

УДК 571.27

АНТИТЕЛА К ДНК СЫВОРОТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ ПРОЯВЛЯЮТ ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Сабирзянова А.З., Невзорова Т.А.

ГОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия, e-mail: 111v_alsusa@inbox.ru.

В работе показано, что положительно заряженные низкоаффинные и высокоаффинные антитела класса IgG к нативной ДНК (IgG-АТ к нДНК) доноров и больных системной красной волчанкой (СКВ) на стадии обострения заболевания оказывают сходное генотоксическое воздействие на лимфоциты здоровых лиц *in vitro*. АТ к ДНК больных СКВ на стадии обострения, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, проявляют более выраженную генотоксичность в культуре лимфоцитов. Обнаружено, что спектр генотоксичных субфракций в сыворотке крови больных ревматоидным артритом шире, чем в норме и при СКВ, и представлен высокоаффинными IgG-АТ к нДНК. В статье обсуждаются возможные причины генерации патологических АТ класса IgG к нДНК и их биологическая роль в организме.

Ключевые слова: антитела к ДНК, лимфоциты, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, генотоксичность.

ANTIBODIES TO DNA FROM SERA OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS EXHIBIT GENOTOXICITY IN PRIMARY LYMPHOCYTE CULTURE OF HEALTHY INDIVIDUALS

Sabirzyanova A.Z., Nevzorova, T.A.

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia, e-mail: 111v_alsusa@inbox.ru.

It is shown that positively charged low-affinity and high-affinity IgG-antibodies to native DNA (IgG-Ab to nDNA) of donors and patients with systemic lupus erythematosus (SLE) in the acute stage of the disease have a similar genotoxic effect on the lymphocytes of healthy individuals *in vitro*. Ab to DNA of SLE patients in the acute stage, that have DNA-hydrolyzing activity, exhibit a more visible genotoxicity in the culture of lymphocytes. It was found that the spectrum of genotoxic subfractions in the serum of patients with rheumatoid arthritis is wider than in healthy and SLE, and submitted to high-affinity IgG-Ab to nDNA. The article discusses the possible reasons for the generation of pathological IgG-Ab to nDNA and their biological role in the organism.

Keywords: antibodies to DNA, lymphocytes, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, genotoxicity.

Лимфоциты – основные клетки иммунной системы, обеспечивающие гуморальный иммунитет и регулирующие взаимодействие и функционирование клеток в сложном многоклеточном организме в процессе иммунного ответа.

Нарушение функциональной активности Т- и В-лимфоцитов отражается в развитии разнообразных форм иммунонедостаточности.

Системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит (РА) – это хронические

аутоиммунные заболевания (АИЗ) с неясной этиологией и обширной картиной иммунопатогенеза, снижают качество и продолжительность жизни населения, поэтому входят в число важных биомедицинских и социальных проблем современности [4; 3].

Для больных СКВ характерно повышение уровня IgG-АТ к нДНК, которые обладают ДНК-гидролизующей активностью [4; 5] и, вероятно, являются участниками патологического процесса. Но на сегодняшний день среди исследователей нет единого мнения о вкладе АТ к нДНК в развитие и течение АИЗ.

При РА также наблюдается повышение уровня ДНК-гидролизующих АТ, но клинические признаки отличаются от СКВ [3; 7]. Следовательно, течение патологического процесса может определяться не только уровнем АТ к ДНК, но и их свойствами, различающимися при разнообразных АИЗ.

Исследования последних лет показали, что некоторые АТ к ДНК проникают внутрь клеток и влияют на внутриклеточные процессы [9].

Можно высказать предположение, что IgG-АТ к нДНК, взаимодействуя с ДНК клеток и изменяя структуру хроматина, приводят к нарушению апоптоза иммунокомпетентных клеток, следствием чего является увеличение апоптотического материала и времени его циркуляции в кровотоке, что наблюдается при СКВ и усугубляет течение аутоиммунного процесса.

Целью работы явилось исследование генотоксичности антител класса IgG к нативной ДНК в первичной культуре лимфоцитов здоровых лиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение IgG-АТ к нДНК из сыворотки крови человека

Все этапы очистки выделения и очистки IgG-АТ к нДНК из сывороток доноров и больных СКВ и РА проводили по ранее разработанной методике [4]. В работе использовали АТ к ДНК сывороток крови лиц женского пола – 20 сывороток здоровых доноров, 7 сывороток больных СКВ и 20 сывороток больных РА в период обострения заболевания, полученные в медицинских учреждениях г. Казани. Диагноз СКВ и РА был поставлен квалифицированными ревматологами ГОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Выделение лимфоцитов из цельной крови здоровых лиц проводили по стандартной методике на фиколл-верографине – плотность 1.077 мг/мл [10].

Культивирование лимфоцитов в присутствии IgG-АТ к нДНК

К клеткам ($2 \cdot 10^4$ клеток/лунку), разведенным полной средой RPMI-1640 pH 7.4

(Gibco, Scotland), содержащей 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин («Serva», Germany), 100 ед/мл пенициллина (Россия), 100 мкг/мл стрептомицина (Россия), добавляли очищенные субфракции IgG-АТ к нДНК до конечной концентрации 1 мкг/мл. Каждый опыт повторяли трижды. Клетки инкубировали при 37 °С, 0.5% CO₂ в течение 72 часов.

Общее количество и количество жизнеспособных лимфоцитов после выделения из цельной крови и инкубации с субфракциями IgG-АТ к нДНК определяли методом исключения трипанового синего.

Определение уровня повреждения ядерной ДНК клеток после культивирования с субфракциями IgG-АТ к нДНК проводили методом флуоресцентной спектрофотометрии по изменению интенсивности флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина лимфоцитов [2].

Определение уровня повреждения ядерной ДНК методом гель-электрофореза лизированных единичных клеток – «ДНК-комет»

Использовали 1%-ный раствор легкоплавкой агарозы («Fermentas», Canada) в ФСБ. На предметное стекло, покрытое полилизинем («ApxLab», Россия), наносили 60 мкл агарозного геля с клетками ($2 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$), равномерно распределяли и оставляли на 30 минут при +20 °С. Лизис клеток (10 мМ Tris-HCl pH 10, 2.5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1% Triton X-100, 5% DMSO, +4 °С) проводили в течение 1 часа. Затем стекла переносили в электрофорезный буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, pH>13, +4 °С) и оставляли на 20 минут. Электрофорез проводили 20 минут при 1 В/см и 300 мА. По окончании препараты переносили в раствор для фиксации (70%-ный этиловый спирт) на 15 минут, после чего высушивали при +20 °С (1–2 часа). В качестве положительного контроля для визуализации деградации ДНК использовали клетки, инкубированные в течение 5 минут при -20 °С в присутствии 100 мкМ H₂O₂. Препараты окрашивали акридиновым оранжевым (20 мкг/мл) в течение 30 минут и анализировали на флуоресцентном микроскопе (AxioScore A1, «Carl Zeiss», Germany) с соответствующими фильтрами (возбуждающий фильтр 490 нм, дихроичное зеркало 510, отсекающий фильтр 530 нм), увеличение 40х.

Статистическая обработка данных

Из полученных данных изменения жизнеспособности и интенсивности флуоресценции ЭБ-ДНК клеток вычисляли медиану, 97,5 и 2,5 перцентили, используя стандартный пакет программ Excel Office 2003, дополнительно использовали критерий Даннета [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение уровня ДНК-гидролизующих АТ наблюдается при СКВ и РА, но клиническая картина заболеваний отличается [4; 7]. Предположительно, IgG-АТ к нДНК являются индукторами и участниками воспалительного процесса при АИЗ, но что определяет их патогенетический потенциал и каким образом он реализуется в организме, до конца не выяснено.

Поэтому для более глубокого понимания роли АТ к нДНК в индукции и течении аутоиммунного синдрома была оценена зависимость генотоксичности IgG-АТ к нДНК от их физико-химических и иммуно-химических свойств.

Из каждой сыворотки было получено по 4 субфракции свободных от иммунных комплексов IgG-АТ к нДНК, различающихся зарядом (фракции I, характеризующиеся общим положительным зарядом, и фракции II с общим отрицательным зарядом) и аффинностью к нДНК – субфракции а, элюированные с нДНК-целлюлозы буфером, содержащим 1М NaCl, и субфракции б, элюированные с сорбента буфером Gly-HCl с pH 2.3, что позволяет сделать предположение об их большей аффинности к антигену.

Показано, что в присутствии положительно заряженных IgG-АТ к нДНК доноров снижается общее количество и количество жизнеспособных лимфоцитов по сравнению с контролем (ФСБ) (рис 1). IgG-АТ к нДНК больных СКВ на стадии обострения заболевания оказывают сходное с АТ доноров влияние на лимфоциты здоровых лиц, но их воздействие более выражено, что, вероятно, связано с их высокой ДНК-гидролизующей активностью.

Отсутствие у доноров клинических признаков заболевания при аналогичном воздействии на клетки IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания объясняется тем, что уровень IgG-АТ к нДНК в крови здоровых людей значительно ниже, чем у больных СКВ. Кроме того, большая часть IgG-АТ к нДНК в крови здоровых лиц находится в составе иммунных комплексов с антиидиотипическими АТ [4] или отрицательно заряженными биополимерами сходной с ДНК конформации.

В процессе выделения IgG-АТ к нДНК из сывороток происходит разрушение иммунных комплексов АТ-ДНК с образованием свободных АТ к нДНК, а в опытах на лимфоцитах мы использовали равные концентрации всех исследуемых АТ, получив таким образом возможность наблюдать потенциальный негативный эффект на клетки *in vitro* АТ доноров.

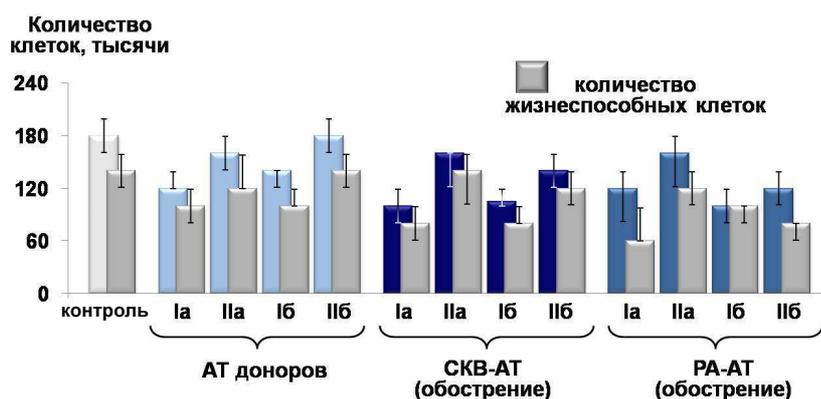


Рис. 1. Изменение общего количества и количества жизнеспособных лимфоцитов здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37 °С в присутствии субфракций IgG-АТ к нДНК:

Ia – положительно заряженные низкоаффинные IgG-АТ к нДНК;

IIa – отрицательно заряженные низкоаффинные IgG-АТ к нДНК;

Ib – положительно заряженные высокоаффинные IgG-АТ к нДНК;

IIb – отрицательно заряженные высокоаффинные IgG-АТ к нДНК.

Вероятно, патологические СКВ-АТ к нДНК могут происходить от естественных АТ, выполняющих в организме защитные функции, но вопрос о причинах подобного аномального переключения остается открытым.

Впервые показано, что спектр цитотоксичных субфракций IgG-АТ к нДНК в сыворотках крови больных РА отличается от нормы и СКВ. Наряду с положительно заряженными низкоаффинными АТ к ДНК, характерными для доноров и больных СКВ, высокоаффинные положительно и отрицательно заряженные субфракции IgG-АТ к нДНК больных РА приводят к заметному снижению пролиферации и количества жизнеспособных лимфоцитов здоровых лиц *in vitro*.

Изменение конденсации хроматина лимфоцитов после воздействия субфракций IgG-АТ к нДНК было исследовано методом флуоресцентной спектроскопии. Образование разрывов в ДНК приводит к декомпактизации хроматина, увеличению мест связывания ЭБ с нуклеиновой кислотой и усилению флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК [2].

Дополнительно генотоксичность IgG-АТ к нДНК была оценена методом «ДНК-комет». При наличии разрывов в ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация, что приводит к релаксации молекул. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет». По длине и структуре «хвоста комет» можно судить о степени деградации ДНК клеток.

Повышение интенсивности флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК в образцах, инкубированных с положительно заряженными IgG-АТ к нДНК (Ia, Ib) доноров,

свидетельствует об изменении структуры ДНК хроматина клеток – снятии суперспирализации и возможном образовании разрывов (таблица 1). На типичных микрофотографиях объектов после инкубации клеток с положительно заряженными IgG-АТ к нДНК обнаружено образование «хвостов комет» (рис 2В), что не наблюдается в отрицательном контроле ФСБ (рис. 2А) и является отражением генотоксичности АТ к ДНК. Вероятно, некоторые ДНК-связывающие АТ доноров, проникая в клетки, могут достигать ядра, связываться с ДНК и изменять ее конформацию. Например, показано, что АТ в сайте связывания с ДНК значительно усиливают её разрушение гидроксил-радикалами [8]. Вероятно, АТ к нДНК способствуют окислительному разрушению нДНК, изменяя её структуру, делая доступным для гидроксил-радикалов сайты рестрикции.

Таблица 1 – Изменение уровня флуоресценции ЭБ-ДНК хроматина лимфоцитов после 72 часов инкубации при 37 °С с субфракциями IgG-АТ к нДНК

Субфракции IgG-АТ к нДНК	Интенсивность флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК, единиц/клетку			
	Доноры	СКВ	РА	Контроль (ФСБ)
Положительно заряженные низкоаффинные	7.85 (6.75; 8.32)	9.52 (9.27; 11.06)	8.51 (8.40; 8.91)	6.67 (5.75; 6.85)
Отрицательно заряженные низкоаффинные	5.56 (5.04; 6.80)	6.95 (6.49; 7.12)	5.98 (5.53; 6.19)	
Положительно заряженные высокоаффинные	9.10 (8.94; 9.15)	9.82 (9.25; 9.94)	9.52 (9.24; 9.64)	
Отрицательно заряженные высокоаффинные	6.40 (5.64; 7.07)	6.64 (6.46; 7.67)	7.60 (6.96; 9.33)	

Негативное воздействие на структуру ДНК хроматина лимфоцитов положительно заряженных субфракциями IgG-АТ к нДНК (Ia, Ib) больных СКВ на стадии обострения заболевания более выражено по сравнению с АТ доноров, что отражается в резком повышении флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК. На типичной микрофотографии «ДНК-комет» отмечено образование широкого диффузного «хвоста кометы» (рис. 2Г), что является свидетельством высокой степени деградации ДНК лимфоцитов под воздействием АТ к ДНК больных СКВ. Генотоксичность IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период обострения заболевания сравнима с действием перекиси водорода, использованной в данном эксперименте в качестве положительного контроля (рис. 2Б). Предположительно, наряду с ДНК-связывающими, ДНК-гидролизующие СКВ-АТ [5] в клетках, достигая ядра, сами могут выступать в качестве биокатализаторов гидролиза фосфодиэфирных связей ДНК и таким образом проявлять генотоксичность.

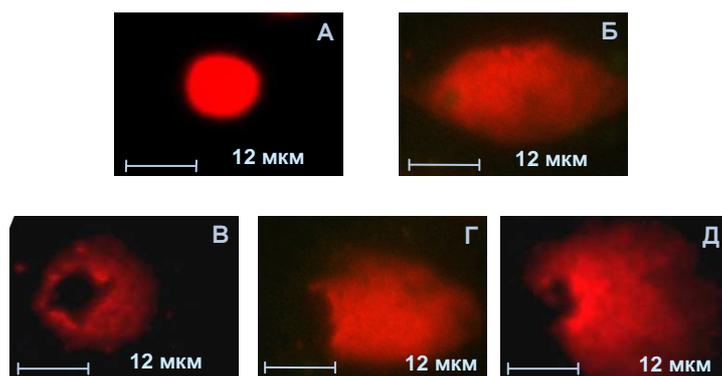


Рис. 2. Микрофотографии «ДНК-комет» после 72 часов инкубации при 37 °С лимфоцитов здоровых лиц с субфракциями IgG-АТ к нДНК:

А – отрицательный контроль (ФСБ); Б – положительный контроль (H_2O_2);

В – типичные ДНК-кометы, наблюдаемые после воздействия на лимфоциты субфракций Ia и Ib IgG-АТ к нДНК доноров;

Г – типичные ДНК-кометы, наблюдаемые после воздействия на лимфоциты субфракций Ia и Ib IgG-АТ к нДНК больных СКВ;

Д – типичные ДНК-кометы, наблюдаемые после воздействия на лимфоциты субфракций Ia, Ib и IIb IgG-АТ к нДНК больных РА.

На основании полученных результатов можно заключить, что для АТ доноров и СКВ-АТ при воздействии на клетки *in vitro* большее значение имеет заряд молекул IgG-АТ к нДНК, нежели аффинность их к антигену.

Обнаружено, что при РА спектр генотоксичных субфракций шире, чем в норме и при СКВ – повышение флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина клеток наблюдается после инкубации лимфоцитов с положительно заряженными низкоаффинными субфракциями (Ia), а также высокоаффинными субфракциями IgG-АТ к нДНК больных РА в период обострения заболевания, как положительно, так и отрицательно заряженными (Ib, IIb). При воздействии данных субфракций IgG-АТ к нДНК на клетки после электрофореза наблюдается формирование широких диффузных «хвостов комет» (рис. 2Д), свидетельствующее об образовании разрывов в ДНК лимфоцитов, что является следствием высокой генотоксичности АТ к ДНК при РА. На основании полученных результатов можно заключить, что при РА патогенетический потенциал IgG-АТ к нДНК определяется не зарядом молекулы, а аффинностью АТ к антигену – нативной ДНК. Это позволяет выдвинуть предположение об исходно иной природе формирования патологических IgG-АТ к нДНК при РА.

Вероятно, аномальное повышение уровня в крови естественных АТ к ДНК в определенных условиях способно привести к повреждению клеток иммунной системы, изменению их функциональной активности и экспрессии генов, что может отразиться нарушением иммунного статуса и индукцией аутоиммунного синдрома за счет

интенсификации апоптоза здоровых клеток и накопления модифицированных В-лимфоцитов, продуцирующих патологические IgG-АТ к нДНК. Таким образом, IgG-АТ к нДНК являются одним из ключевых звеньев иммунной системы, отражают изменение иммунного статуса и принимают участие в сохранении гомеостаза в многоклеточном организме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акберова Н.И. Сравнение данных. II Непараметрические критерии значимости : методическое пособие. – Казань : Издательство КГУ, 2004. – 50 с.
2. Анисимов А.Г. Обработка синхронизированных клеток K562 тетрафторалюминатом не модулирует флуоресценцию бромистого этидия и 4,6-диамидино-2-фенилиндола при связывании с нуклеоидной ДНК / А.Г. Анисимов, И.А. Болотников // Цитология – 1999. – Т. 41. – № 8. – С. 680–684.
3. Арлеевская М.И. Диагностические и прогностические маркеры ревматоидного артрита с точки зрения патофизиолога / М.И. Арлеевская, А.Г. Габдулхакова, А. Цибулькин. – Казань : Шип, 2010. – 128 с.
4. Невзорова Т.А. Происхождение и биологическая роль аутоантител к ДНК / Т.А. Невзорова, В.Г. Винтер // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2006. – Т. 148. – Кн. 3. – С. 35–52.
5. Сабирзянова А.З. Влияние антител класса IgG к нативной ДНК на моноциты человека *in vitro* / А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150. – Кн. 2. – С. 186–200.
6. Ardoin S.P. Developments in the scientific understanding of lupus / S.P. Ardoin, D.S. Pisetsky // *Arthritis Research & Therapy*. – 2008. – Vol. 10. – № 5. – P. 218–225.
7. Gabibov A.G. Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // *Autoimmun Rev.* – 2006. – Vol. 5. – № 5. – P. 324–330.
8. Kubota T. Enhancement of oxidative cleavage of DNA by the binding sites of two anti-double-stranded DNA antibodies // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 11. – P. 6555–6561.
9. Rivadeneyra-Espinoza L. Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways / L. Rivadeneyra-Espinoza, A. Ruiz-Argüelles // *J Autoimmun.* – 2006. – Vol. 26. – № 1. – P. 52–56.
10. Yang R. Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies // *Lupus*. – 2001. – Vol. 10. – P. 539–541.

Рецензенты:

Чиков В.И., д.б.н., профессор, Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань.

Габдрахманова Л.А., д.б.н., с.н.с., начальник Учебного управления ФГБОУ ВПО «Казанский государственный энергетический университет», г. Казань.

Работа получена 03.10.2011