, что аутоантитела к CD4 приводят к генерализованной активации CD4⁺-лимфоцитов, а регРФ, присутствующий в крови в норме, выступает для активированных CD4⁺-лимфоцитов в качестве второго активационного сигнала, т.е. сигнала, ведущего к гибели.

Понимание того, что основной причиной гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции является аутоиммунная реакция против CD4, индуцируемая белками ВИЧ, открывает новое направление в создании эффективных средств лечения и профилактики ВИЧ-инфекции. Становится понятно, что для предотвращения иммунодефицита, развивающегося при ВИЧ-инфекции, необходимо найти способы

блокирования развития аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов. Разработанная в ходе данного исследования модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении у крыс, индуцированной иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, может быть полезна для исследования таких подходов.

ВЫВОДЫ

1. Однократная внутрикожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar продукцию аутоантител к CD4 и развитие транзиторной CD4⁺-лимфоцитопении.
2. В крови крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, уровень аутоантител к CD4 ниже у крыс, продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR, и не зависит от уровня регуляторного ревматоидного фактора.
3. Количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, ниже, чем в крови крыс, получивших инъекцию неполного адьюванта Фрейнда, однако аутоантитела к CD4, продуцируемые в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, не коррелируют с количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс и не вызывают гибели CD4⁺-лимфоцитов *in vitro*.
4. Низкий уровень CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, наблюдается у крыс, имеющих относительно высокий уровень регуляторного ревматоидного фактора в крови.
5. *In vitro* гибель лимфоцитов крыс происходит после их предварительной обработки плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и последующей обработки плазмой, содержащей регуляторный ревматоидный фактор.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в настоящем исследовании данные следует включить в учебные курсы «иммунология», «клиническая иммунология» для студентов биологических и медицинских высших учебных заведений.

Результаты исследования указывают на то, что необходимо рассмотреть новые подходы к созданию профилактических и терапевтических вакцин от ВИЧ-

инфекции/СПИДа, основанные не на индукции сильного нейтрализующего гуморального или клеточного иммунного ответа, но на предотвращении развития аутоиммунных реакций против CD4⁺-лимфоцитов.

Полученные данные в пользу ключевой роли аутоантител в развитии CD4⁺ Т-лимфоцитопении и роли иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 в их индукции обосновывают необходимость раннего назначения антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции.

В клинических исследованиях целесообразно на ранних этапах ВИЧ-инфекции измерять уровень аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам и уровень регуляторного ревматоидного фактора в крови в качестве прогностических показателей развития ВИЧ-индуцированного иммунодефицита.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На следующем этапе работы необходимо провести исследование роли аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей.

Полученные в ходе исследования факты об аутоиммунной причине истощения CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции вместе с данными литературы служат основанием предполагать, что для эффективного предотвращения развития иммунодефицита при ВИЧ-инфекции необходимо заблокировать продукцию аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам, индуцируемую gp120 гликопротеином ВИЧ. В связи с этим в дальнейшем планируется поиск средств предотвращения индукции и средств подавления аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов, индуцируемой gp120 гликопротеином ВИЧ, при сохранении иммунного ответа на ВИЧ. Для этой цели будет использована разработанная экспериментальная неинфекционная модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, запускаемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Храмова, Т.В.** Продукция аутоантител к CD4 у негуманизированных крыс в ответ на иммунизацию gp 120 белком ВИЧ / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, Т.О. Толстолуцкая, К.М. Вахрушева, С.Ю. Березкина, М.М. Гусева // Современная медицина: актуальные вопросы. – 2014. – № 35. – С.71-76.

2. **Храмова, Т.В.** Механизм развития CD4+лимфоцитопении у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и исследование возможности формирования толерантности к gp120 ВИЧ-1 с помощью циклоспорина А / Т.В. Храмова, С.Ю. Березкина, К.М. Вахрушева; науч. рук. Л.В. Бедулева // Материалы XLIII итоговой студенческой научной конференции Удмуртского государственного университета. – Ижевск: Удмуртский университет, 2015. – С. 57-59.
3. **Храмова, Т.В.** Роль ревматоидного фактора в гибели CD4+ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, С.Ю. Березкина, И.В. Меньшиков // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 2-1. – С. 540-542.
4. **Храмова, Т.В.** Исследование механизма гибели CD4+лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, С.Ю. Березкина, И.В. Меньшиков, Т.О. Толстолуцкая, К.М. Вахрушева // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 150-151.
5. **Menshikov, I.** The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov, N. Abisheva, **T. Khramova**, E. Stolyarova, K. Fomina // Journal of Theoretical Biology. – 2015. - Vol. 375. – P.32-39. DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.10.003.
6. **Beduleva, L.** Combined action of anti-CD4 autoantibodies and rheumatoid factor in the development of CD4 lymphocytopenia in rats immunized with HIV-1 gp120 / L. Beduleva, **T. Khramova**, I. Menshikov, E. Stolyarova, S. Pavlova // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2016. - Vol. 32, № 12. – P. 1173-1179. DOI: 10.1089/aid.2015.0358.
7. **Храмова, Т.В.** Экспериментальная модель аутоиммунной CD4+лимфоцитопении у крыс, вызванная иммунизацией gp120 ВИЧ / Т.В. Храмова, А.Я. Снигирев, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, О.Б. Горбунов // Инфекционные болезни. – 2016. – Т.14, № 5. – С. 299.
8. **Храмова, Т.В.** Регуляторный ревматоидный фактор убивает активированные лимфоциты / Т.В. Храмова, Е.Ю. Столярова, С.Ю. Павлова // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54, № 3. – С. 62.

9. Храмова, Т.В. Роль аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, А.Я. Снигирев, В.С. Ворожцова, А.М. Вайтина // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, № 5. – С. 70.

10. Stolyarova, E. Mechanism by which regulatory rheumatoid factor prevents experimental autoimmune encephalomyelitis / E. Stolyarova, L. Beduleva, I. Menshikov, A. Snigiryev, T. Khramova // Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Target. – 2018. – Vol.18, №6. – P.596-601. DOI: 10.2174/1871530318666180308123350.

11. Храмова, Т.В. Исследование эффективности иммунизации лимфоцитами для предотвращения развития аутоиммунной реакции против CD4⁺ лимфоцитов, запускаемой GP120 ВИЧ / Т.В. Храмова; науч. рук. Л.В. Бедулева // Материалы XLVII итоговой студенческой научной конференции Удмуртского государственного университета. – Ижевск: Удмуртский университет, 2019. – С. 68-70.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВИО – вирус иммунодефицита обезьяны

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ОП – оптическая плотность

РФ – ревматоидный фактор

РегРФ – регуляторный ревматоидный фактор

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ФИТЦ – флуоресцеин-изотиоцианат

HLA-DR – human leukocyte antigens DR isotype (человеческие лейкоцитарные антигены II класса гистосовместимости, сублокус DR)

МНС – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

rCD4 – recombinant form of cluster of differentiation 4 (рекомбинантная форма кластера дифференцировки 4)

Храмова Татьяна Владимировна

**МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ CD4⁺-ЛИМФОЦИТОПЕНИИ У КРЫС,
ВЫЗВАННОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ GP120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук