

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА ИММУННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ В ПОЧКАХ МЫШЕЙ, РАЗВИВАЮЩИХ АУТОИММУННЫЙ ПРОЦЕСС ПОД ДЕЙСТВИЕМ HgCl₂

© А. С. Арефьева,^{1,*} П. А. Дыбан,² М. С. Красильщикова,¹ Ю. Добруцки,³ О. В. Зацепина^{1,**}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва,

² Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

и ³ Ягеллонский университет, Краков, Польша;

*электронный адрес: quality4@rambler.ru, ** электронный адрес: zatsepina_olga@mail.ru

Характерным признаком системных аутоиммунных болезней наряду с появлением аутоантител к антигенам собственного организма является также формирование отложений иммуноглобулинов и компонентов комплемента в почках. Однако механизмы формирования отложений и их возможные цитопатические эффекты на сегодняшний день неизвестны. В настоящей работе мы использовали мышей линии SJL/J, которые развивают аутоиммунный процесс, сопровождающийся выработкой аутоантител к белку ядрышка фибрилларину в ответ на регулярные инъекции сублетальных доз HgCl₂. Полученные результаты показали, что иммунные отложения присутствуют в области почечных телец всех животных, однако степень их выраженности прямо коррелировала с титром аутоантител к фибрилларину и была минимальной у контрольных (неаутоиммунных) мышей. С помощью конфокальной микроскопии показано, что иммунные отложения пронизывают тельца на большую глубину и отчетливо выявляются внутри мезангиальных клеток. Иммунные отложения полностью колокализовались с С3-компонентом комплемента, но не с основным аутоантигеном — белком ядрышка фибрилларином. Нам не удалось обнаружить признаки пролиферации или гибели клеток в составе почечных клубочков. Наиболее явное различие между аутоиммунными и контрольными животными заключалось в наличии иммунных отложений в стенках кровеносных сосудов. Это указывает на то, что деструктивные и дисфункциональные изменения почек, сопровождающие развитие аутоиммунных болезней, могут быть связаны, в частности, с поражениями ренальных кровеносных сосудов.

Ключевые слова: патологии аутоиммунитета, иммунные комплексы, почка, мышцы линии SJL/J, HgCl₂.

Аутоиммунные заболевания являются одними из наиболее распространенных болезней в мире и в индустриально развитых странах поражают до 8 % населения. В подавляющем большинстве случаев от аутоиммунных болезней страдают женщины.

Аутоиммунные заболевания относятся к серьезным поражениям иммунной системы, при которых у больных людей в избытке появляются антитела к антигенам собственного организма (аутоантитела), способствующие деструктивным изменениям органов и тканей (Jacobson et al., 1997; Helmick et al., 2008). Причины возникновения аутоиммунных болезней до сих пор неизвестны. Есть серьезные основания полагать, что развитию системных (органонеспецифических) аутоиммунных заболеваний может способствовать регулярная подверженность организма человека низким дозам соединений тяжелых металлов, в первую очередь ртути (Navarinasab et al., 2009). Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что в крови людей, подвергавшихся длительному воздействию тяжелых металлов на производстве, появляются аутоантитела к некоторым антигенам клеточного ядра (Silva et al., 2004; Silbergeld et al., 2005; Da Costa et al., 2008). Кроме того, соли ртути (например, HgCl₂) индуцируют образование ауто-

антител у лабораторных животных определенных генетических линий при регулярном введении с питьевой водой, путем подкожных инъекций или ингаляций (Hansson, Abedi-Valugerdi, 2003; Rowley, Monestier, 2005). Эти данные позволяют рассматривать лабораторную (животную) модель аутоиммунного процесса, индуцированного соединениями ртути, в качестве аналога системных аутоиммунных заболеваний, возникающих у людей. Удивительным является тот факт, что как у людей, так и у животных соединения ртути вызывают выработку аутоантител преимущественно против одного антигена — белка ядрышка фибрилларина (Van Eenennaam et al., 2002; Rhodes, Vyse, 2007). Фибрилларин относится к наиболее эволюционно консервативным эукариотическим белкам, основная функция которого связана с ранним процессингом пре-рРНК и метилированием рРНК (Kono et al., 2001; Reichow et al., 2007).

Характерным признаком аутоиммунных патологий является формирование отложений иммуноглобулинов (или иммунных отложений) в почках (Bigazzi, 1999; Navarinasab et al., 2009). Под иммунными отложениями понимают в первую очередь скопления, выявляемые в реакции непрямой иммуноцитохимии с использованием антител к

суммарным иммуноглобулинам — IgG, IgM и IgA. Как правило, иммуноглобулины вступают во взаимодействие с антигенами и компонентами комплемента (в частности, с C3—компонентом комплемента); в этом случае отложения называют иммунными комплексами (Tormey et al., 2001; Markowitz, D'Agati, 2009). Однако до сих пор неизвестно, в каких типах клеток кроме мезангиальных могут формироваться иммунные отложения, какова их внутриклеточная топология и обладают ли они цитотоксичностью по отношению к пораженным клеткам. Отсутствие четких ответов на эти вопросы препятствует выяснению молекулярных механизмов образования иммунных отложений и их влияния на функциональное состояние органа в целом. В настоящей работе мы использовали мышей линии SJL/J, способных развивать индуцированный аутоиммунный процесс, сопровождающийся выработкой аутоантител к фибрилларину (Красильщикова и др., 2006) в ответ на регуляторные инъекции сублетальных доз HgCl₂, для изучения топологии и возможной цитотоксичности иммунных отложений в почках.

Материал и методика

Животные. Эксперименты проводили на самках мышей линии SJL/J (гаплотип H-2s) 8-недельного возраста (ФИБХ РАН, Пушино).

Инъекции HgCl₂, забор крови и органов. Мышам дважды в неделю в течение 6 (1 мышь) и 9 (2 мыши) нед подкожно инъецировали 40 мкг HgCl₂ (Sigma, США) в 0.1 мл стерильного 0.9%-ного NaCl (Биохимик, Россия) из расчета 1.6 мг на 1 кг массы животного (Красильщикова и др., 2006). Контрольным животным аналогичным образом инъецировали 0.1 мл стерильного 0.9%-ного NaCl. Кровь брали ретроорбитальной венозной пункцией до начала инъекций и в конце эксперимента (6—9 нед). Для получения сыворотки кровь выдерживали 30 мин при 37 °C и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. По окончании инъекций животных умерщвляли путем цервикальной дислокации и быстро удаляли почки для последующего морфологического и иммуногистохимического анализа.

Контроль наличия аутоантител к фибрилларину у в сыворотке крови мышей осуществляли путем иммуноцитохимического окрашивания клеток мыши линии NIH/3T3. Клетки выращивали на покровных стеклах в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, глутамин и антибиотики — пенициллин и стрептомицин в стандартных концентрациях (ПанЭко, Россия), при 37 °C и 5 % CO₂. Затем иммобилизованные на стеклах клетки отмывали от среды культивирования в 0.1 М PBS (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ K₂HPO₄ и 8.1 мМ Na₂HPO₄, pH 7.2—7.4) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом/ПФА (MP Biomedicals Inc., США) в 0.1 М PBS 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали в 0.1 М PBS 3 раза по 10 мин и инкубировали в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 (MP Biomedicals Inc., США) на PBS 10 мин на льду, затем промывали в 0.1 М PBS 4 раза по 5 мин. Препараты клеток инкубировали с первыми антителами (сыворотки интактных и экспериментальных животных в разведении 1 : 50) 45 мин при 37 °C во влажной камере, промывали в 0.1 М PBS 3 раза по 10 мин и инкубировали со вторыми антителами во влажной камере 45 мин при 37 °C. Для уменьшения неспецифического связывания антител в рас-

твор добавляли 0.05 % Твин-20 (Хеликон, Россия). В качестве вторых антител использовали антитела к IgG мыши, конъюгированные с Cy2, в разведении 1 : 200 (JacksonImmunoRes Lab., США), после чего клетки отмывали в 0.1 М PBS 3 раза по 10 мин и окрашивали хроматин раствором флуоресцентного красителя DAPI (4', 6'-диамидино-2'-фенилиндол/4') (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл при комнатной температуре 10 мин. Препараты заключали в мовиол, содержащий DABCO (1, 4-диазобисцикло [2, 2, 2] октан) (Sigma, США) и изучали с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Аксиоверт 200 (Carl Zeiss, Германия) или в случае необходимости — хранили при 4 °C в темноте.

Конечным титром аутоантител считали такое разведение сыворотки в PBS, при котором она переставала специфически окрашивать клетки. Аналогичный подход рутинно применяется во всех работах, посвященных клинико-лабораторному анализу титра аутоантител у аутоиммунных больных и животных (Hansson, Abedi-Valugerdi, 2003).

Морфологический анализ почечной ткани. Почки разрезали на кусочки размером 1 мм³, фиксировали в смеси Буэна, содержащей пикриновую кислоту, нейтральный формалин и ледяную уксусную кислоту в соотношениях 15 : 5 : 1, и заливали в парафин по стандартной методике (Ромейс, 1953). Срезы толщиной 5—10 мкм окрашивали гематоксилином Караччи, содержащим 0.1%-ный раствор эозина (Ромейс, 1953), и изучали с помощью светового микроскопа AxioImager, снабженного цветной камерой AxioCam (Carl Zeiss, Германия), используя объектив Plan-Apochromat 40×1.3

Имуногистохимический анализ почечной ткани. Половинки почек быстро замораживали и получали срезы толщиной 5—7 мкм с помощью криостата MICROM HM 525 (Microm, Германия) при –20 °C. Срезы переносили на предметные стекла, промывали в холодном (4—10 °C) 0.1 М PBS и готовили для иммуноцитохимического окрашивания, как описано в литературе (Martinsson, Hultman, 2006). Часть срезов сразу высушивали на воздухе в течение 10 мин. Другие срезы сначала фиксировали абсолютным ацетоном 5 мин при –18—20 °C, а затем высушивали, как описано выше. Срезы инкубировали с антителами к суммарным иммуноглобулинам мыши (IgA, IgG и IgM), конъюгированными с ФИТЦ, в разведениях от 1 : 50 до 1 : 32 000 (ИМТЕК, Россия) или ТРИТЦ в разведении 1 : 200 (JacksonImmunoRes Lab., США) 45 мин при 37 °C во влажной камере, промывали в PBS 3 раза по 10 мин, окрашивали хроматин красителем DAPI 10 мин и заключали в мовиол. Препараты изучали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Аксиоверт 200 (Carl Zeiss, Германия) и конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS-SP (Leica, Германия). В качестве контроля использовали препараты, окрашенные 100 нМ раствором TMRE (тетраметилпродамин) в PBS (Molecular Probes Inc., США).

Для оценки величины иммунных отложений использовали подход, в основу которого положены представления о том, что отложения, содержащие больше иммуноглобулинов, будут выявляться при больших разведениях антител к суммарным иммуноглобулинам мыши, а величина иммунных отложений может быть выражена в разведении антител, при котором они перестают обнаруживать антиген на иммуноцитохимическом уровне (Martinsson, Hultman, 2006).

Выявление сосудов почки красителем Col-F. Ранее показано, что краситель Col-F (Dobrucki et al., 2006) селективно связывается с коллагеновыми и эластиновыми волокнами в составе стенок сосудов в нефиксированных тканях. Однако возможность применения красителя в сочетании с иммунохимическим окрашиванием гистологических срезов до начала выполнения работы не анализировалась. Поэтому для одновременного выявления иммунных отложений и эластиновых и коллагеновых волокон на криосрезах нами был разработан следующий протокол. Половинки почек промывали в среде ДМЕМ и инкубировали в растворе Col-F в конечной концентрации 1 мкг/мл 1 ч при 37 °С. Затем препараты промывали в PBS, прикрепляли на держатель криостата, замораживали при -20 °С и изготавливали срезы, как описано выше. Чтобы удалить поврежденную и неспецифически окрашенную ткань, первый срез делали толщиной около 50 мкм. Срезы, фиксированные ацетоном, инкубировали с антителами к суммарным иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с ТРИТЦ в разведении 1 : 200, окрашивали DAPI и заключали в мовиол.

Имуногистохимический анализ состава иммунных комплексов производили с использованием антител к С3-компоненту комплемента мыши в разведении 1 : 10 (Abscam, США) и аутоиммунной сыворотки больного ревматоидным артритом, содержащей аутоантитела к фибрилларину в разведении 1 : 200 (Мухарьямова и др., 1998). В качестве вторых антител служили антитела к IgG мыши или человека, конъюгированные с Техасским красным в разведении 1 : 200 (JacksonImmunoRes Lab., США).

Выявление гибнущих клеток методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) на криосрезах органов производили, используя набор фирмы Upstate (США), руководствуясь рекомендациями фирмы-производителя. Криосрезы промывали холодным (4—10 °С) PBS в течение 5 мин и фиксировали ацетоном, как указано выше. Затем обрабатывали ткань раствором протеиназы К (40 мкг/мл) при 37 °С 15—30 мин (50 мкл/срез), отмывали в PBS 4 раза по 2 мин и инкубировали с реакционным буфером TdT в концентрации 3 ед./мкл 5—10 мин (50 мкл/срез). Помещали срезы в 50 мкл смеси реакционного буфера TdT, биотина-dUTP (биотинилированный дезоксиридинтрифосфат) и TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза) в соотношении 90 : 5 : 5 на 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, помещая в буфер терминирования реакции на H₂O на 5 мин при комнатной температуре. Инкубировали срезы в 50 мкл раствора авидина-ФИТЦ 30 мин при 37 °С в темноте. Промывали срезы в PBS 2 раза по 15 мин в темноте при комнатной температуре, докрашивали DAPI и заключали в мовиол. Контролем служили срезы, обработанные 1 мкг/мл ДНКазы I 60 мин при 37 °С.

Результаты

Анализ титра аутоантител в сыворотках крови мышей. Как известно из литературных данных, расположение фибрилларина в клетках млекопитающих является исключительно специфическим (Мухарьямова и др., 1998; Левицкий и др., 2004; Почукалина, Парфенов, 2008). В ядрышках фибрилларин формирует крупные дискретные фокусы, а в метафазе митоза располагается на

поверхности хромосом. Метод иммуноцитохимического окрашивания клеток подтвердил, что у всех животных до начала эксперимента аутоантитела к фибрилларину отсутствовали (данные не показаны). В соответствии с общепринятой терминологией сыворотки, которые не обладают иммунореактивностью по отношению к клеткам в культуре, названы в настоящей работе неаутоиммунными.

Анализ сывороток мышей через 6—9 нед после начала инъекций HgCl₂ показал, что они характерным образом окрашивают ядрышки (рис. 1, а) и периферический слой хромосом в митозе (рис. 1, а'). На иммуноблотах суммарных лизатов клеток сыворотки выявляли одну мажорную полосу в районе 34—36 кДа, что соответствует электрофоретической подвижности фибрилларина (данные не показаны). В совокупности эти наблюдения хорошо соответствуют литературным данным о динамике аутоиммунного процесса под воздействием HgCl₂ у животных «чувствительных» линий (Hultman, Eneström, 1987, 1992; Hultman et al., 1993; Abedi-Valuggerdi et al., 1997; Kono et al., 2001; Красильщикова и др., 2006) и указывают на появление в сыворотке мышей аутоантител к фибрилларину в условиях наших экспериментов. При этом у животного, инъецированного HgCl₂ в течение 6 нед (мышь 1), конечный титр аутоантител к фибрилларину составил 1 : 2000, а у животных, получавших HgCl₂ в течение 9 нед (мыши 2 и 3), — 1 : 8000. Иммуноцитохимический анализ сывороток контрольных мышей SJL/J, инъецированных только физраствором, в те же сроки показал полное отсутствие аутоантител к фибрилларину (данные не показаны).

Общий морфологический анализ почечной ткани производили на образцах, полученных от контрольных и аутоиммунных мышей на 6-й и 9-й нед эксперимента после окрашивания в смеси гематоксилина Караччи с эозином. При использовании подобного метода окрашивания на срезах почек контрольных и подопытных животных отчетливо выявлялись почечные тельца, расположенные в корковом веществе, а также различные отделы нефронов. В тельцах удавалось идентифицировать эндотелиальные клетки, подоциты и мезангиальные клетки. Ни у контрольных, ни у подопытных животных не было выявлено изменений, связанных с воспалением, некрозом, инфильтрацией нейтрофилами, макрофагами и другими клетками крови; не изменялись также размеры почечных телец и плотность их расположения на срезах (рис. 2, а). Из незначительных отличий почек аутоиммунных мышей от почек контрольных мышей можно отметить небольшое расширение полостей под капсулами почечных телец, а также сужение просветов некоторых канальцев нефронов (рис. 2, б).

Имуногистохимический анализ иммунных отложений. Как указано в разделе «Материал и методика», криосрезы почек подопытных и контрольных животных непосредственно перед инкубацией с антителами фиксировали в абсолютном ацетоне или просто высушивали на воздухе. Иммуногистохимический анализ показал, что иммунные отложения в почечных тельцах являются антителами к иммуноглобулинам мыши при обоих вариантах обработки криосрезов. В обоих случаях отложения выявлялись в виде гранул, которые в местах наибольшего скопления сливались и выглядели как ярко флуоресцирующие пятна (рис. 3, б). Однако на фиксированных срезах лучше сохранялась общая морфология ткани. Кроме того, фиксированные срезы можно было хранить до 3 мес при -70 °С без заметной потери способ-

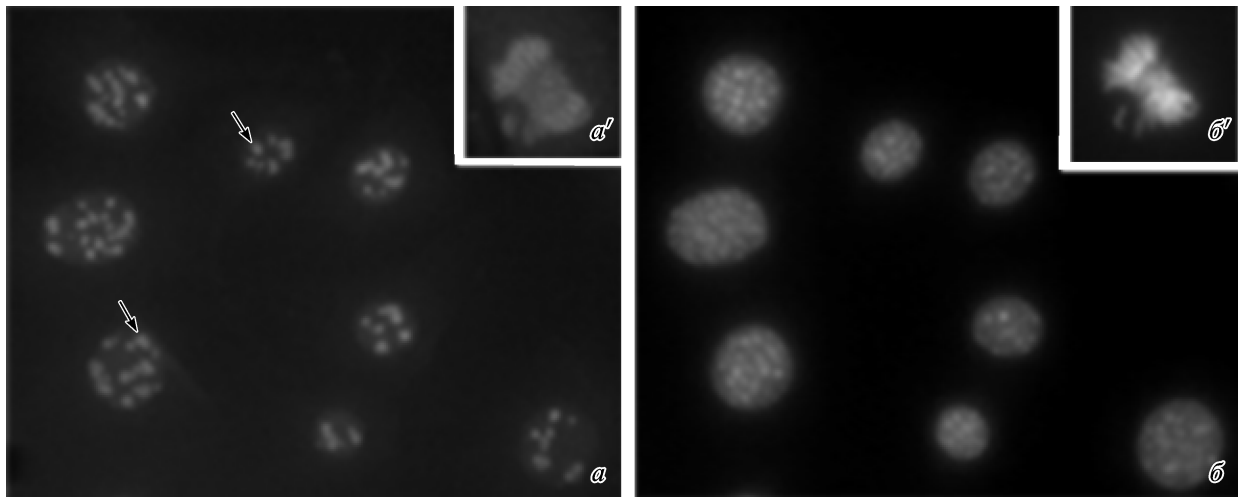


Рис. 1. Выявление белка ядрышка фибрилларина в клетках мышцы линии NIH/3T3 с помощью аутореактивных сывороток мышей, инъецированных HgCl_2 в течение 6—9 нед.

a, a' — иммуноцитохимическое окрашивание клеток в интерфазе (a) и метафазе (a'); b, b' — окрашивание интерфазных ядер (b) и метафазных хромосом (b') красителем DAPI. Масштабный отрезок — 10 мкм.

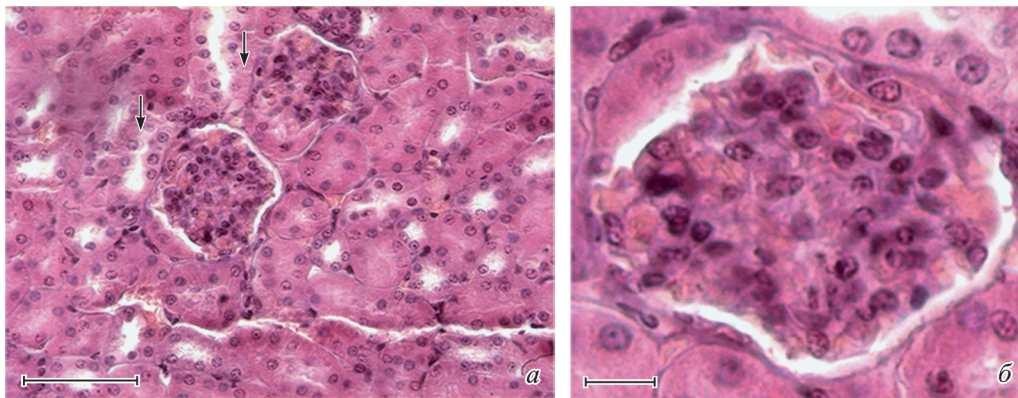


Рис. 2. Общий вид почечной ткани (a) и почечных телец (a , стрелки; b) аутоиммунных мышей на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Масштабные отрезки — 100 (a) и 30 (b) мкм.

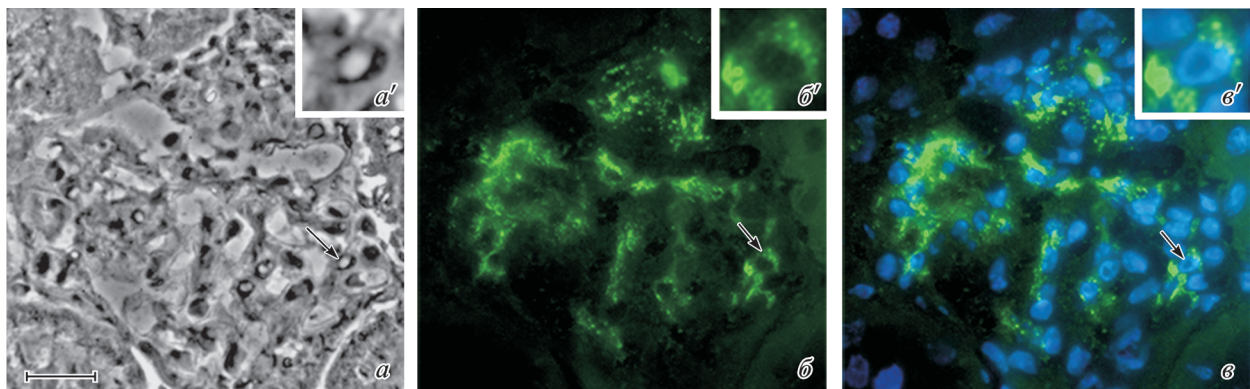


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление суммарных иммуноглобулинов в почечном тельце аутоиммунной мыши через 6 нед после начала инъекций HgCl_2 .

a, a' — фазовый контраст; b, b' — окрашивание на суммарные иммуноглобулины; c, c' — совмещение окраски на иммуноглобулины и ядерный хроматин, выявляемый с помощью красителя DAPI. Стрелки указывают на одну из клеток почечного тельца, в которой окраска на иммуноглобулины отчетливо видна вокруг ядра, при большем увеличении эта клетка показана на рис. 3 a' — c' . Масштабный отрезок — 30 мкм.

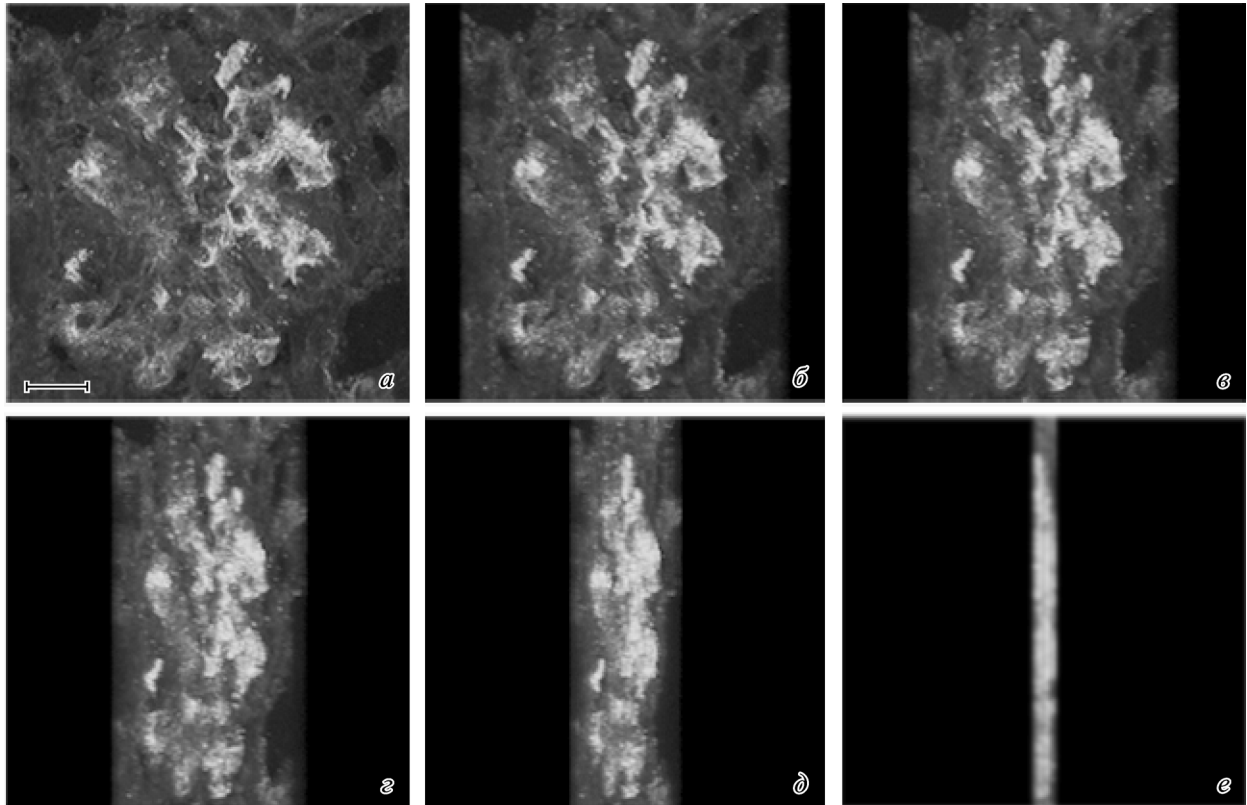


Рис. 4. Общий вид иммуноглобулинов в почечном тельце аутоиммунной мыши в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе.

a—d — область почечного тельца, реконструированная на основании серии оптических срезов (показана при вращении модели против часовой стрелки); *e* — вид реконструированной области сбоку (толщина области около 7 мкм). Масштабный отрезок — 20 мкм.

ности к окрашиванию. Поэтому в работе представлены результаты иммуногистохимического окрашивания криосрезов, фиксированных ацетоном.

Анализ срезов в конфокальном лазерном сканирующем микроскопе показал, что иммунные отложения проявляются как минимум на 10 последовательных оптических срезах с толщиной 0.7 мкм (рис. 4, *e*). При наблюдении в эпифлуоресцентном микроскопе иммунные отложения часто повторяли форму клеток и были отчетливо видны в плоскости ядер, выявляемых красителем DAPI или в режиме фазового контраста (рис. 3, *a, в*).

Депозиты обнаруживались также в стенках кровеносных сосудов почек, но только у аутоиммунных животных. Так же как и в почечных тельцах, отложения выявлялись в виде гранул, которые в местах наибольшего скопления сливались в пятна (рис. 5, *a, б*). Это наблюдение было подтверждено колокализацией иммунных отложений с коллагеновыми и эластиновыми волокнами — маркерами стенок кровеносных сосудов, которые мы выявляли с помощью красителя Col-F (Dobrucki et al., 2006). Совмещение локализаций иммунных отложений с коллагеном и эластином позволило сделать заключение о том, что депозиты присутствуют как в эндотелиальной зоне сосудов, так и между слоями волокон внутри стенок всех сосудов (рис. 6, *в*). Использование красителя Col-F позволило также заключить, что отложения присутствуют в стенках всех ренальных сосудов вне зависимости от их размера. Окрашивание препаратов флуорохромным красителем TMRE не выявляло иммунных отложений ни в почках, ни в стенках кровеносных сосудов (данные не по-

казаны), что говорит о специфичности наблюдаемых отложений.

Для того чтобы выяснить, коррелируют ли размеры иммунных отложений с титром аутоантител к фибрилларину, срезы окрашивали конъюгатами антител к суммарным иммуноглобулинам, взятыми в разных разведениях. Полученные результаты показали, что у мышей с высоким конечным титром аутоантител к фибрилларину — 1 : 8000 (мышь 2 и 3) — иммунные отложения в почках выявлялись при разведениях антител к суммарным иммуноглобулинам вплоть до 1 : 32 000 (рис. 5, *a*). У животного, в сыворотке которого аутоантитела к фибрилларину присутствовали в более низком титре — 1 : 2000 (мышь 1), отложения переставали выявляться при разведении конъюгатов 1 : 8000 (рис. 5, *б*). Аналогичная закономерность обнаруживалась также при анализе отложений в стенках кровеносных сосудов. Таким образом, увеличение концентрации аутоантител к фибрилларину в сыворотке крови аутоиммунных животных сопровождалось увеличением размеров иммунных отложений в ренальных клубочках и стенках кровеносных сосудов. В почечных тельцах контрольных животных иммунные отложения присутствовали, но были выражены значительно слабее, чем у аутоиммунных мышей (данные не показаны). Так, в почках контрольных мышей иммунные отложения переставали выявляться при разведении конъюгатов 1 : 1600. У контрольных — неаутоиммунных — мышей отложения в стенках кровеносных сосудов не выявлялись ни при каких условиях фиксации или окраски криосрезов.

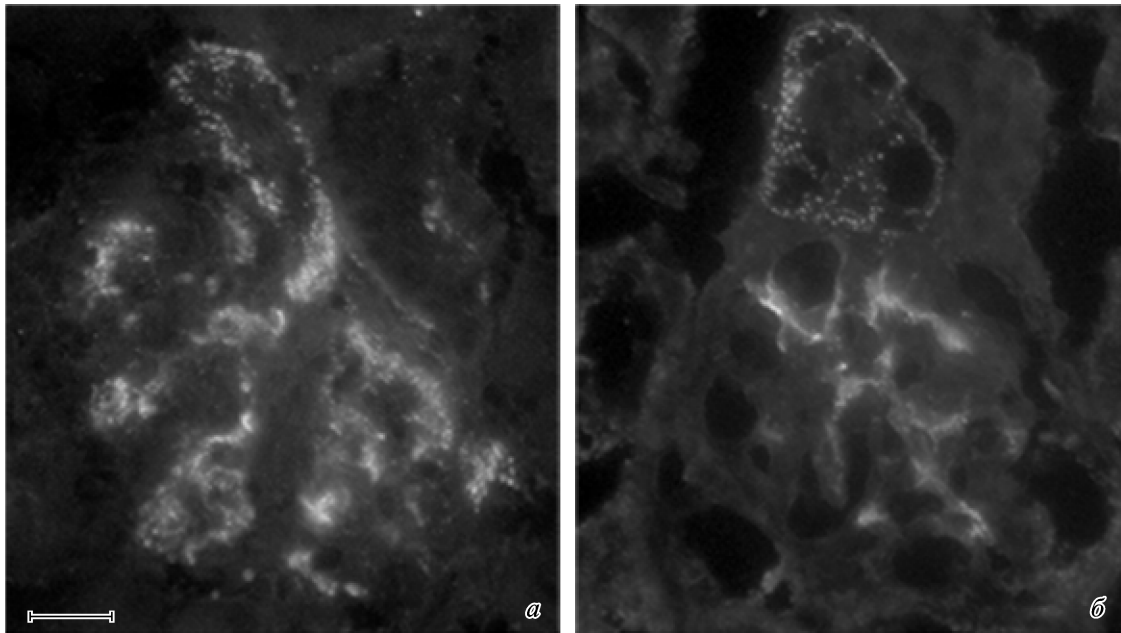


Рис. 5. Выраженность иммунных отложений в почечных тельцах аутоиммунных мышей коррелирует с титром аутоантител к фибрилларину.

a — характер окраски на суммарные иммуноглобулины почечного тельца мыши с титром аутоантител к фибрилларину 1 : 8000; *б* — характер окраски на суммарные иммуноглобулины почечного тельца мыши с титром аутоантител к фибрилларину 1 : 2000. Масштабный отрезок — 30 мкм.

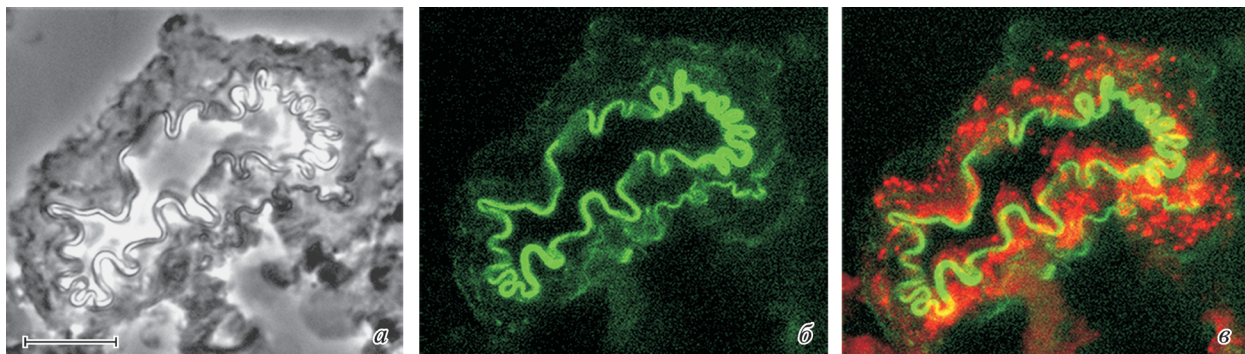


Рис. 6. Выявление иммуноглобулинов в стенках сосудов почек аутоиммунных мышей с применением специфического красителя на коллагеновые и эластиновые волокна Col-F.

a — фазовый контраст; *б* — окрашивание стенки сосуда красителем Col-F; *в* — окрашивание антителами к суммарным иммуноглобулинам (красный цвет) и красителем Col-F (зеленый цвет). Масштабный отрезок — 30 мкм.

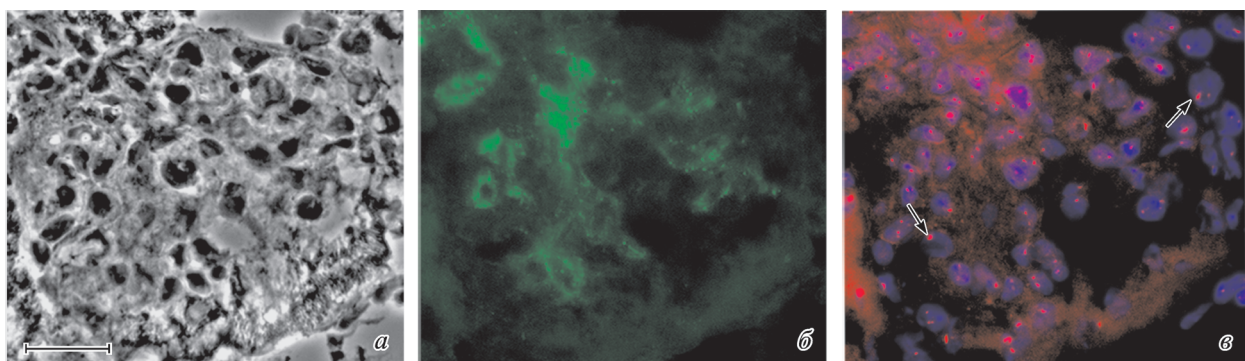


Рис. 7. Окрашивание почечных телец аутоиммунной мыши на суммарные иммуноглобулины (*б*) и фибрилларин (*в*) через 6—9 нед после начала инъекций $HgCl_2$.

a — фазовый контраст, *б* — окраска на суммарные иммуноглобулины, *в* — окрашивание антителами к фибрилларину (красный цвет) и флуоресцентным красителем DAPI (синий цвет). Фибрилларин отчетливо выявляется в ядрышках клеток почечного тельца (стрелки), но отсутствует в местах иммунных отложений. Масштабный отрезок — 30 мкм.

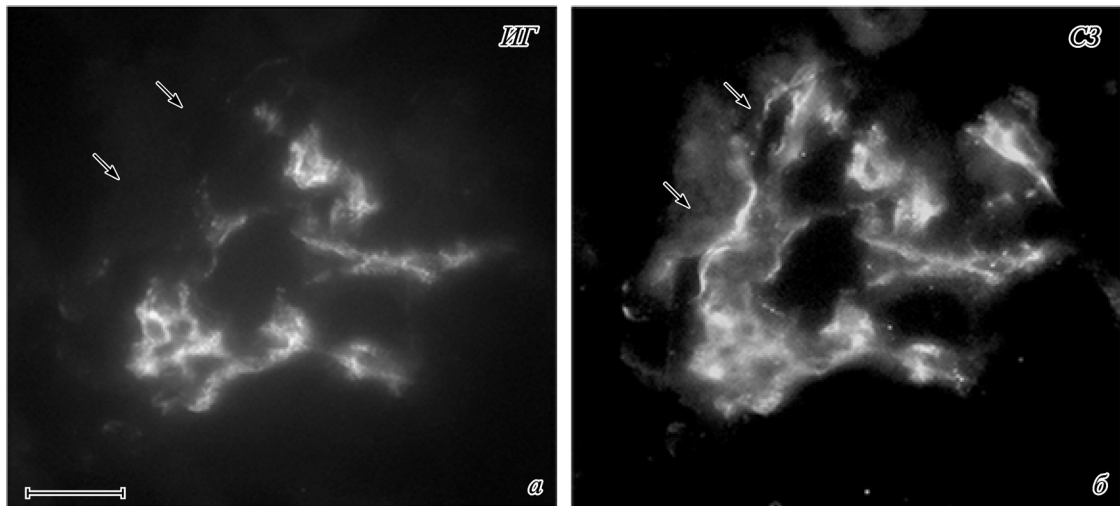


Рис. 8. Окрашивание почечных телец аутоиммунной мыши на суммарные иммуноглобулины (ИГ; а) и С3-компонент комплемента (С3; б) через 6—9 нед после начала инъекций $HgCl_2$.

Стрелки указывают на места, содержащие С3-компонент, но не содержащие иммунных отложений. Масштабный отрезок — 30 мкм.

Для того чтобы выяснить, входят ли в состав иммунных отложений такие компоненты иммунных комплексов, как фибрилларин и комплемент, мы окрашивали криосрезы антителами к иммуноглобулинам мыши и сывороткой аутоиммунного больного к фибрилларину или антителами к иммуноглобулинам и С3-компоненту комплемента мыши. Как известно, С3-компонент — это протеин, который играет ключевую роль в развитии иммунного процесса, запуская каскад реакций, приводящий к лизису чужеродных антигенов. Как видно на рис. 7, при двойном окрашивании срезов на фибрилларин и иммуноглобулины фибрилларин отчетливо выявлялся в ядрышках клеток почечных телец и канальцев, но не в зоне иммунных отложений. Напротив, локализация С3-компонента комплемента в значительной мере совпадала с локализацией иммуноглобулинов, однако ни в одном из проанализированных почечных телец совпадение

двух сигналов не было полным, как это показано на рис. 8. В некоторых районах почечных телец С3-компонент присутствовал, но иммуноглобулины не выявлялись. Во всех клубочках локализация иммуноглобулинов полностью совпадала с локализацией С3-компонента (рис. 8).

Анализ возможной цитотоксичности иммунных отложений методом TUNEL. Для анализа возможной цитотоксичности иммунных отложений в почечных тельцах мы использовали метод TUNEL, позволяющий выявлять фрагментацию ДНК, которая является признаком гибели клеток *in situ*. Реакции проводили на криосрезах почек как подопытных, так и контрольных животных. Полученные результаты показали, что в почечных тельцах как подопытных, так и контрольных мышей TUNEL-положительные, т. е. гибнущие, клетки не выявляются (рис. 9).

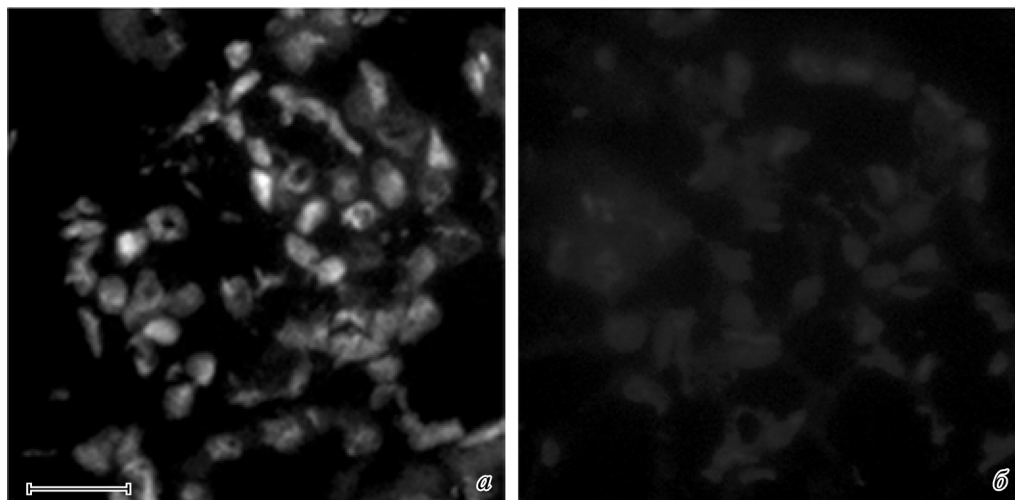


Рис. 9. Анализ возможной цитотоксичности иммунных отложений в почечном тельце аутоиммунной мыши методом TUNEL через 6—9 нед после начала инъекций $HgCl_2$.

а — срез обработан 1 мкг/мл ДНКазы I 60 мин при 37 °С, отчетливо видны TUNEL-положительные ядра (положительный контроль); б — отсутствие явных признаков расщепления ДНК и гибнущих клеток на срезе почечного тельца, не обработанном ДНКазой I. Масштабный отрезок — 30 мкм.

Обсуждение

В работе мы использовали два подхода — гистохимический анализ парафиновых срезов, приготовленных стандартным способом, и иммуногистохимический анализ криосрезов с помощью различных антител для изучения иммунных отложений в почках мышей линии SJL/J, развивающих аутоиммунный процесс под действием регулярных инъекций HgCl₂. Как известно из литературных источников (Takeuchi et al., 1995; Hultman, Hansson-Georgiadis, 1999; Roether et al., 2002; Hansson, Abedi-Valugerdi, 2003; Rowley, Monestier, 2005) и подтверждено нашими предыдущими наблюдениями (Красильщикова и др., 2006), в этих условиях у мышей начинают вырабатываться аутоантитела преимущественно к одному антигену — белку ядрышка фибрилларину. Причины, приводящие к индукции этого процесса, остаются неизвестными, но установлено, что у таких животных воспроизводятся основные признаки аутоиммунных болезней человека, включая образование аутоантител к ядерным антигенам, поликлональную активацию В- и Т-лимфоцитов, увеличение содержания сывороточных иммуноглобулинов типов IgG и IgE, а также образование иммунных отложений в почках (Abedi-Valugerdi, 2009).

Иммунные отложения в почках аутоиммунных животных неоднократно упоминались в литературе (Hultman, Eneström, 1987, 1992; Hultman et al., 1993; Abedi-Valugerdi et al., 1997; Bigazzi, 1999; Kono et al., 2001; Navarinassab et al., 2009). Однако до сих пор спорным остается вопрос о том, где — на поверхности или внутри клеток — они располагаются. Неясно также, какие типы клеток, образующих почечное тельце, — эндотелиальные, мезангиальные или подоциты — обладают способностью связывать или накапливать иммунные отложения. Согласно данным некоторых авторов, отложения располагаются внутри мезангиальных клеток (Hultman et al., 1993). Другие авторы подвергают сомнению возможность проникновения аутоантител, являющихся крупными белковыми комплексами, внутрь живых клеток, однако известны данные, свидетельствующие о такой возможности (Ruiz-Argüelles, Alarcón-Segóvia, 2001). Результаты, полученные нами путем совмещения локализации иммунных отложений с ядрами, свидетельствуют в пользу того, что по крайней мере часть отложений находится внутри клеток (рис. 3). Наиболее отчетливо иммунные отложения выявлялись вокруг крупных округлых ядер, соответствующих ядрам мезангиальных клеток и подоцитов. Нам не удалось получить убедительные доказательства присутствия отложений вокруг ядер вытянутой формы, соответствующих ядрам эндотелиальных клеток клубочков.

Развитие аутоиммунного процесса сопровождается появлением иммунных отложений и в стенках кровеносных сосудов почки — факт, известный из литературы (Hultman et al., 1993). В дополнение к этим данным наши наблюдения, основанные на специфическом окрашивании коллагеновых и эластиновых волокон, входящих в стенки кровеносных сосудов, красителем Col-F, позволило локализовать иммунные отложения как в эндотелиальной зоне, так и по всей толще стенок сосудов. Кроме того, выявление волокон с помощью Col-F позволило четко выявить мелкие сосуды, которые практически не идентифицируются в режиме фазового контраста, поскольку в процессе замораживания и резки органа их просветы резко сужаются. Поскольку иммунные отложения выявлялись в стенках всех кровеносных сосудов, которые были проана-

лизированы (около 100), мы сделали вывод о том, что отложения формируются в стенках сосудов почки как артериального, так и венозного русла вне зависимости от размеров.

Было бы логичным предположить, что скопление избыточных (по сравнению с контролем) иммунных отложений может иметь неблагоприятные последствия для клеток. Однако наши наблюдения не подтверждают данное предположение, по крайней мере при анализе органов животных в начале развития индуцированного аутоиммунного процесса (6—9 нед после начала инъекций HgCl₂). Массовую гибель клеток отрицает отсутствие воспалительного процесса в почках при их анализе методами стандартной гистохимии (рис. 2). На парафиновых срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, нам не удалось обнаружить выраженное скопление макрофагов или лейкоцитов. Об отсутствии цитотоксичности отложений иммуноглобулинов свидетельствует также применение метода TUNEL, который не выявил ядер с фрагментацией ДНК, т. е. ядер гибнущих клеток (рис. 9, б). Тем не менее мы не можем исключить возможность того, что деструктивные изменения могут проявляться на более поздних стадиях развития аутоиммунного процесса. Хорошо известно, что почечная недостаточность является одним из негативных и сопутствующих проявлений аутоиммунного заболевания у человека (Tormey et al., 2001). Можно предположить, что развитию этой недостаточности способствует также появление отложений иммунных комплексов в стенках кровеносных сосудов, которые отсутствуют в стенках сосудов неаутоиммунных животных.

Выраженность иммунных отложений в клубочках и стенках сосудов прямо коррелировала с концентрацией аутоантител к фибрилларину, присутствующих в сыворотке крови животных: чем выше был титр аутоантител к фибрилларину, тем более высокими разведениями конъюгатов выявлялись отложения. Тем не менее нам не удалось обнаружить фибрилларин в составе отложений при окрашивании срезов антителами к фибрилларину на иммуногистохимическом уровне, что может указывать на отсутствие белка в составе иммунных отложений, по крайней мере на ранних стадиях развития аутоиммунного процесса. Однако мы не можем исключить возможность того, что эпитопы, узнаваемые сывороткой к фибрилларину, входящему в состав отложений, блокированы или изменены по сравнению с фибрилларинном ядрышек и потому недоступны для связывания антителами. Аутоантигены в составе иммунных отложений были описаны как при индуцированном аутоиммунном процессе у лабораторных животных (Sapin et al., 1982), так и при некоторых аутоиммунных заболеваниях человека (Fournié, Druet, 1996). Согласно литературным данным, в качестве аутоантигенов чаще всего в составе иммунных комплексов обнаруживают некоторые компоненты гломерулярной базальной мембраны, гистоновые белки и некоторые другие белки, но никогда — фибрилларин.

При совмещении окрашиваний иммунных отложений с основным компонентом комплемента — С3 — в подавляющем большинстве почечных телец, которые мы проанализировали, выявлялись участки, содержащие комплемент, но лишенные иммуноглобулинов (рис. 8). Принимая во внимание характер окрашивания почечных телец антителами на суммарные иммуноглобулины (IgA, IgM и IgG), фибрилларин и С3-компонент комплемента, можно высказать предположение о том, что формирование иммунных комплексов в почечных тельцах начина-

ся с отложений комплемента, которые затем связывают иммуноглобулины и, наконец, аутоантиген. В результате формируются иммунные комплексы.

Согласно результатам нашей работы, иммунные отложения присутствовали в почках не только аутоиммунных, но и контрольных животных. Это наблюдение не является удивительным, поскольку из литературы известно, что аутоантитела (например, к ДНК и гистонам) присутствуют в небольших количествах у практически здоровых индивидуумов (Галактионов, 2004). Об этом, в частности, говорит тот факт, что сыворотки здоровых людей способны окрашивать клетки разного происхождения (как правило, для этих целей используют клетки человека Hep-2) в реакции непрямой иммунофлуоресценции (Koelsch et al., 2007). Однако концентрация (титр) таких антител оказывается на порядок ниже, чем у аутоиммунных больных.

Основные результаты работы позволяют сделать заключение о том, что индукция аутоиммунного процесса с помощью $HgCl_2$ у мышей генетически «чувствительной» линии SJL/J способствует формированию крупных иммунных отложений в почечных тельцах и индуцирует процесс их формирования в ренальных кровеносных сосудах. Эти отложения присутствуют внутри клеток, но не вызывают заметных цитотоксичных эффектов, по крайней мере на начальных стадиях формирования и течения аутоиммунного процесса. Можно высказать предположение о том, что формирование иммунных комплексов в почечных тельцах начинается с отложений компонентов комплемента, которые затем связывают иммуноглобулины и основные аутоантигены.

Авторы выражают благодарность д. б. н. К. А. Лукьянову (ИБХ РАН) и к. б. н. Е. В. Шевалю (НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ) за помощь в получении некоторых изображений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00854).

Список литературы

Галактионов В. Г. 2004. Иммунология. М.: Академия. 528 с.

Красильщикова М. С., Аблаева Ю. В., Сперанский А. И., Зацепина О. В. 2006. Индукция аутоиммунно-подобного процесса с помощью регулярных инъекций хлорида ртути мышам линии SJL. Докл. РАН. 409 (1) : 129—132.

Левитский С. А., Мухарьямова К. Ш., Вейко В. П., Зацепина О. В. 2004. Выявление сигнальных последовательностей в молекуле фибрилларина, определяющих его специфическую локализацию в ядрышках клеток HeLa. Молекуляр. биол. 38 (3) : 1—10.

Мухарьямова К. Ш., Дудник О. А., Сперанский А. И., Зацепина О. В. 1998. Сравнительная локализация основных белков ядрышка фибрилларина и В23 в делящихся клетках млекопитающих. Биол. мембраны. 15 (6) : 657—669.

Почукалина Г. Н., Парфенов В. Н. 2008. Трансформация ядрышек ооцитов антральных фолликулов мыши. Выявление коилина и компонентов комплекса РНК-полимеразы I. Цитология. 50 (8) : 671—680.

Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. М.: Изд-во инстр. лит. 718 с.

Abedi-Valugerdi M. 2009. Mercury and silver induce B cell activation and anti-nucleolar autoantibody production in outbred mouse stocks: are environmental factors more important than the sus-

ceptibility genes in connection with autoimmunity? Clin. Exp. Immunol. 155 : 117—124.

Abedi-Valugerdi M., Hu H., Moller G. 1997. Mercury-induced renal immune complex deposits in young (NZB×NZW) F1 mice: characterization of antibodies/autoantibodies. Clin. Exp. Immunol. 110 : 86—91.

Bigazzi P. E. 1999. Metals and kidney autoimmunity. Environ. Health Perspect. 107 : 753—765.

Da Costa G. M., dos Anjos L. M., Souza G. S., Gomes B. D., Saito C. A., Pinheiro Mda C., Ventura D. F., da Silva F. M., Silveira L. C. 2008. Mercury toxicity in Amazon gold miners: visual dysfunction assessed by retinal and cortical electrophysiology. Environ. Res. 107 : 98—107.

Dobrucki J. W., Galas G., Wlodarski T., Lee B., Johnson G., Darzynkiewicz Z. 2006. Imaging of collagen in live tissues, using a new fluorescent probe PhF. International Symposium «Optical Analysis of Biomolecular Machines». Berlin: Max Delbruck Center for Molecular Medicine. 134 p.

Fournié G. J., Druet P. 1996. Towards understanding the pathogenesis of SLE. Nephrol. Dial. Transplant. 11 : 10—12.

Hansson M., Abedi-Valugerdi M. 2003. Xenobiotic metal-induced autoimmunity: mercury and silver differentially induce anti-nucleolar autoantibody production in susceptible H-2s, H-2q, H-2f mice. Clin. Exp. Immunol. 131 : 405—414.

Havarinasab S., Pollard K. M., Hultman P. 2009. Gold- and silver-induced murine autoimmunity — requirement for cytokines and CD28 in murine heavy metal-induced autoimmunity. Clin. Exp. Immunol. 155 : 567—576.

Helmick C. G., Felson D. T., Lawrence R. C., Gabriel S., Hirsch R., Kwoh C. K., Liang M. H., Kremers H. M., Mayes M. D., Merkel P. A., Pillemer S. R., Reveille J. D., Stone J. H.; National Arthritis Data Workgroup. 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Pt I. Arthritis Rheum. 58 : 15—25.

Hultman P., Bell L. J., Eneström S., Pollard K. M. 1993. Murine susceptibility to mercury. II. Autoantibody profiles and renal immune deposits in hybrid, backcross, and H—2d congenic mice. Clin. Immunol. Immunopathol. 68 : 9—20.

Hultman P., Eneström S. 1987. The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride: strain dependent susceptibility. Clin. Exp. Immunol. 67 : 283—292.

Hultman P., Eneström S. 1992. Dose-response studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease. Toxicol. Appl. Pharmacol. 113 : 199—208.

Hultman P., Hansson-Georgiadis H. 1999. Methyl mercury-induced autoimmunity in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154 : 203—211.

Jacobson D. L., Gange S. J., Rose N. R., Graham N. M. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. Clin. Immunol. Immunopathol. 84 : 223—243.

Koelsch K., Zheng N. Y., Zhang Q., Duty A., Helms C., Mathias M. D., Jared M., Smith K., Capra J. D., Wilson P. C. 2007. Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. J. Clin. Invest. 117 : 1558—1565.

Kono D. H., Park M. S., Szydlík A., Haraldsson K. M., Kuan J. D., Pearson D. L., Hultman P., Pollard K. M. 2001. Resistance to xenobiotic-induced autoimmunity maps to chromosome 1. J. Immunol. 167 : 2396—2403.

Markowitz G. S., D'Agati V. D. 2009. Classification of lupus nephritis. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 18 : 220—225.

Martinson K., Hultman P. 2006. The role of Fc-receptors in murine mercury-induced systemic autoimmunity. Clin. Exp. Immunol. 144 : 309—318.

Reichow S. L., Hamma T., Ferré-D'Amaré A. R., Varani G. 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. Nucl. Acids Res. 35 : 1452—1464.

Rhodes B., Vyse T. J. 2007. General aspects of the genetics of SLE. Autoimmunity. 40 : 550—559.

Roether S., Rabbani H., Mellstedt H., Abedi-Valugerdi M. 2002. Spontaneous downregulation of antibody/autoantibody syn-

thesis in susceptible mice upon chronic exposure to mercuric chloride is not owing to a general immunosuppression. *Scand. J. Immunol.* 55 : 493—502.

Rowley B., Monestier M. 2005. Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity. *Mol. Immunol.* 42 : 833—838.

Ruiz-Argüelles A., Alarcón-Segóvia D. 2001. Penetration of autoantibodies into living cells, 2000. *Isr. Med. Assoc. J.* 3 : 121—126.

Sapin C., Mandet C., Druet E., Gunther E., Druet P. 1982. Immune complex type disease induced by HgCl₂ in Brown-Norway rats: genetic control of susceptibility. *Clin. Exp. Immunol.* 48 : 700—704.

Silbergeld E. K., Silva I. A., Nyland J. F. 2005. Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 : 282—292.

Silva I. A., Nyland J. F., Gorman A., Perisse A., Ventura A. M., Santos E. K., Souza J. M., Burek C. L., Rose N. R., Silbergeld E. K. 2004. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinuc-

leolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. *Environ. Health.* 3 : 11.

Takeuchi K., Turley S. J., Tan E. M., Pollard K. M. 1995. Analysis of the autoantibody response to fibrillar in human disease and murine models of autoimmunity. *J. Immunol.* 154 : 961—971.

Tormey V. J., Bunn C. C., Denton C. P., Black C. M. 2001. Anti-fibrillar antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology.* 40 : 1157—1162.

Van Eenennaam H., Vogelzangs J. H., Bisschops L., Te Boome L. C., Seeling H. P., Renz M., De Rooij D. J., Brouwer R., Pluk H., Pruijn G. J., Van Venrooij W. J., Van Den Hoogen F. H. 2002. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clin. Exp. Immunol.* 130 : 532—540.

Поступила 23 XI 2009

LOCALIZATION AND COMPOSITION OF RENAL IMMUNODEPOSITS IN MICE DEVELOPING HgCl₂-INDUCED AUTOIMMUNE PROCESS

A. S. Arefieva,¹ * P. A. Dyban,² M. S. Krasilshchikova,¹ J. W. Dobrucki,³ O. V. Zatsepina¹, **

¹ M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia,

² Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, Russia,

and ³ Jagiellonian University, Krakow, Poland;

* e-mail: quality4@rambler.ru, ** zatsepina_olga@mail.ru

A characteristic feature of systemic autoimmune diseases along with appearance of autoantibodies targeting self-antigenes is deposition of immunoglobulins and components of the complement system in kidneys. However, mechanisms of the deposit formation and their cytotoxic effects still remain poorly studied. To elucidate these questions, we used SJL/J mice which are known to develop autoimmune process accompanied by the appearance of anti-fibrillar antibodies following regular administrations of sublethal doses of HgCl₂. Using antibodies to the total murine immunoglobulins we showed that immunodeposits were present in glomeruli of autoimmune and control (not-autoimmune) animals, but their intensity was directly correlated with the titer of anti-fibrillar autoantibodies and was minimal in control mice. By confocal microscopy and conventional fluorescence microscopy it was defined that immunodeposits deeply penetrate glomeruli and are the most likely located within mesangial cells. In autoimmune animals, immunoglobulins completely colocalized with the C3 — component of complement, but not with the major autoantigen — the protein fibrillar. We failed to determine the signs of cell proliferation or death in glomeruli. The most prominent difference between control and autoimmune mice was the presence of immunodeposits in renal blood vessels. These observations argue in favor of the idea that destructive and dysfunctional renal lesions accompanying development of autoimmune diseases can be caused, in part, by accumulation of immunodeposits in blood vessels.

Key words: autoimmune pathologies, immunodeposits, kidney, SJL/J mice strain, HgCl₂.