

УДК 616.5-002.525.2-039.11-092.6/.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164

Для цитирования: Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А. Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 155–164.

## Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели

Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФиКИ) 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – выявление на основе индуцируемой воспалительной реакции у интактных мышей предрасположенности к дальнейшему развитию разных клинических вариантов системной красной волчанки.

**Материал и методы.** Низкодозовый системный воспалительный ответ моделировали введением липополисахарида (ЛПС) интактным самкам мышей-гибридов (C57BL/6хDBA/2)F1 (B6D2F1) внутрибрюшинно в дозе 10 нг/мышь или 1 мкг/мышь. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 2, 4, 8, 11, 24 ч, а также на 4- и 8-й нед от момента индукции модели по числу форменных элементов крови (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов), а также соотношению нейтрофилы / лимфоциты (индекс N/L), уровню внеклеточной ДНК (внДНК). Через 1 сут после введения ЛПС у мышей индуцировали модель системной красной волчанки (СКВ): самкам мышей B6D2F1 вводили по  $120 \times 10^6$  клеток селезенки мышей родительской линии DBA/2. Через 3 мес от момента индукции модели у мышей двукратно измеряли уровень белка в моче: при протеинурии 3 мг/мл и более мышей относили к группе СКВ<sup>нефрит+</sup>, при наличии белка в моче менее 3 мг/мл – к группе СКВ<sup>нефрит-</sup>.

**Результаты.** Установлено, что введение ЛПС не влияет на соотношение групп СКВ<sup>нефрит+</sup>/СКВ<sup>нефрит-</sup>. Ретроспективный анализ количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов не позволяет прогнозировать развитие нефрита. При введении ЛПС в дозе 10 нг/мышь наблюдалось достоверное увеличение частоты и абсолютного прироста индекса N/L на 8-й нед относительно 4-й нед после индукции модели в группе СКВ<sup>нефрит+</sup> по сравнению с группой СКВ<sup>нефрит-</sup>. При введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь мыши СКВ<sup>нефрит+</sup> и СКВ<sup>нефрит-</sup> обнаруживают разную динамику воспалительного ответа по приросту индекса N/L в каждой последующей точке относительно предыдущей. Изменение уровня внДНК в группе СКВ<sup>нефрит+</sup> и СКВ<sup>нефрит-</sup> аналогично динамике индекса N/L. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования параметров воспалительного процесса, в частности индекса N/L и уровня внДНК, для прогноза предрасположенности животного к развитию разных вариантов СКВ.

**Ключевые слова:** липополисахарид, индекс N/L, внДНК, модель системной красной волчанки, фенотипическая гетерогенность.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активно развиваются исследования, связанные с изучением фенотипической разнородности аутоиммунных, аллергических,

онкологических заболеваний. Примером фенотипической гетерогенности системной красной волчанки (СКВ) у людей является наличие (более чем у половины больных) или отсутствие люпусного нефрита. Волчаночный нефрит является одним из серьезных проявлений и одним из самых

✉ Гойман Елена Владимировна, e-mail: lgoiman@mail.ru.

сильных предикторов неблагоприятного исхода СКВ.

Наиболее важным клинически релевантным проявлением болезни в модели СКВ на основе хронической реакции «трансплантат против хозяина в полуаллогенной системе» при переносе клеток одного из родителей реципиенту (parent-into- F1)  $P \rightarrow F1$  [1], разработанной в лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИФиКИ, является фенотипическая разнородность – развитие разных клинических вариантов системной красной волчанки: СКВ<sup>нефрит+</sup> и СКВ<sup>нефрит-</sup>. После индукции модели через 3 мес в популяции генетически однородных гибридов F1 у всех мышей имелись признаки СКВ: спленомегалия, гипергаммаглобулинемия, продукция аутоантител к ДНК. При этом у части мышей с более выраженными симптомами СКВ развивается нефрит (СКВ<sup>нефрит+</sup>), а у мышей с менее выраженными симптомами СКВ нефрит отсутствует – СКВ<sup>нефрит-</sup> [2]. Показано, что наличие разных клинических вариантов СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup> связано с преимущественной активацией соответственно Т-клеток-хелперов Th1 или Th2. А соотношение активности Th1- и Th2-субпопуляций, контролирующее выбор варианта, по которому пойдет развитие иммунного процесса в каждом конкретном случае, определяется не только генотипом, но и обусловленными эпигенетическими механизмами изменениями в иммунной системе, сформировавшимися на предыдущих этапах онтогенеза [3].

Сегодня понятно, что сложное взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунным реагированием существует не только при антиинфекционной защите, но также при развитии аутоиммунного ответа [4]. Возможно, что соотношение групп мышей СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup>, равное примерно 50/50 при стандартных условиях опыта (без каких-либо воздействий после индукции модели), обусловлено у части мышей эпигенетическими изменениями в системе врожденного иммунитета, определяющими более сильный воспалительный ответ, что в дальнейшем приведет к формированию группы СКВ<sup>нефрит+</sup>. Для изучения эпигенетических механизмов в развитии воспаления в настоящее время апробируются разнообразные экспериментальные модели. К числу таких моделей относится модель экспериментальной низкодозовой эндотоксемии, когда здоровым людям-добровольцам внутривенно вводится липополисахарид (ЛПС).

Ответ на введение ЛПС у части здоровых лиц выявляет отклонения, характерные для больных

хроническими воспалительными заболеваниями (атеросклероз, диабет, неврологические воспаления, метаболический синдром). Реакция на внутривенное введение ЛПС, который активирует врожденный иммунитет и вызывает специфические метаболические последствия, расценивается как интегральный показатель сложных физиологических, молекулярных и генетических взаимодействий, определяющих воспаление у каждого конкретного индивидуума [5].

Цель работы – выявление на основе индуцируемой воспалительной реакции у интактных мышей предрасположенности к дальнейшему развитию разных клинических вариантов системной красной волчанки.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В опыт были включены здоровые половозрелые 6–8-недельные мыши, содержащиеся в виварии в условиях, соответствующих требованиям эксперимента. Мыши получали гранулированный комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах в рациональных дозах (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты проводили в стандартных условиях содержания животных, соблюдения температурного режима, освещенности. В работе использовали самок мышей-гибридов первого поколения (C57Bl/6хDBA/2)F1 и самок мышей линий DBA/2, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИФиКИ (г. Новосибирск).

Интактным самкам мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F1 (B6D2F1) внутрибрюшинно однократно вводили липополисахарид (ЛПС) *E. coli* штамма 111: B4 (Sigma, США) в дозе 10 нг/мышь или 1 мкг/мышь в физиологическом растворе. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 2, 4, 8, 11, 24 ч, а также на 4- и 8-й нед от момента индукции модели по числу форменных элементов крови (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов), а также соотношению нейтрофилы / лимфоциты (индекс N/L), уровню свободной ДНК. Индекс N/L – это результат деления абсолютного количества нейтрофилов на абсолютное количество лимфоцитов. Для выделения ДНК забор крови производили из хвостовой вены животных в пробирки, содержащие  $3 \times \text{PBS}$ , 30 мМ ЭДТА (PBS – 10 мМ фосфатный буфер; pH 7,4; 0,15 М NaCl). Плазму отделяли от фракции кле-ток центрифугированием в течение 20 мин при 400 g. Для определения количества ДНК,

связанной с клеточной поверхностью, осадок клеток инкубировали 5 мин с 0,25%-м раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (143 мкг ингибитора на 1 мг фермента). Клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 20 мин, отбирали супернатант (трипсиновая фракция). Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (Россия) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Определение свободной циркулирующей ДНК (из плазмы крови) проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen. Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной  $\lambda$  ДНК. Через 1 сут после введения ЛПС у мышей-гибридов индуцировали модель СКВ: самкам B6D2F1 вводили клетки селезенки мышей родительской линии DBA/2 [6]. Каждая мышь-реципиент получала по  $60-70 \times 10^6$  клеток путем внутривенной инъекции в хвостовую вену в объеме 0,5 мл среды двукратно с интервалом в 5–6 сут. Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий, результаты выражали в мг/мл.

Через 3 мес от момента индукции модели у мышей двукратно измеряли уровень белка в моче: при протеинурии 3 мг/мл и более мышей относили к группе СКВ<sup>нефрит+</sup>, при наличии белка в моче менее 3 мг/мл – к группе СКВ<sup>нефрит-</sup> [7].

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием теста Манна – Уитни, критерия Пирсона  $\chi^2$  и пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США) на персональном компьютере. Предварительный анализ вариационных рядов выявил асимметричность распределения признаков. Данные представлены в виде медианы *Me*. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РУЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения интактным реципиентам ЛПС в дозе 10 нг/мышь за 1 сут до индукции модели, через 12 нед у 20 мышей из 38 развился нефрит, у 18 мышей нефрита не было, то есть соотношение мышей СКВ<sup>нефрит+</sup>/СКВ<sup>нефрит-</sup> составило 53/47. При введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь из 19 мышей у 10 мышей развился нефрит, у 9 мышей – нет, соотношение составило 53/47. Таким

образом, введение ЛПС в дозе 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь за 1 сут до индукции процесса не изменяет частоты вариантов СКВ<sup>нефрит+</sup>/СКВ<sup>нефрит-</sup>, которое при стандартных условиях опыта (двукратный перенос клеток селезенки) в среднем также примерно равно 50/50. Однако ранее установлено, что при введении в первые 2 нед после индукции модели соединений, изменяющих баланс Th1/Th2, наблюдается возможность модуляции процесса. Вещества, активирующие Th1-клетки (плазмида pUC19, дегидроэпиандростерон-сульфат), снижают частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита; вещества, стимулирующие Th2-клетки (мурамилдипептид, бисфенол А, пентоксифиллин), увеличивают частоту этого клинического варианта в экспериментальной группе [8].

Известно, что введение ЛПС индуцирует иммунный ответ к ДНК: введение только ЛПС (без экзогенной ДНК) приводит к образованию анти-ДНК антител, что вызывает у интактных мышей заболевание, подобное волчанке. А у мышей NZB/W со спонтанной СКВ оно приводит к более ранней и ускоренной форме волчаночного нефрита, что связано с усилением поликлональной активации В клеток, увеличением титра анти-ДНК антител. Более того, начинающийся мезангиальный нефрит у мышей NZB/W под действием ЛПС трансформируется в диффузный пролиферативный нефрит [9].

Отсутствие влияния введенного интактным мышам ЛПС на соотношение СКВ<sup>нефрит+</sup>/СКВ<sup>нефрит-</sup>, то есть на исход развития СКВ, может быть связано с использованием в данном эксперименте малых доз ЛПС и однократным его применением, в то время как авторы процитированных выше работ использовали многократное введение гораздо более высоких доз ЛПС. В целом, несмотря на то что в большинстве исследований показано усиление Th1-ответа под действием ЛПС, его влияние на дифференцировку в Th2, Th17 и Treg зависит от дозы, пути иммунизации и видов адьюванта. Так, у мышей антиген-специфический Th2-ответ формируется в присутствии низких доз ЛПС (0,1 мкг), а Th1-ответ – при высоких дозах (100 мкг) ЛПС [10].

Как видно из данных, представленных на рис. 1, введение ЛПС в низкой дозе 10 нг/мышь не сопровождается изменениями числа лейкоцитов в динамике, через 2 ч наблюдается подъем количества нейтрофилов, который достигает максимума к 4-му ч, оставаясь достоверно высоким к 6-му ч. В период времени 2–4 ч у животных наблюдается выраженная лимфопения, к 24-му ч от

момента введения эндотоксина в крови нормализуется содержание нейтрофилов и лимфоцитов, что аналогично данным, полученными у людей [11]. В то же время введение ЛПС в дозе 1 мкг/мышь вызывает более выраженные гематологические изменения по сравнению с дозой 10 нг/мышь (см. рис. 1). Снижение числа лейкоцитов в периферической крови, которое наблюдается через 2 ч после инъекции эндотоксина, является одним из ранних изменений, связанных с секвестрацией лейкоцитов в тканях [12]. Последующее увеличение лейкоцитов в основном связано с увеличением их производства (мобилизации) из костного мозга. Кроме циркуляции в кровотоке нейтрофилы могут формировать маргинальные пулы в селезенке, легких, краевой пул в сосудах. Эти маргинальные нейтрофилы играют гомеостатические функции и обладают способностью мобилизоваться назад в циркуляцию. Однако время их пребывания в этих периферических участках остается неизвестным. Как увеличение, так и нормализация численности лейкоцитов (нейтрофилов) опосредуется колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), цитокины ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  также играют ключевую роль в облегчении миграции лейкоцитов за счет увеличения экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках [13].

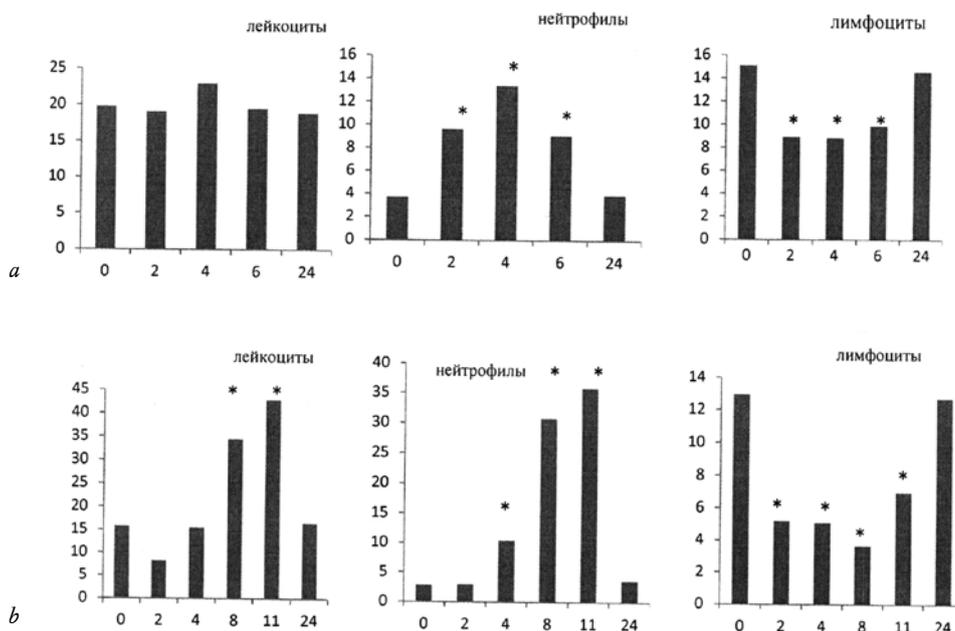


Рис. 1. Динамика изменения форменных элементов периферической крови мышей после введения разных доз ЛПС: *a* – доза ЛПС 10 нг/мышь; *b* – доза ЛПС 1 мкг/мышь. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, ч. По оси ординат – количество клеток  $\times 10^6/\text{мл}$ . \* $p < 0,05$  по сравнению с 0-м ч

Fig. 1. Evaluation of changes in the formed elements of mouse peripheral blood after the administration of different LPS doses: *a* – LPS dose 10 ng/mouse; *b* – LPS dose 1 mg/mouse; X-direction – time passed after LPS administration, hours; Y-direction – number of cells  $\times 10^6/\text{ml}$ ;  $p < 0,05$ , as compared with 0 hour

Введение ЛПС в дозе 1 мкг/мышь и 10 нг/мышь сопровождается разной динамикой развития нейтрофилеза и лимфопении. Однако видно, что гематологические параметры в группе мышей с введением ЛПС в дозе 1 мкг/мышь через 24 ч также возвращаются к своим исходным значениям (см. рис. 1). Приведенные данные наглядно свидетельствуют о том, что введение ЛПС в дозах 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь не приводит к необратимым изменениям картины крови. Таким образом, они являются, наряду с данными об отсутствии изменения баланса СКВ<sup>нефрит+</sup>/СКВ<sup>нефрит-</sup> в опыт-

ной группе мышей после введения ЛПС, дополнительным доказательством того, что введение ЛПС интактным животным не влияет на исход заболевания при дальнейшем введении животных в экспериментальную модель индуцированной СКВ.

Несмотря на то что при ответе на ЛПС в дозе 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь в период 2–4 ч в крови мышей выявляются достаточно большие индивидуальные колебания параметров численности нейтрофилов (нейтрофилез) и лимфоцитов (лимфопения), ретроспективный анализ не вы-

явил возможности использовать их в качестве маркеров, позволяющих прогнозировать развитие СКВ в опытной группе мышей в направлении СКВ<sup>нефрит-</sup> или СКВ<sup>нефрит+</sup>. Кроме того, в стандартных условиях опыта – индукция модели без предварительного введения ЛПС – у мышей с выраженной лимфопенией и большими индивидуальными колебаниями лимфоцитов, которые выявляются в 1–3-ю нед после индукции модели, не удалось прогнозировать развитие СКВ<sup>нефрит-</sup> или СКВ<sup>нефрит+</sup> [14]. Изучение взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета в формировании хронического слабовыраженного воспаления, являющегося ключевой особенностью ряда патологических состояний (атеросклероза, диабета, онкологии, аутоиммунных заболеваний), обуславливает необходимость поиска новых экспериментальных моделей, повышения эффективности использования традиционных маркеров воспаления. К числу таких маркеров относится достаточно простой параметр – индекс N/L как биологический маркер системного воспаления

и предиктор, положительно коррелирующий с исходом заболеваний, обусловленных наличием хронического системного воспаления низкого уровня. Сегодня он является предиктором неблагоприятного прогноза рака и сердечно-сосудистых заболеваний среди населения в целом [15]. Хотя основной механизм изменения количества лейкоцитов может быть неодинаковым при различных патологических состояниях, характеризующихся наличием слабовыраженного воспаления, общий паттерн комбинированной нейтрофилии и лимфопении может обнаруживаться при этих стрессовых состояниях [16, 17].

Ретроспективный анализ средних значений индекса N/L в течение 1 сут после введения ЛПС в дозе 10 нг/мышь выявляет лишь тенденцию более раннего и более выраженного ответа на эндотоксин у животных, у которых впоследствии развился нефрит, но не выявил возможности использовать его в качестве маркера, позволяющего прогнозировать развитие СКВ в опытной группе мышей в направлении СКВ<sup>нефрит-</sup> или СКВ<sup>нефрит+</sup> (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменения индекса N/L у мышей после введения ЛПС в дозе 10 нг/мышь, Me					
Группа	Время, ч				
	0	2	4	6	24
СКВ <sup>нефрит-</sup> , n = 14	0,24 (0,2–0,5)	0,97 (0,3–2,1)	1,5 (0,4–3,9)	0,9 (0,5–1,7)	0,29 (0,11–0,6)
СКВ <sup>нефрит+</sup> , n = 14	0,3 (0,13–0,6)	1,5 (0,4–2,7)	1,9 (0,84–3,2)	0,9 (0,3–1,6)	0,23 (0,2–0,4)

Ретроспективный анализ средних значений лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в группе СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup> на более поздних сроках наблюдения – 4- и 8-й нед не выявляет каких-либо существенных различий. При этом средние значения и индивидуальные колебания индекса N/L также выявляют тенденцию его увеличения в группе СКВ<sup>нефрит+</sup> по сравнению с группой СКВ<sup>нефрит-</sup> на 8-й нед по сравнению с 4-й нед от момента индукции модели (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Средние значения индекса N/L у мышей после индукции СКВ, Me		
Группа	Время, нед	
	4	8
СКВ <sup>нефрит-</sup> , n = 13	0,29 (0,14–0,43)	0,27 (0,1–0,46)
СКВ <sup>нефрит+</sup> , n = 14	0,30 (0,12–0,52)	0,35 (0,07–0,79)

Для нормирования колебаний индекса N/L у каждого отдельного животного было подсчитано изменение (прирост/убыль) индекса N/L к 8-й нед относительно 4-й нед и установлено, что прирост индекса N/L в группах СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup> достоверно отличался. У мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> выявлялся существенный прирост индекса N/L, и он составлял в среднем 25,1%, у мышей СКВ<sup>нефрит-</sup> – в пределах ошибки измерения (1,5%).

Эти изменения в группах касаются и частотных характеристик: прирост индекса N/L выявляется у 10 из 14 мышей СКВ<sup>нефрит+</sup>, и только у четырех из 13 мышей СКВ<sup>нефрит-</sup> (уровень статистической значимости различий индекса прироста с наличием протеинурии по критерию Пирсона  $\chi^2$  соответствует  $p < 0,05$ ).

Важно, что прирост индекса N/L выявляет подгруппу мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> до выявления протеинурии, которая начинает определяться у мышей этой группы на 10–12 нед от момента индукции модели. Аналогичные данные получены

в стандартной модели СКВ без введения ЛПС у 15 интактных животных. Через 12 нед мыши были разделены на группы: восемь мышей составили группу СКВ<sup>нефрит+</sup>, семь мышей – СКВ<sup>нефрит-</sup>. Ретроспективный анализ средних значений индекса N/L на 4- и 5-й нед не выявил каких-либо существенных различий в группах. Прирост индекса на 5-й нед относительно 4-й нед у мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> составил в среднем 70%, тогда как в группе СКВ<sup>нефрит-</sup> – в пределах ошибки измерения (1,4%).

По литературным данным известно, что значение индекса N/L является хорошим прогностическим маркером: у пациентов с СКВ индекс N/L достоверно выше по сравнению со здоровыми людьми. Средние значения индекса у больных СКВ с люпусным нефритом достоверно выше, чем у больных без нефрита, что позволяет отнести его к перспективным маркерам, отражающим поражение почек у пациентов с СКВ, который имеет преимущества по сравнению с определением креатинина и измерением суточной протеинурии: он более дешев, быстро и легко измеряется [18].

Таким образом, в экспериментальной модели СКВ выявлялся достоверный прирост значений индекса N/L на 8-й нед относительно 4-й. Мы полагаем, что достоверный прирост этого показателя связан с началом развития нефрита в группе мышей СКВ<sup>нефрит+</sup>, что согласуется с данными у человека [19]. Возможность обнаружить группу мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> на сроке 8 нед по приросту индекса N/L представляется важным, так как в этот срок у мышей не выявлялась протеинурия,

на основании которой мыши были включены в фенотипически разнородные группы СКВ<sup>нефрит+</sup> и СКВ<sup>нефрит-</sup>. Стоит отметить, что группа СКВ<sup>нефрит-</sup> – это группа мышей, у которых отмечаются минимальные морфологические изменения в почках, не приводящие к значимой протеинурии, что близко клиническим наблюдениям. Морфологические изменения в почках определяются практически у всех больных СКВ, тогда как клинические признаки поражения почек выявляются у 50–80% больных [20]. Сравнение представленных данных с изменением индекса N/L при СКВ чел. У людей в периферической крови выявляются преимущественно полиморфноядерные клетки, тогда как у мышей примерно 79% всех ядродержащих клеток – мононуклеарные. При оценке трансляционных возможностей экспериментальных моделей расстройств иммунитета у животных и человека эти различия морфологической картины крови в литературе не обсуждаются. Многие исследования на мышах в настоящее время выполняются с нейтрофилами, выделенными из костного мозга, хотя, как известно, нейтрофилы костного мозга неоднородны и функционально незрелы.

Ретроспективный анализ ответа интактных мышей на ЛПС в дозе 1 мкг/мышь показал, что мыши в последующем разделившиеся на группу СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup> проявляют разную кинетику воспалительного ответа, определяемую по индексу N/L: у мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> ответ развивается быстрее по сравнению с мышами СКВ<sup>нефрит-</sup> (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Индекс N/L у мышей после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь, Me						
Группа	Время, ч					
	0	2	4	8	11	24
СКВ <sup>нефрит-</sup> , n = 4	0,2 (0,07–0,3)	0,54 (0,35–1,13)	1,9 (1,1–3,3)	9,1 (6,7–11,5)	6,6 (4,9–8,1)	0,24 (0,04–0,52)
СКВ <sup>нефрит+</sup> , n = 6	0,2 (0,19–0,3)	0,57 (0,25–0,96)	2,5 (1,3–4,9)	8,9 (4,9–13,3)	5,6 (2,3–13,2)	0,4 (0,3–0,5)

Как видно из данных табл. 3, максимальные различия по средним значениям индекса N/L у мышей СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup> выявляются через 4 ч после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь. Поскольку более существенный прирост индекса

наблюдается у мышей из группы СКВ<sup>нефрит+</sup> в период 2–4 ч, а у мышей из группы СКВ<sup>нефрит-</sup> в период 4–8 ч, был рассчитан прирост индекса N/L на каждый последующий час относительно предыдущего часа (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Прирост индекса N/L в крови мышей после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь					
Группа	Время, ч				
	0	4	8	11	24
СКВ <sup>нефрит-</sup> , n = 9	0,2	3,0	4,8	0,2	0,9
СКВ <sup>нефрит+</sup> , n = 10	0,2	5,8	3,2	0,6	0,9

Таким образом, ретроспективный анализ изменения индекса N/L у мышей при введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь до индукции модели показал, что мыши, впоследствии включенные в группы СКВ<sup>нефрит+</sup> и СКВ<sup>нефрит-</sup>, проявляют разную динамику воспалительного ответа, определяемую по приросту индекса N/L в каждой определяемой точке – 0 ч, 4, 8, 11, 24 ч относительно предыдущей. У мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> ответ развивается сильнее и быстрее по сравнению с мышами СКВ<sup>нефрит-</sup>. У мышей СКВ<sup>нефрит+</sup> максимум ответа наблюдается через 4 ч, у мышей СКВ<sup>нефрит-</sup> – 8 ч.

Одной из отличительных черт СКВ является наличие антител к двухцепочечной ДНК. Появление в организме внеклеточных нуклеиновых кислот напрямую связано с протекающими в организме процессами воспаления, приводящими к гибели клеток и нарушениям клиренса погибающих клеток. Таким образом, определение уровня внеклеточной ДНК (внДНК) представляется подходящим маркером для определения динамики протекания и степени заболевания. Был определен уровень внДНК в плазме интактных животных до и после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь. Ретроспективный анализ показал, что мыши, в последующем включенные в группы СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup>, имели разную динамику изменения уровня внДНК. В среднем в группе мышей с СКВ<sup>нефрит+</sup> уровень внДНК повышался, а затем снижался раньше, чем у мышей с СКВ<sup>нефрит-</sup> (рис. 2). При сравнении данных табл. 4 и рис. 2 видно, что изменения

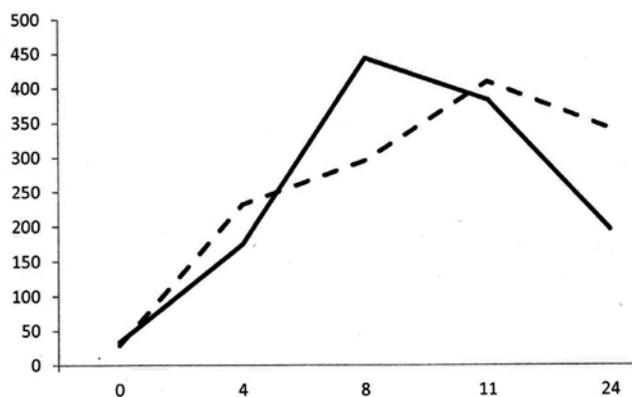


Рис. 2. Ретроспективный анализ средних значений уровня внеклеточной ДНК в плазме интактных животных после введения ЛПС 1 мкг/мышь. Пунктирная линия – СКВ<sup>нефрит-</sup>; сплошная линия – СКВ<sup>нефрит+</sup>. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, час; по оси ординат – концентрация внДНК, нг/мл

Fig. 2. Retrospective analysis of mean values of extracellular DNA level of in plasma of intact animals after LPS administration 1 mg/mouse: dashed line – systemic lupus erythematosus<sup>nephritis</sup>; continuous line – systemic lupus erythematosus<sup>nephritis+</sup>; X-direction – time passed after LPS administration, hours; Y-direction – amount of extracellular DNA, ng/ml

индекса N/L и уровня внДНК каждой из подгрупп имеют сходную динамику. Так, в группе СКВ<sup>нефрит+</sup> через 4 ч выявляется максимум ответа по индексу N/L, а со сдвигом на 4 ч определяется максимум уровня внДНК. В группе СКВ<sup>нефрит-</sup> максимум ответа по индексу N/L выявляется через 8 ч, а со сдвигом на 4 ч определяется максимум уровня внДНК. Феномен повышенной концентрации внДНК в крови определяется как отличительный признак не только при патологических состояниях, протекающих с острым воспалением (инсульт, сепсис, травма, инфаркт миокарда), но и при хронических воспалительных процессах, включая онкологические, аутоиммунные заболевания, напряженные физические нагрузки, и обусловлен воспалением или aberrантной (усиленной) гибелью клеток. Несмотря на то что патофизиологический смысл этого феномена остается малопонятным, уровень внДНК рассматривается не только в качестве биомаркера клеточной гибели, содержащего общую оценку процессов гибели клеток, но и биомаркера прогноза этих процессов и возможную терапевтическую мишень [21]. Сегодня внДНК известна не только как биомаркер, но описаны ее потенциальные функциональные эффекты – способность избирательно стимулировать продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-6 моноцитами человека [22]. На основе представленных данных достаточно затруднительно судить об источнике внДНК. Можно предполагать, что появление внДНК связано с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НЕТоза). Известно, что ЛПС используется в условиях *in vitro* как индуктор НЕТоза. По данным [23], у больных СКВ наличие активного люпусного нефрита коррелирует с повышенным уровнем свДНК в плазме, обусловленным нарушением регуляции НЕТоза у этих больных.

Новые исследования показали, что TLRs являются ключевыми регуляторами как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, и посттрансляционные модификации могут приводить к изменению их функциональной активности [24]. Изменение передачи сигналов TLRs модулирует функцию дендритных клеток (ДК), связывающих врожденный и адаптивный иммунный ответ. Выключение в ДК миелоидного фактора дифференцировки 88 – ключевого адаптора в передаче TLRs-сигнала – приводит к преимущественной ингибции дифференцировки Th1 и соответственно изменению баланса Th1/Th2 продукции цитокинов в сторону Th2-клеток (т.е. увеличению секреции цитокинов Th2 типа IL-4 и IL-5) и соответственно торможению аллоиммунного ответа [25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена взаимосвязь гетерогенности ответа интактных конвенциональных мышей-гибридов B6D2F1 на введение ЛПС до индукции СКВ с последующим развитием разных клинических вариантов СКВ (с нефритом и без нефрита). Модель поляризации Th1/Th2 иммунного ответа в полуаллогенной системе DBA/2 → B6D2F1, приводящая к формированию разных клинических исходов СКВ<sup>нефрит-</sup> и СКВ<sup>нефрит+</sup>, представляет собой чувствительную к воздействиям систему. Она не только служит для оценки воздействий на баланс субпопуляций Th1/Th2 *in vivo*, определяющих соответствующий адаптивный иммунный ответ, но также для изучения эпигенетических изменений в системе врожденного иммунитета, детерминирующих в дальнейшем формирование адаптивного иммунного реагирования. Разная динамика ЛПС-индуцированного воспалительного ответа, оцениваемая у интактных мышей с помощью индекса N/L и внДНК и соотношенная с формированием разных клинических вариантов СКВ, свидетельствует о перспективности использования данного подхода для оценки эпигенетических изменений в системе врожденного иммунитета и прогноза возможного исхода заболевания.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии финансовой поддержки при проведении исследований.

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом НИИФиКИ (протокол № 92 от 10.11.2015 г.)

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Xu Y., Zeumer L., Reeves W., More L. Induced murine models of systemic lupus erythematosus // *Methods Mol. Biol.* 2014; 1134: 103–130.
- Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Tkachev V.O., Volsky N.N., Perminova O.M., Gavrilova E.D., Kozlov V.A. The Experimental Model of the Autoimmune Glomerulonephritis Induced by the Chronic Graft versus Host Reaction. In: Prabhakar S. (Ed.). An Update on

- Glomerulopathies – Etiology and Pathogenesis. InTech, 2011: 49–86. ISBN 978-953-307-388-0.
- Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Volsky N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Экспериментальная модель аутоиммунного процесса: роль эпигенетической изменчивости в популяции мышей-гибридов // *Вестник РАМН.* 2015; 70 (2): 152–158.
  - Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Volsky N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Eksperimental'naya model' autoimmunnogo protsessa: rol' epigeneticheskoy izmenchivosti v populyatsii myshey-gibridov. [Experimental model of autoimmune process: the role of epigenetic variability in the population of hybrid mice] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015; 70 (2): 152–158 (in Russian).
  - Salem D., Subang R., Laplante P., Levine J.S., Rauch J. The dual role of innate immunity in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus // *Lupus.* 2014; 23 (12):1327–1331.
  - Patel P.N., Shah R.Y., Ferguson J.F., Reilly M.P. Human Experimental Endotoxemia in Modeling the Pathophysiology, Genomics and Therapeutics of Innate Immunity in Complex Cardiometabolic Diseases // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2015; 35 (3): 525–534.
  - Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host disease // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987; 43 (1): 97–109.
  - Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Loginov V.A., Robinson M.V., Kolesnikova S.M., Kozlov V.A. Показатели эритро- и иммунопоеза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина // *Вестн. АМН СССР.* 1991; 12: 13–16.
  - Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Loginov V.A., Robinson M.V., Kolesnikova S.M., Kozlov V.A. Pokazateli eritro-i immunopoeza v razvitii autoimmunnykh zabolevaniy, indutsirovannykh khronicheskoy reaktsiyey transplantat protiv khozyaina [The parameters of erythro- and immunopoiesis in the development of autoimmune diseases induced by the chronic graft versus host reaction] // *Vestnik AMN SSSR.* 1991; 12: 13–16 (in Russian).
  - Vlasov V.V., Rykova E.Yu., Safronova I.V., Laktionov P.V., Kudaeva O.T., Kozlov V.A. Модуляция течения хронической реакции трансплантат против хозяина // *Доклады академии наук.* 2002; 32 (6): 844–846.
  - Vlasov V.V., Rykova E.Yu., Safronova I.V., Laktionov P.V., Kudaeva O.T., Kozlov V.A. Modulyatsiya techeniya khronicheskoy reaktsii transplantat protiv khozyaina [Modulation of the course of the chronic graft-versus-host reaction] // *Doklady akademii nauk.* 2002; 32 (6): 844–846 (in Russian).
  - Cavallo T., Granholm N. Accelerated (proliferative) lupus nephritis // *American Journal of Pathology.* 1990; 137 (6): 1549–1551.

10. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen // *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1645–1651.
11. Kiers D., Koch R., Hamers L., Gerretsen J., Thijs E., van Ede L., Riksen N., Kox M., Pickkers P. Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin // *Scientific Reports.* 2017; 7: 40149. DOI: 10.1038/srep40149.
12. Pajkrt D., Manten A., van der Poll T., Tiel-van Buul M.M., Jansen J., Wouter ten Cate J., van Deventer S. Modulation of cytokine release and neutrophil function by granulocyte colony-stimulating factor during endotoxemia in humans // *Blood.* 1997; 90: 1415–24.
13. Marsik C., Mayr F., Cardona F., Schaller G., Wagner O., Jilma B. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans // *J. Clin. Immunol.* 2004; 24: 62–65.
14. Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Ильина Н.А., Борисов В.И., Кожевников В.С., Колесникова О.П., Козлов В.А. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией «трансплантат против хозяина» // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 149 (1): 60–63.
- Goiman E.V., Kudaeva O.T., Ilna N.A., Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. Processes of homeostatic proliferation in the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis, induced by the chronic “graft versus host” reaction // *Bulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010; 149 (1): 60–63 (in Russian).
15. Li H., Lu X., Xiong R., Wang S. High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Cardiovascular Mortality in Chronic Hemodialysis Patients // *Mediators Inflamm.* 2017. DOI: 10.1155/2017/9327136.
16. Seong M.K. Prognostic inflammation score in surgical patients with colorectal cancer // *Korean. Med. Sci.* 2015; 30: 1793–1799.
17. Huang W., Huang J., Liu Q., Lin F., He Z., Zeng Z., He L. Neutrophil-lymphocyte ratio is a reliable predictive marker for early-stage diabetic nephropathy // *Clin. Endocrinol.* 2014; 82: 229–33.
18. Chen Y., Yang X., Chen L., Yang Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus // *International Immunopharmacology.* 2016; 36: 94–99.
19. Li L., Xia Y., Chen C., Cheng P., Peng C. Neutrophil-lymphocyte ratio in systemic lupus erythematosus disease: a retrospective study // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8 (7): 11026–11031.
20. Waldman M., Madaio M.: Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis // *Lupus.* 2005; 14: 19–24.
21. Lam N.Y.L., Rainer T.H., Chan L.Y.S., Joynt G.J., Lo Y.M.D. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients // *Clin. Chem.* 2003; (49): 1286–1291.
22. Atamaniuk J., Kopecky C., Skoupy S., Sdemann M.D., Weichhart T. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012; 27 (3): 902–905. DOI: 10.1093/ndt/gfr695.
23. Zhang S., Lu X., Shu X., Tian X. et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus // *Intern. Med.* 2014; 53: 2763–71.
24. Leifer C.A., Medvedev A.E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling // *J. Leukoc Biol.* 2016; 100 (5): 927–941.
25. Bao W., Qin X., Guan N., Wang S., Zhu J., Sun X., Zhou H., Zhu Z., Zhu C. MyD88-silenced dendritic cells induce T-cell hyporesponsiveness and promote Th2 polarization in vivo // *Cytotherapy.* 2015; 17: 1240–1250.

Поступила в редакцию 28.04.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Колесникова Ольга Петровна, д-р мед. наук, зав. лабораторией экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Гойман Елена Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Гаврилова Елена Давидовна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Демченко Елена Николаевна, канд. хим. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, академик РАН, научный руководитель НИИФиКИ, г. Новосибирск.

(✉) Гойман Елена Владимировна, e-mail: l.goiman@mail.ru.

УДК 616.5-002.525.2-039.11-092.6/.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164

For citation: Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 155–164.

## Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus

Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14, Str. Yadrintsevskaya, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

### ABSTRACT

**The study** aimed at evaluating the predisposition for development of different variants of SLE based on an inflammatory response in intact mice.

**Materials and methods.** Low-dose systemic inflammatory response was modeled by the administration of lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* (strain 111: B4) by intact B6D2F1 recipients in the dose of 10 ng/mouse or 1 µg / mouse. We evaluated the number of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes in the blood, the index of neutrophils / lymphocytes (ratio N/L), and the level of free DNA (cf DNA cell free) in dynamics. The first day after LPS injection we induced SLE model: the female B6D2F1 mice were injected 60–70 x 10<sup>6</sup> spleen cells of the DBA / 2 parent mice twice with interval five days. Three months after the induction of the model, the level of protein in the urine was measured twice: the mice with proteinuria 3 mg/ml and more were assigned to the group SLE<sup>nephritis+</sup>, and mice with less than 3 mg/ml of protein in the urine were assigned to the group SLE<sup>nephritis-</sup>.

**Results.** It was established that administration of LPS does not change the frequency of nephritis in mice. The retrospective analysis of the number of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes does not allow the prediction of the development of nephritis. We observed a significant increase in the frequency and the absolute value of the N/L index at week 8 relative to 4 weeks four weeks before the appearance of proteinuria in the group of mice SLE<sup>nephritis+</sup> in contrast to mice SLE<sup>nephritis-</sup> when LPS was administered at a dose of 10 ng/mouse. Mice SLE<sup>nephritis+</sup> and SLE<sup>nephritis-</sup> show different kinetics of the inflammatory response by an increase in the N/L index every subsequent hour relative to the previous one when LPS was administered at a dose of 1 µg/mouse. The dynamics of the cfDNA level is similar to the kinetics of an index N/L in the group SLE<sup>nephritis+</sup> and the SLE<sup>nephritis-</sup>. The data obtained indicate the possibility of using of the index N/L and cfDNA level as a parameter of inflammatory response in mice and prediction of the susceptibility the development of nephritis.

**Key words:** LPS, index N/L, cfDNA, SLE model, phenotyping heterogeneity.

Received April 28.2017

Accepted November 08.2017

**Kolesnikova Olga P.**, DM, Head of the Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Goiman Elena V.**, PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Gavrilova Elena D.**, PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Demchenko Elena N.**, PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Kozlov Vladimir A.**, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

✉ Goiman Elena V., e-mail: l.goiman@mail.ru.