

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕПТИДА РЕГИОНА *ENVELOPE* ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА *HERV-E λ 4-1*

Смагин А.А.¹, Гольдина И.А.², Гайдуль К.В.², Любарский М.С.¹

¹ Клиника ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. С целью выявления иммуномодулирующих свойств синтетического олигопептида, гомологичного аминокислотной последовательности высококонсервативного региона протеина *envelope* эндогенного ретровируса человека *HERV-E λ 4-1* было проведено сравнительное исследование пролиферативной активности моноклеарных клеток крови здоровых лиц и больных рассеянным склерозом при воздействии данного олигопептида в культуре. Установлено, что исследуемый олигопептид стимулирует спонтанную и индуцированную митогенами пролиферацию моноклеарных клеток крови как у доноров, так и у больных рассеянным склерозом. Выраженность стимулирующего воздействия олигопептида зависит от его концентрации в культуре и исходного уровня спонтанной пролиферации иммунокомпетентных клеток крови. Следовательно, олигопептид региона *envelope* эндогенного ретровируса *HERV-E λ 4-1* повышает функциональную активность иммунокомпетентных клеток крови, что свидетельствует о наличии у него иммуностимулирующих свойств. Митогенная активность олигопептида региона *envelope* эндогенного ретровируса человека *HERV-E λ 4-1* в отношении иммунокомпетентных клеток крови больных рассеянным склерозом, возможно, является одним из механизмов участия данного ретровируса в патогенезе заболевания.

Ключевые слова: эндогенные ретровирусы, олигопептид, моноклеарные клетки крови, митогенный эффект, рассеянный склероз

Адрес для переписки:

Гольдина Ирина Александровна
научный сотрудник лаборатории
регуляции иммунопоэза ФГБУ «Научно-
исследовательский институт
клинической иммунологии» СО РАМН
630099, Россия, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14.
Тел: 8 (383) 222-06-72.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: igoldina@mail.ru

Авторы:

Смагин А.А. — д.м.н., профессор, руководитель
лаборатории лимфодетоксикации, клиника ФГБУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии» СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

Гольдина И.А. — научный сотрудник лаборатории
регуляции иммунопоэза ФГБУ «Научно-исследовательский
институт клинической иммунологии» СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

Гайдуль К.В. — д.м.н., профессор, руководитель
лаборатории регуляции иммунопоэза ФГБУ «Научно-
исследовательский институт клинической иммунологии»
СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Любарский М.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАМН,
заместитель директора по научно-клинической работе,
клиника ФГБУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН,
г. Новосибирск, Россия

Поступила 14.08.2013

Принята к печати 09.10.2013

IN VITRO INDUCTION OF BLOOD MONONUCLEAR CELL PROLIFERATION BY ENDOGENOUS RETROVIRAL *HERV-E λ 4-1* ENVELOPE PEPTIDE IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Smagin A.A.^a, Goldina I.A.^b, Gaidul K.V.^b, Lubarsky M.S.^a

^a *Clinical Department, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. A comparative *in vitro* study of blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients and healthy donors was performed, in order to evaluate proliferative response to a retroviral antigen, aiming to determine immunomodulatory properties of synthetic oligopeptide homologous to a highly conserved human endogenous retrovirus *HERV-E λ 4-1* envelope protein. It was revealed that this oligopeptide is able to stimulate the *in vitro* spontaneous and mitogen-induced proliferation of blood mononuclear cells from either donor and multiple sclerosis patients. Intensity of this oligopeptide-induced stimulatory effect depends on the protein concentration, and on initial level of blood immunocompetent cells proliferation. Hence, the endogenous retrovirus *HERV-E λ 4-1* envelope region protein is able to increase functional activity of immunocompetent cells from human blood, that suggesting its immunostimulatory properties. It is possible that the mitogenic effects of this protein upon immunocompetent cells of multiple sclerosis patients represent a potential mechanism of retroviral involvement into pathogenesis of the disorder. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 3, pp 247-256)

Keywords: *endogenous retroviruses, oligopeptide, blood mononuclears, mitogenic effect, multiple sclerosis*

Address for correspondence:

Goldina Irina A.
Research Associate, Laboratory of Immunopoiesis
Regulation, Research Institute of Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrincevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-06-72.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: igoldina@mail.ru

Authors:

Smagin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor,
Chief, Laboratory of Lymph Detoxication, Clinical
Department, Research Institute of Clinical and
Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian
Federation

Goldina I.A., Research Associate, Laboratory of
Immunopoiesis Regulation, Research Institute of
Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation
Gaidul K.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief,
Laboratory of Immunopoiesis Regulation, Research
Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian
Federation

Lubarsky M.S., PhD, MD (Medicine), Professor,
Corresponding Member, Russian Academy of Medical
Sciences, Deputy Director for Research and Clinics,
Clinical Department, Research Institute of Clinical
and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian
Federation

Received 14.08.2013
Accepted 09.10.2013

Введение

Ретровирусы представляют собой многочисленное семейство вирусов человека, животных и растений, вызывающих широкий диапазон различных заболеваний [30]. В геноме человека ретровирусы представлены двумя различными формами: постоянно присутствующими генетическими элементами хромосомной ДНК – эндогенными ретровирусами (ЭР), а также инфекционными горизонтально наследуемыми РНК – содержащими экзогенными ретровирусами, которые передаются от человека к человеку. ЭР являются разновидностью мобильных элементов генома и представляют собой интегрированную в виде провируса форму экзогенных ретровирусов [8, 17, 29]. Некоторые из них репликационно-компетентны, способны формировать структуру вириона, покидать клетку и инфицировать другие клетки [22]. Предполагается, что ЭР выполняют важные функции в физиологических процессах, хотя их роль при патологических состояниях остается дискуссионной [16, 19]. Некоторые из ЭР ассоциированы с онкологическими, аутоиммунными, нейродегенеративными заболеваниями человека [9, 23, 25].

Известно, что при рассеянном склерозе (РС), хроническом аутоиммунном заболевании центральной нервной системы, в основе которого лежит иммуноопосредованная деструкция миелина с последующей мультифокальной демиелинизацией нервных волокон и моторными, сенсорными и когнитивными нарушениями, у больных происходит повышение экспрессии некоторых ЭР в головном мозге и мононуклеарных клетках крови [12, 14, 27].

Согласно данным литературы [20, 24], а также полученным нами ранее данным, ЭР человека I класса *HERV-E λ 4-1* ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний – системной красной волчанкой, рассеянным склерозом, ревматоидным артритом, причем частота и уровень его экспрессии в мононуклеарных клетках крови (МНК) больных коррелирует с активностью заболевания [3, 4, 27].

Данный ЭР репликационно компетентен, способен к продукции белков, его аминокислотная последовательность (8,8 кб) содержит открытые рамки считывания в регионах *gag* и *env*. Антитела к *HERV-E λ 4-1* в сыворотке крови здоровых индивидуумов не обнаруживаются [20, 31]. Влияние различных факторов внешней среды, в частности суперинфекции, изменения в эпигенетическом статусе генома, вызывают экспрессию ЭР и, в ряде случаев, синтез вирусных белков, ряд

из которых обладает иммуотропными свойствами [10, 28].

Целью настоящей работы было выявление иммуномодулирующих свойств синтетического олигопептида, гомологичного аминокислотной последовательности высококонсервативного региона протеина *envelope* эндогенного ретровируса человека *HERV-E λ 4-1* (СКС λ 4-1) у больных рассеянным склерозом.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние СКС λ 4-1 на спонтанную и митоген-индуцированную пролиферацию МНК доноров и больных РС.

2. Определить наличие зависимости уровня пролиферации МНК от концентрации СКС λ 4-1 в культуре.

Материалы и методы

Доноры и больные РС

В исследование были включены 16 больных РС из числа пациентов клиники ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАМН, с установленным диагнозом РС, непрерывно прогрессирующим течением заболевания, 3 степени тяжести, с длительностью заболевания от 3 до 18 лет. Периферическая венозная кровь 14 условно здоровых лиц из числа штатных доноров была предоставлена Новосибирским центром крови. Доноры крови и больные РС были однородны по показателям пола и возраста.

Эксперименты проводили с соблюдением «Этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием человека», в соответствии с приказом Минздрава РФ № 266 (Правила клинической практики в Российской Федерации) от 19.06.2003 г.

Тестируемые олигопептиды

17 – аминокислотный олигопептид СКС λ 4-1 (YQNRLLALDYLLAAEGGV) [18], соответствующий высококонсервативному региону трансмембранного ретровирусного протеина ЭР человека *HERV-E λ 4-1*; 17 – аминокислотный контрольный олигопептид с обратной последовательностью аминокислот.

Среда для культивирования МНК

RPMI-1640 (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область), содержащая 5% сыворотки крови человека АВ (IV) (Новосибирский центр крови), 10 мМ Hepes (ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio), 4×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол (L.Oba Feinchemie, Fischamene), 2 Мм L-глутамин (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область), 40 мкг/мл гентамицина (ФГУП НПО «Вирион»).

Выделение и культивирование МНК

Венозную кровь с добавлением гепарина (20 ед/мл) центрифугировали на градиенте плотности фиколла 1,078 г/см³ (Lymphocyte separation medium, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Germany) при 1500 оборотов/мин в течение 40 мин. Клетки, собранные из интерфазы и представленные преимущественно лимфоцитами, отмывали и осаждали центрифугированием. МНК культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в концентрации 1×10^6 /мл при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% влажности в течение 72 часов.

Оценка пролиферативной активности МНК

Для индукции поликлональной активации клеток использовали Т- и В-клеточные митогены в субоптимальных концентрациях, которые составили для ConA (Sigma) 2 мкг/мл, PWM (Sigma) 10 мкг/мл. Растворы исследуемых олигопептидов вносили в культуру клеток в конечных концентрациях 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, в зависимости от условий эксперимента. Пролиферативную активность МНК определяли стандартным методом по включению радиоактивной метки. Количественные показатели пролиферации представляли в абсолютных и относительных величинах, в виде индексов влияния (ИВ), рассчитанных как частное от деления показателя индуцированной пролиферации на показатель спонтанной пролиферации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов описательной статистики, сравнительного анализа, при помощи непараметрического Н-критерия Крускала–Уоллиса для множественных независимых групп, U-критерия Манна–Уитни для двух независимых групп, а также корреляционного анализа, при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Rs), с использованием коммерческого пакета программ “Statistica 7.0” (StatSoft, USA). Результаты представляли в виде медианы и интервала между 1 и 3 квартилями (Me (25%; 75%). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование пролиферативной активности МНК доноров и больных РС

При изучении спонтанной и стимулированной митогенами пролиферации МНК было установлено, что группа доноров крови, независимо от половой принадлежности, неоднородна по исходному уровню спонтанной пролиферации. У 6 доноров (42,8%) отмечался относительно более высокий уровень данного параметра, по сравнению с группой из 8 (57,2%) доноров с более низ-

ким уровнем спонтанной пролиферации. МНК крови доноров как с высокой, так и низкой спонтанной пролиферацией отвечали на воздействие ConA выраженной стимуляцией пролиферативной активности клеток. Уровень стимулированной пролиферации МНК не зависел от их исходной пролиферативной активности ($R_s = 0,24$, $p > 0,05$). В то же время у доноров крови с высоким уровнем спонтанной пролиферации был более низкий ответ на стимуляцию PWM, по сравнению с группой доноров с низким исходным уровнем пролиферации, которые характеризовались значительно более высоким пролиферативным ответом на данный митоген ($R_s = -0,48$, $p < 0,05$) (табл. 1).

При исследовании влияния ретровирусного олигопептида, по сравнению с контрольным, на спонтанную и митоген-индуцированную пролиферацию МНК крови доноров, было установлено, что воздействие SKSλ4-1 приводит к повышению уровня спонтанной пролиферации МНК, в зависимости от ее исходных значений.

У доноров с исходно низкой пролиферативной активностью наблюдается более значительное повышение ее уровня под действием ретровирусного олигопептида, по сравнению с донорами с исходно высокой пролиферацией МНК, у которых воздействие SKSλ4-1 вызывает менее выраженную стимуляцию пролиферации ($R_s = -0,71$, $p < 0,05$). Больные РС по уровню спонтанной пролиферации не отличались от группы доноров, но характеризовались более низким пролиферативным ответом на стимуляцию ConA и PWM.

Изучение влияния SKSλ4-1 на уровень пролиферации МНК доноров и больных РС

Было установлено, что SKSλ4-1 стимулирует индуцированную ConA пролиферативную активность МНК доноров как с высоким, так и с низким исходным уровнем спонтанной пролиферации, независимо от ее исходного уровня ($R_s = 0,21$, $p > 0,05$). Повышение пролиферативной активности культур клеток, индуцированной PWM, при воздействии SKSλ4-1 происходит только у доноров крови с исходно низким уровнем спонтанной пролиферации. Параметры как спонтанной, так и митоген-индуцированной пролиферации МНК под действием контрольного олигопептида не отличались от значений, полученных при культивировании МНК без добавления олигопептидов. Пролиферативный ответ МНК больных РС под действием SKSλ4-1 характеризовался увеличением показателей как спонтанной, так и индуцированной митогенами пролиферации, в то время как контрольный олигопептид не изменял уровня пролифера-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ПРОЛИФЕРАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ, Me (25%; 75%)

Группы доноров крови	Спонтанная пролиферация	СопА-индуцированная пролиферация		PWM-индуцированная пролиферация	
		Абсолютная, имп/мин	Относительная, ИВ	Абсолютная, имп/мин	Относительная, ИВ
1	1328 (843; 2420)	14414,5 (9111; 30522)*	10,8 (9,9; 12,6)	7117,5 (6562,5; 8009,5)*	5,4 (5,1; 5,6)
2	2321 (1522; 3228)	38690,5 (17656; 45636)*	16,6 (14,5; 17,2)	6873 (5787; 7506)*	3,0 (2,7; 3,3)
3	663 (583; 990)**	11146 (7292; 14288)*, **	16,8 (15,1; 17,4)	8139 (7489; 8538)*, **	12,3 (11,6; 13,8)
4	2421 (2125; 3230)	14873 (12923; 20657)*	6,1 (5,6; 7,2)**	6197 (5887; 7345)*	2,6 (2,3; 2,9)**

Примечание. 1 – объединенная группа доноров, включенных в исследование, n = 14; 2 – доноры с исходно высоким уровнем спонтанной пролиферации, n = 6; 3 – доноры с исходно низким уровнем спонтанной пролиферации, n = 8; 4 – больные РС, n = 16; * – статистическая значимость различий с показателем спонтанной пролиферации (p < 0,05, Н-критерий Крускала–Уоллиса); ** – статистическая значимость различий между группами с низкой и высокой спонтанной пролиферацией, между группой доноров и больных (p < 0,05, U-критерий Манна–Уитни), ИВ – индекс влияния.

ции МНК больных РС, как нестимулированных, так и стимулированных митогенами (табл. 2).

Далее мы исследовали влияние различных концентраций СКСλ4-1 на показатели пролиферации МНК доноров. Полученные результаты представлены в таблице 3.

На основании полученных результатов было установлено, что стимуляция спонтанной пролиферативной активности МНК крови доноров СКСλ4-1 носит дозозависимый характер ($R_s = 0,61$, p < 0,05). Костимулирующий эффект различных концентраций СКСλ4-1 в отношении пролиферации МНК, индуцированной СопА, также дозозависим (положительная частная корреляция, $R_s = 0,58$, p < 0,05). Влияние СКСλ4-1 на пролиферативную активность МНК, индуцированную PWM, имеет выраженную прямую зависимость от дозы олигопептида в культурах клеток доноров с исходно низким уровнем пролиферации (частная корреляция, $R_s = 0,6$, p < 0,05).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что олигопептид региона *envelope* ЭР *HERV-Eλ4-1* стимулирует пролиферативную активность МНК крови человека. Данный эффект выявляется как на нестимулированных, так и на активированных поликлональными Т- и В-клеточными активаторами клетках доноров и больных РС. Степень стимуляции пролиферативной активности МНК у доноров зави-

сит от концентрации СКСλ4-1 в культуре и исходного уровня их спонтанной пролиферации.

Обсуждение

Результатами современных исследований выявлена ассоциация ЭР с целым рядом заболеваний человека, в частности РС [26]. В то же время механизмы участия ЭР в патогенезе РС остаются невыясненными. Одним из способов реализации биологических эффектов ЭР является выработка белков, обладающих иммуномодулирующими свойствами. Большинство экзогенных ретровирусов человека и эндогенных ретровирусов животных обладают способностью подавлять иммунный ответ, продукцию IL-2, IL-12, TNFα, IFNγ, в основе которой лежат свойства трансмембранного протеина p15E оболочки ретровирусов [11, 13, 15]. В то же время описан пептид ЭР человека *MSRV*, способный стимулировать иммунный ответ [21, 26].

Изучение иммуотропных свойств ЭР человека и продуцируемых ими белков является актуальным для выяснения их роли в этиопатогенезе РС.

В данной работе мы исследовали иммуномодулирующие свойства синтетического олигопептида региона *envelope* ЭР человека *HERV-Eλ4-1*, который, согласно принятой в настоящее время классификации, относится к I классу, субклассу *HERV-E* ЭР человека, имеющему высокую степень гомологии базовых последовательностей

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РЕТРОВИРУСНОГО ОЛИГОПЕПТИДА НА УРОВЕНЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ МОНОЯДЕРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ В КУЛЬТУРЕ, Me (25%; 75%)

Группы доноров крови	Условия индукции						СК λ 4-1	
	0,9% NaCl		Контрольный олигопептид		Относительная, ИВ	Абсолютная, ИМП/МИН	Относительная, ИВ	Абсолютная, ИМП/МИН
	Абсолютная, ИМП/МИН	Относительная, ИВ	Абсолютная, ИМП/МИН	Относительная, ИВ				
1	871 (686; 992)	1,0 (1,0; 1,0)	920 (783; 943)	1,07 (1,02; 1,08)	2700 (1980; 2990)* ***	2,5 (2,2; 4,2)* ** ,***		
2	2110 (1990; 2400)	1,0 (1,0; 1,0)	2120 (1960; 2475)	1,05 (0,81; 1,06)	3449 (2670; 4117)* **	1,6 (1,15; 1,6)* **		
3	1425 (871; 2110)	1,0 (1,0; 1,0)	1625 (920; 2120)	1,05 (1,02; 1,07)	2787 (2355; 3441)*	1,9 (1,6; 2,5)* **		
4	20580 (19920; 21944)	1,0 (1,0; 1,0)	19040 (16240; 21033)	0,8 (0,8; 0,98)	30982 (29205; 32690)	1,4 (1,0; 1,55)* **		
5	21300 (18470; 23914)	1,0 (1,0; 1,0)	23090 (18300; 25200)	1,03 (0,9; 1,1)	33288 (30633; 35088)* **	1,54 (1,47; 1,76)* **		
6	20722 (19111; 23914)	1,0 (1,0; 1,0)	20485 (16240; 23560)	0,94 (0,8; 1,03)	32227 (29998; 33683)* **	1,5 (1,4; 1,55)* **		
7	9105 (8736; 9241)	1,0 (1,0; 1,0)	9980 (9072; 10119)	1,07 (1,05; 1,19)	12647 (12103; 13969)* **	1,44 (1,38; 1,58)* ** ,***		
8	6460 (6180; 7436)	1,0 (1,0; 1,0)	7542 (6518; 8240)	1,15 (0,98; 1,18)	8347 (7658; 8909)	1,35 (1,04; 1,36)		
9	7973 (6460; 9105)	1,0 (1,0; 1,0)	8259 (7542; 9980)	1,11 (1,05; 1,18)	10124(8347; 12647)	1,37 (1,30; 1,44)*		
10	2421 (2125; 3230)	1,0 (1,0; 1,0)	2704 (2520; 3307)	1,12 (1,0; 1,17)	4395 (3998; 4775)* **	1,82 (1,78; 2,2)* **		
11	15873 (14923; 22 657)	1,0 (1,0; 1,0)	16004 (15645; 21007)	1,01 (1,0; 1,09)	26034 (19892; 29076)* **	1,64 (1,57; 1,79)* **		
12	6197 (5887; 7345)	1,0 (1,0; 1,0)	7157 (6378; 7335)	1,15 (1,11; 1,2)	8027 (7305; 8341)* **	1,29 (1,23; 1,34)* **		

Примечание. n = 14; Группы: 1-3: спонтанная пролиферация; 1 – доноры с низким уровнем исходной пролиферации, n = 8; 2 – доноры с высоким уровнем исходной пролиферации, n = 6; 3 - объединенная группа доноров, n = 14; 4-6: СоА; 4- доноры с низким уровнем исходной пролиферации, n = 8; 5 – доноры с высоким уровнем исходной пролиферации n = 6; 6 - объединенная группа доноров, n = 14; 7-9: РММ; 7 – доноры с низким уровнем исходной пролиферации, n = 8; 8 – доноры с высоким уровнем исходной пролиферации, n = 6; 9 – объединенная группа доноров, n = 14; 10-12: большая РС; 10 – спонтанная пролиферация, n = 16; 11 – СоА, n = 16, 12 – РММ, n = 16; * – статистическая значимость различий между спонтанной и олигопептид-индуцированной пролиферацией; ** – статистическая значимость различий между пролиферацией, индуцированной контрольным олигопептидом и СК λ 4-1 (p < 0,05, Н-критерий Крускала-Уоллиса); *** - статистическая значимость различий между группами доноров с низкой и высокой исходной пролиферацией (p < 0,05, U-критерий Манна-Уитни), ИВ – индекс влияния.

ТАБЛИЦА 3. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СКСλ4-1; ИВ [Ме (25%; 75%)]

Группы доноров крови	Концентрация СКСλ4-1			
	0 мкг/мл	10 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл
1	1,0 (1,0; 1,0)	1,41 (1,14; 1,93)*	1,47 (1,06; 2,25)*	1,99 (1,5; 2,64)*
2	1,0 (1,0; 1,0)	1,2 (1,1; 1,31)*	1,31 (1,1; 1,69)*	1,22 (1,1; 1,54)*
3	1,0 (1,0; 1,0)	1,02 (0,85; 1,03)	0,99 (0,71; 1,08)	1,05 (0,89; 1,13)
4	1,0 (1,0; 1,0)	1,13 (1,08; 1,17)	1,09 (1,07; 1,12)	1,3 (1,2; 1,5)*
5	1,0 (1,0; 1,0)	0,87 (0,85; 1,0)	0,87 (0,84; 1,1)	0,97 (0,95; 1,1)

Примечание. n = 11 в группах 1-3 (объединенная группа доноров); n = 3 в группах 4-5; 1 – Спонтанная пролиферация; 2 – СопА-индуцированная пролиферация; 3 – PWM-индуцированная пролиферация; 4 – PWM-индуцированная пролиферация, доноры с исходно низкой спонтанной пролиферацией; 5 – PWM-индуцированная пролиферация, доноры с исходно высокой спонтанной пролиферацией; статистическая значимость различий (H-критерий Крускала-Уоллиса), * – p < 0,05, ИВ – индекс влияния.

нуклеотидов в регионах *gag*, *pol* и *env* с вирусом мышиной лейкемии Молони [15]. Учитывая выявленную нами ранее ассоциацию экспрессии данного ретровируса с течением РС, нам представлялось актуальным изучить возможные механизмы участия данного ретровируса в патогенезе заболевания.

Так как пролиферация иммунокомпетентных клеток лежит в основе практически любого проявления активности иммунной системы [5], а выраженность пролиферативного ответа МНК в ответ на митогенное воздействие является одним из критериев определения их функциональной активности [7], мы исследовали данный параметр у условно здоровых доноров и больных РС при воздействии СКСλ4-1 в культуре МНК.

Известно, что Т- и В-лимфоциты отвечают на воздействие митогенами индукцией митозов, поликлональной пролиферацией, трансформацией в бластные формы с последующей дифференцировкой, причем синтез ДНК и индукция митозов в ответ на поликлональную активацию В-клеточными митогенами характерны в большей степени для незрелых В-лимфоцитов, тогда как более зрелые реагируют на митогенное воздействие преимущественно секрецией антител с широким спектром специфичностей [6]. Выявленное нами повышение уровня спонтанной пролиферации МНК доноров и больных РС под действием СКСλ4-1 свидетельствует о его способности стимулировать функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Следует отметить, что СКСλ4-1 оказывает костимулирующее воздействие и на культуры клеток доноров и больных РС, преактивированных субоптимальными дозами митогенов. Причем у доноров в культурах МНК, обогащенных Т-лимфоцитами в результате поликлональной активации СопА, костимулирующее действие СКСλ4-1 выявляется независимо от исходного пролиферативного статуса МНК, как и ответ на митогенное воз-

действие. Однако, костимулирующий эффект СКСλ4-1 в культурах клеток доноров, преактивированных PWM, вызывающим поликлональную активацию как Т-, так и В-лимфоцитов, выявляется лишь на культурах с исходно низким уровнем пролиферации, которые обладают большей реактивностью в ответ и на стимуляцию митогеном. Данные различия, вероятно, могут быть обусловлены тем, что МНК крови доноров с исходно высокой пролиферативной активностью содержат преактивированные какими-либо факторами внешней среды В-лимфоциты, пролиферирующие, дифференцирующиеся и синтезирующие антитела. Принимая во внимание то, что зрелые В-лимфоциты отвечают на митогенную стимуляцию преимущественно синтезом полиспецифичных антител, а не индукцией митозов, дальнейшая их активация митогеном и костимуляция ретровирусным олигопептидом не будет приводить к значительному повышению пролиферации.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследования [18] о повышении продукции IL-6 и IL-16 МНК при совместном культивировании их с синтетическим протеином ЭР *HERV-Eλ4-1*, а также полученными нами ранее данными об увеличении выраженности клеточного иммунного ответа у мышей на тимусзависимый антиген под действием СКСλ4-1 *in vivo* [1, 2].

Таким образом, на основании результатов настоящего исследования, свидетельствующих о повышении спонтанной и митоген-индуцированной пролиферации МНК крови человека под действием СКСλ4-1, можно заключить, что одним из механизмов участия ЭР человека *HERV-Eλ4-1* в патогенезе РС является иммуностимулирующее воздействие его олигопептида региона *envelope*, обладающего митогенными свойствами, по отношению к иммунокомпетентным клеткам больных.

Список литературы

1. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Козлов В.А. Эндегенный ретровирус человека *HERV-Eλ4-1* в патогенезе рассеянного склероза: иммуномодулирующие свойства ретровирусного пептида // Нейроиммунология. – 2011. – Т. IX, № 3-4. – С. 55-56.
 2. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Маркова Е.В., Козлов В.А. Клеточный иммунный ответ при воздействии рекомбинантного пептида, гомологичного аминокислотной последовательности эндогенного ретровируса человека I класса *HERV-Eλ4-1* // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. – Т. 2/1, № 24. – С. 28-30.
 3. Гольдина И.А., Сафронова И.В., Постников В.А., Сизиков А.Э., Гайдуль К.В. Экспрессия гена *envelope* эндогенного ретровируса человека I класса λ 4-1 в мононуклеарных клетках крови больных ревматоидным артритом и деформирующим остеоартрозом // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. – Т. 2/1, № 24. – С. 95-96.
 4. Гольдина И.А., Гайдуль К.В., Смагин А.А., Сафронова И.В., Гольдин Б.Г., Павлов В.В., Любарский М.С., Козлов В.А. Экспрессия гена *envelope* эндогенного ретровируса человека I класса в мононуклеарных клетках крови больных рассеянным склерозом // Молекулярная медицина. – 2011. – №. 1. – С. 31-35.
 5. Ковальчук Л.В., Череев А.Н. Актуальные проблемы оценки иммунной системы человека на современном этапе // Иммунология. – 1990. – № 5. – С. 4-7.
 6. Рингден О., Мюллер Э. Применение митогенов для функциональной характеристики субпопуляций лимфоцитов человека. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / Под ред. Дж. Б. Натвига, П. Перлманна, Х. Вигзелля. – М.: Медицина, 1980. – С. 185-201.
 7. Хайтов Р.М., Гущин И.С., Пинегин Б.В., Зебрев А.И. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2000. – 398 с.
- Ссылки 8-31 см. в References (см. 255-256). See References for numbers 8-31 at pp. 255-256.

References

1. Goldina I.A., Gaydul K.V., Kozlov V.A. Endogenous retrovirus of human *HERV-Eλ4-1* in pathogenesis of disseminated sclerosis: immunomodulatory properties of retroviral peptide [Human endogenous retrovirus *HERV-Eλ4-1* in multiple sclerosis pathogenesis]. *Neuroimmunologia – Neuroimmunology*, 2011, vol. IX, no. 3-4, pp. 55-56.
2. Goldina I.A., Gaydul K.V., Markova E.V., Kozlov V.A. Cellular immune response under the influence of recombinant peptide homologous to the amino acid sequence of I class human endogenous retrovirus *HERV-Eλ4-1*. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki – Bulletin of the Ural Academic Medical Science*, 2009, vol. 2/1, no. 24, pp. 28-30.
3. Goldina I.A., Safronova I.V., Postnikov V.A., Sizikov A.E., Gaydul K.V. Expression of gene *envelope* of endogenous retrovirus of human I class λ4-1 in mononuclear cells of blood of patients with rheumatoid arthritis and deforming osteoarthritis [I class human endogenous retrovirus λ4-1 expression in blood mononuclear cells of deforming osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients]. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki – Bulletin of the Ural Academic Medical Science*, 2009, vol. 2/1, no.24, pp. 95-96.
4. Goldina I.A., Gaydul K.V., Smagin A.A., Safronova I.V., Goldin B.G., Pavlov V.V., Lubarsky M.S., Kozlov V.A. Expression of gene *envelope* of endogenous retrovirus of human I class in mononuclear cells of blood of multiple sclerosis patients [I class human endogenous retrovirus envelope gene expression in blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients]. *Molekulyarnaya meditsina – Molecular Medicine*, 2011, no. 1, pp. 31-35.
5. Koval'chuk L.V., Cheredeev A.N. Actual problems of human immune system estimation at current stage. *Immunologiya – Immunology*, 1990, no. 5, pp. 4-7.
6. Ringden O., Myuller E. Application of mitogens for the functional characteristics of subpopulations of human lymphocytes. Lymphocytes: isolation, fractionation and characteristics / Ed. by Dzh. B. Natvig, P. Perlmann, H. Wigzell. [Mitogens using for the human lymphocyte subpopulations description.

Lymphocytes: isolation, fractionating and characteristic. Ed. B. Natvig, P. Perlmann, X. Vigzell]. *Moscow, Medicine, 1980, pp. 185-201.*

7. Haitov R.M., Gushchin I.S., Pinegin B.V., Zebrev A.I. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Manual of experimental (preclinic) investigation of present-day pharmacological substances]. *Moscow, Medicine, 2000. 398 p.*

8. Bannert N., Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004, vol. 5, no. 101, pp. 14572-14579.*

9. Blank M. Cross-talk of the environment with the host genome and the immune system through endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus. *Lupus, 2009, vol. 18, pp. 1136-1143.*

10. Cho K., Lee Y.K., Greenhalgh D.G. Endogenous retroviruses in systemic response to stress signals. *Shock, 2008, vol. 30, pp. 105-116.*

11. Cianciolo G.J., Copeland T.D., Oroszlan S., Snyderman R. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science, 1985, vol. 230, pp. 453-455.*

12. Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet, 2008, vol. 372, pp. 1502-1517.*

13. Gaidul K.V., Chernuchin I.V., Khaldoyanidi S.K., Svinarchuk F.P., Vlasov V.V., Kozlov V.A. Functional activity of T-, B-lymphocytes and macrophages under suppressed expression of endogenous retroviral gene *env*. *Mol. Biol., 1995, vol. 29, pp. 359-362.*

14. Gonsette R.E. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Belg., 2012, vol. 112, no. 2, pp. 133-140.*

15. Haraguchi S., Good R.A., Day-Good N.K. A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol. Res., 2008, vol. 41, pp. 46-55.*

16. Jern P., Coffin J.M. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu. Rev. Genet., 2008, vol. 42, pp. 709-732.*

17. Koito A., Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiol., 2013, vol. 4, art. 28, pp. 1-9.*

18. Natio T., Ogasawara H., Kaneko H., Hishikawa T., Sekigawa I., Hashimoto H., Maruyama N. Immune abnormalities induced by human endogenous retroviral peptides: with reference to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol., 2003, vol. 23, pp. 371-376.*

19. Nelson P.N., Carnegie P.R., Martin J., Davari Eitehadi H., Hooly P., Roden D., Rowland-Jones S., Warren P., Astley J., Murray P.G. Demystified... Human endogenous retroviruses. *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol., 2003, vol. 56, pp. 11-18.*

20. Ogasawara H., Kaneko H., Hishikawa T., Sekigawa I., Takasaki Y., Hashimoto H., Hirose S., Kaneko Y., Maruyama N. Molecular mimicry between human endogenous retrovirus clone 4-1 and HLA class I antigen with reference to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology, 1999, vol. 38, pp. 1163-1164.*

21. De Olival G.S., Faria T.S., Nali L.H., de Oliveira A.C.P., Casseb L., Vidal J., Cavenaghi V., Tiberty C.P., Moraes L., Fink M.C.S., Sumita L.M., Perron H., Romano C.M. Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retroviruses type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front. in Microbiol., 2013, vol. 4, art. 172, pp. 1-7.*

22. de Parseval N., Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet. Genome Res., 2005, vol. 110, pp. 318-332.*

23. Perron H., Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin. Rev. Allergy Immunol., 2010, vol. 39, pp. 51-61.*

24. Piotrowski P.C., Duriagin S., Jaqodzinski P.P. Expression of human endogenous retroviruses clone 4-1 may correlate with blood plasma concentration of anti-U1 RNP and anti-Sm nuclear antibodies. *Clin. Rheumatol., 2005, vol. 24, no. 6, pp. 620-624.*

25. Rakoff-Nahoum S., Kuebler P.J., Heymann J. J., Sheehy M.E., Oritz G.M., Ogg G.S., Barbour J.D., Lenz J., Steinfeld A.D., Nixon D.F. Detection of T lymphocytes specific for human endogenous retrovirus K (HERV-K) in patients with seminoma. *AIDS Res. and Human Retroviruses, 2006, vol. 1, pp. 52-56.*

26. Sarasella M., Rolland A., Marventano T. Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV) – stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 2009, vol. 15, pp. 443-447.
27. Smagin A.A., Goldina I.A. Human endogenous retrovirus of class I λ 4-1 envelope gene expression in different types of blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients. Materials 14th International Congress of Immunology Kobe, Japan, 2010. *International Immunology*, 2010, vol. 22, no. 1, pp. 38-30.
28. Trapp B.D., Nave K.A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu. Rev. Neurosci.*, 2008, vol. 31, pp. 247-269.
29. Urnovitz H.B., Murphy W.H. Human endogenous Retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 9, no. 1, pp. 72-99.
30. Voisset C., Weiss R., Griffiths J. Human RNA “Rumor” viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008, vol. 72, pp. 157-196.
31. Yi J.M., Kim H.S. Molecular phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus E (*HERV-E*) family in human tissues and human cancers. *Genes Genet.*, 2007, vol. 82, no. 1, pp. 89-98.