

УДК 577.27

## ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К НАТИВНОЙ ДНК НА МОНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова

### Аннотация

Объектом исследования в работе явились ДНК-связывающие и ДНК-гидролизующие аутоантитела (ААТ) класса иммуноглобулинов G (IgG), титр которых повышен у больных аутоиммунным заболеванием (АИЗ) – системной красной волчанкой (СКВ). В литературе существуют противоречивые данные о происхождении, механизмах действия, биологической роли как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих ААТ класса IgG. Данные литературы свидетельствуют о том, что антитела к ДНК способны проникать в различные клетки и ядра, вызывая при этом морфологические и функциональные изменения клеток. Влияние антител на клетки организма зависит как от типа клеток, так и от свойств антител к ДНК. Нами показано, что антитела к нативной ДНК (нДНК) здорового донора и больного СКВ на стадии обострения *in vitro* оказывают сходное влияние на здоровые и патологические моноциты – снижают количество клеток и содержание белка в них, способствуют повреждению ДНК моноцитов. Антитела к нДНК больного СКВ в период ремиссии значимого влияния на клетки *in vitro* не оказывают. В статье обсуждаются возможные причины генерации патологических ААТ к нДНК класса IgG и их биологическая роль.

**Ключевые слова:** антитела к ДНК, иммуноглобулины G (IgG), абзимы, системная красная волчанка, моноциты.

### Введение

Аутоантитела к ДНК являются естественным компонентом иммунной системы, но в ряде случаев увеличиваются их патологические возможности, что приводит к развитию тяжелых воспалительных реакций в организме – аутоиммунным процессам [1, 2].

Системная красная волчанка (СКВ) – хроническое аутоиммунное заболевание соединительной ткани неизвестной этиологии [3, 4]. Предположительно, одной из причин развития СКВ является повышенное содержание в крови больных ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих аутоантител класса IgG [5–7]. Известно, что антитела к ДНК способны проникать в различные клетки и ядра человека и животных, вызывая при этом их морфологические и функциональные изменения [8–10]. Но до сих пор истинная роль как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих аутоантител в патогенезе СКВ до конца не выяснена.

Для исследования биологической роли антител (АТ) к нДНК нами выбраны моноциты, так как именно они могут являться индукторами воспалительного процесса, характерного для СКВ. От нормальной функциональной активности моноцитов (макрофагов) зависит способность иммунной системы к своевремен-

ному ответу на генетически чужеродные объекты, так как они являются компонентами антигенпрезентирующей системы, а также осуществляют процесс фагоцитоза. Моноциты способны элиминировать аутоагрессивные лимфоциты, старые, поврежденные и трансформированные клетки, тем самым предотвращая развитие онкологических и аутоиммунных заболеваний [11].

Целью работы – исследование влияния антител класса IgG к нативной ДНК на моноциты здорового человека и больного СКВ *in vitro*.

## 1. Материалы и методы

### 1.1. Выделение антител класса IgG к нативной ДНК из крови человека

В работе использовали 2 сыворотки крови клинически здоровых лиц, 4 сыворотки больных СКВ на стадии обострения и 5 сывороток больных СКВ в период ремиссии, полученные в стационарах г. Казани.

Все этапы очистки антител проводили по ранее разработанной методике [12] при температуре +4 °С в холодильной камере MiniColdlab с использованием стерильных буферных растворов, приготовленных на деионизованной воде. Положительно и отрицательно заряженные фракции антител класса IgG получали методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Антитела к нДНК выделяли методом аффинной хроматографии на нДНК-целлюлозе микрокристаллической. Полученные фракции АТ собирали, концентрировали струей воздуха, диализовали против 10 мМ трис-НС1-буфера, рН 7.5, с двукратной сменой в течение 72 ч при +4 °С. Концентрацию белка после каждого этапа очистки определяли методом Варбурга и Христиана [13].

### 1.2. Оценка ДНК-гидролизующей активности антител к нДНК

**1.2.1. Электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем нативную ДНК, в неденатурирующих условиях.** Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГе), содержащем нДНК, – один из наиболее эффективных методов выявления нуклеазной активности ферментов и абзимов (АБ).

Для электрофореза использовали 8%-ный разделяющий гель, содержащий 10 мкг/мл нативной ДНК эритроцитов цыплят [14].

**1.2.2. Гидролиз плазмидной ДНК рBR-322 аутоантителами к ДНК.** ДНК-гидролизующую активность полученных субфракций АТ к нДНК оценивали по превращению суперскрученной ДНК плазмиды рBR-322 в кольцевую и линейную формы [12], оценку результатов гидролиза плазмидной ДНК рBR-322 осуществляли методом электрофореза в агарозном геле [15].

### 1.3. Исследование влияния антител к нДНК на моноциты человека

**1.3.1. Выделение моноцитов из крови человека.** Моноциты из крови здорового донора и больного СКВ выделяли по стандартной методике центрифугированием через фиколл-верографин (плотность 1.077 мг/мл) с небольшими модификациями [16].

**1.3.2. Культивирование моноцитов в присутствии антител к нДНК.** Для исследования влияния аутоантител к нДНК к клеткам (10 тыс. кл./лунку), разведенным полной средой RPMI-1640 рН 7.4, добавляли АТ до конечной концентрации 10 мкг/мл (использовали антитела здорового человека, больных СКВ на стадии обострения и в период ремиссии).

Каждый опыт повторяли трижды. Клетки инкубировали в 96-луночном планшете (37 °С, 0.5% CO<sub>2</sub>) в течение 2 и 4 суток.

**1.3.3. Исследование общего количества, жизнеспособности и способности клеток к адгезии на пластике.** После культивирования инкубационную среду отбирали, дважды промывали лунки теплым фосфатно-солевым буфером (ФСБ) для того, чтобы полностью собрать все неприкрепившиеся клетки. Взвесь анализировали на общее количество и количество жизнеспособных клеток. Клетки, прикрепившиеся ко дну планшета, аккуратно отделяли от пластика оплавленным наконечником на льду и подсчитывали в камере Горяева с трипановым синим. Результаты выражали в процентах прикрепившихся ко дну планшета клеток от общего количества клеток в лунке.

**1.3.4. Определение концентрации клеточного белка.** Концентрацию белка в клетках определяли колориметрически методом Бредфорда. Результаты выражали в пикограммах белка в расчете на одну клетку исследуемой пробы [13].

**1.3.5. Определение количества потребления глюкозы моноцитами.** Концентрацию глюкозы в среде до и после инкубации клеток определяли колориметрическим глюкозоксидазным методом, используя стандартный коммерческий набор реагентов.

**1.3.6. Определение образования перекиси водорода моноцитами.** Концентрацию перекиси водорода, выделяемой моноцитами после инкубации, определяли колориметрически с использованием фенолового красного и пероксидазы хрена. Результаты выражали в пМ на одну клетку [17].

#### **1.3.7. Оценка уровня повреждения ДНК моноцитов.**

*1.3.7.1. Определение изменения молекулярной массы моноцитов.* Электрофорез ДНК моноцитов осуществляли согласно рекомендациям Т. Маниатиса [18] и Н.Н. Кузнецовой [15].

*1.3.7.2. Оценка уровня повреждения ядерной ДНК методом флуоресцентной спектрофотометрии.* Для оценки уровня повреждения ядерной ДНК измеряли интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-этидий бромид (ЭБ) [19].

За 100% принимали интенсивность флуоресценции ДНК контроля – моноцитов, инкубированных в присутствии ФСБ.

### **1.4. Статистическая обработка результатов**

Из полученных результатов вычисляли медиану, 95 и 5 перцентили [20], используя стандартный пакет Microsoft Excel.

## **2. Результаты исследований и их обсуждение**

Антитела (АТ) класса IgG к нДНК обнаруживаются в крови клинически здоровых людей, но их уровень значительно повышен при системной красной волчанке (СКВ) – аутоиммунном заболевании соединительной ткани неизвестной этиологии.

Данные литературы свидетельствуют о том, что популяция АТ класса IgG к нДНК гетерогенна и это, вероятно, является причиной противоречий в характеристике и биологической роли ДНК-гидролизующих и ДНК-связывающих АТ к нДНК при СКВ [21, 22]. Поэтому в данном исследовании нами использо-

ваны различные субфракции антител к нДНК, различающиеся по физико-химическим свойствам.

АТ к ДНК выделяли из сывороток крови здоровых доноров, больных СКВ в активной стадии заболевания и в период ремиссии. Из каждой сыворотки крови методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе были получены 2 фракции антител, различающиеся по заряду: основные (фракция I) и кислые (фракция II). Из каждой фракции методом аффинной хроматографии получали по 2 субфракции, различающиеся по сродству к нДНК-целлюлозе: субфракции а, элюированные 1 М NaCl, и субфракции б, элюированные с сорбента буфером Gly-HCl с pH 2.3.

Показано, что в процессе развития и протекания патологического процесса при СКВ играют значительную роль ДНК-гидролизующие аутоантитела класса IgG [6].

Принадлежность ДНК-гидролизующей активности выделенным антителам класса IgG была доказана методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем нативную ДНК, в неденатурирующих условиях. Данный метод позволяет не только разделить белки по молекулярной массе и заряду, но также детектировать зоны гидролиза ДНК и определить, какой именно белок проявляет нуклеазную активность.

При проведении электрофореза были использованы антитела здорового донора и больного СКВ после ионообменной хроматографии (фракция I и фракция II), предварительно прогретые в течение 45 мин при 57 °С для инактивации возможных примесей нуклеаз [23]. На рис. 1 представлены электрофореграммы геля, окрашенного бромистым этидием и Кумасси G-250. Антитела, выделенные из обеих исследуемых сывороток, принадлежат к классу иммуноглобулинов G (рис. 1, б).

Антитела к нДНК фракции II, в отличие от антител фракции I, имеют отрицательный суммарный заряд (pI до 7) [12], поэтому при электрофоретическом разделении скорость их движения в геле выше. Антитела, выделенные из сыворотки больного СКВ, расщепляют ДНК, иммобилизованную в геле, что приводит к появлению зон гидролиза нуклеиновой кислоты (рис. 1, а). Фракции антител здорового донора ДНК-гидролизующей активности не проявляют.

Поскольку ДНКазы I имеет молекулярную массу (Mr) 30 кДа, pI 3.5–4.3, ДНКазы II характеризуется Mr – 38 кДа, pI 5–7 [24], что является доказательством принадлежности ДНКазной активности патологическим антителам класса IgG больного СКВ.

При внесении антителами одноцепочечных разрывов в нативную суперскрученную ДНК наблюдается переход молекулы в открытую кольцевую форму. Двухцепочечные разрывы плазмиды pBR-322 приводят к образованию линейной формы молекулы ДНК.

Обнаружено, что АТ к ДНК, полученные из сыворотки крови больных СКВ, вносят преимущественно одноцепочечные разрывы, так как появление линейной формы ДНК не наблюдается (рис. 2). Из литературных данных известно, что патологические антитела к нДНК при аутоиммунных заболеваниях могут вносить как одноцепочечные [12, 25], так и двухцепочечные [26] разрывы в молекулу ДНК, что, вероятно, зависит от вида, стадии заболевания и индивидуальных особенностей организма человека [25, 27].

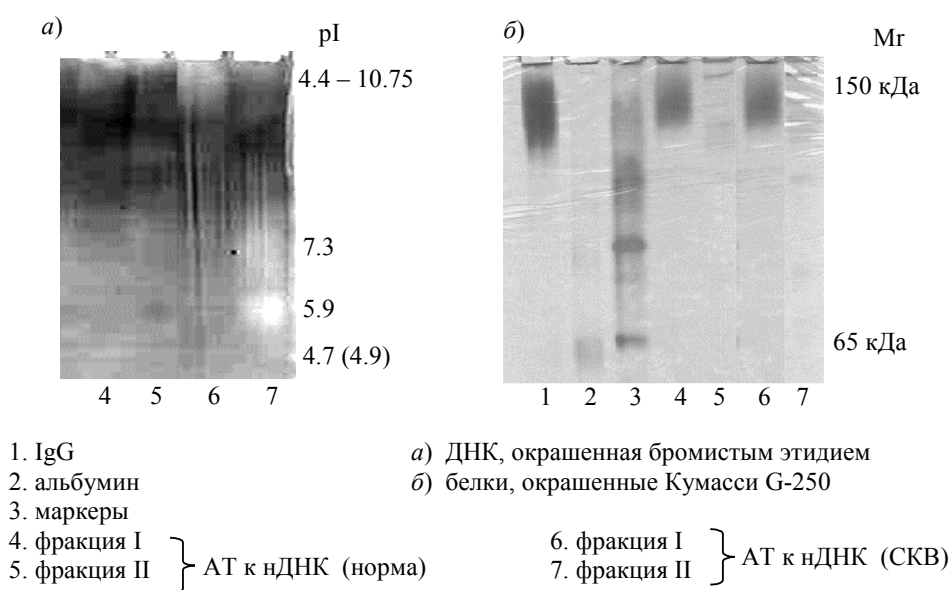


Рис. 1. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, содержащем нативную ДНК, в неденатурирующих условиях

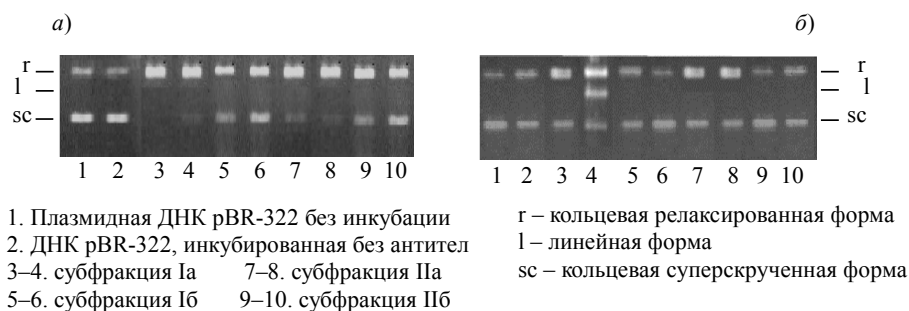


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов гидролиза ДНК pBR-322 антителами к нДНК, выделенными из сывороток крови пациентов СКВ: а) активная стадия заболевания, б) СКВ в период ремиссии

АТ к ДНК из сыворотки крови больных СКВ в период обострения проявляют высокую ДНКазную активность и практически полностью переводят нативную плазмидную ДНК в релаксированную форму (рис. 2, а).

АТ к ДНК из сыворотки крови больных в состоянии ремиссии субфракций а, элюированные 1М NaCl, обладают ДНК-гидролизующей активностью, внося как одноцепочечные, так и двуцепочечные разрывы, что, вероятно, зависит от пациента, а АТ к ДНК, элюированные буфером Gly-HCl с низким значением рН 2.3 проявляют более низкую ДНКазную активность по сравнению с субфракцией а того же пациента, либо вообще ее теряют (рис. 2, б).

В целом СКВ-антитела к ДНК в период ремиссии проявляют более низкую ДНКазную активность по сравнению с антителами активной стадии СКВ (рис. 2). Вероятно, во время ремиссии СКВ изменяется фракционный состав

ДНК-гидролизующих АТ, что приводит к снижению их патологических возможностей.

Перед инкубацией моноцитов в опытные образцы были добавлены выделенные антитела к ДНК здорового донора либо больных СКВ на стадии обострения и в период ремиссии. Контрольные образцы содержали: фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – отрицательный контроль; фитогемагглютинин (ФГА) – неспецифический стимулятор пролиферации клеток; антибиотик – рифамицин, ингибирующий синтез белка в клетках на стадии транскрипции за счет связывания с ДНК-зависимой РНК-полимеразой; ДНКазу I – фермент, осуществляющий фрагментацию ДНК на поздних этапах апоптоза [28, 29]; перекись водорода ( $H_2O_2$ ); компоненты системы, генерирующей гидроксил-радикал ( $OH^{\bullet}$ ) – активные формы кислорода (АФК) – для сравнения уровня активности антиоксидантной системы в здоровых и патологических клетках.

В качестве положительного контроля использовали сыворотку кролика с высоким титром ДНК-гидролизующих антител [30].

По истечении времени инкубации все образцы исследовались по нескольким показателям жизнедеятельности моноцитов:

- общее количество, количество жизнеспособных клеток и потребление моноцитами глюкозы за время инкубации как показатели уровня пролиферации или клеточного апоптоза;
- способность к адгезии на пластике – характерная особенность нормальных моноцитов; по данному критерию можно судить о жизнеспособности и изменениях в морфологии клеточной мембраны;
- выделение моноцитами перекиси водорода; повышение данного показателя свидетельствует об активации моноцитов;
- количество клеточного белка для характеристики интенсивности белкового метаболизма клетки;
- уровень и характер повреждения клеточной ДНК исследовали методами:
  - а) флуоресцентной спектрофотометрии.

Флуоресценция – испускание молекулой света, связанное с ее переходом между основным и возбужденным состояниями. Поскольку связывание ЭБ с двухнитевыми молекулами ДНК зависит от уровня спирализации молекулы полинуклеотида, указанное свойство ЭБ позволяет определить наличие разрывов в молекулах нуклеиновой кислоты. Образование разрывов в ДНК приводит к увеличению мест связывания ЭБ с молекулой нуклеиновой кислоты и усилению интенсивности флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК. Таким образом, флуоресценция ЭБ изменяется при индукции фрагментации ДНК (либо одонитевых повреждений) [19].

б) электрофореза геномной ДНК в агарозном геле для определения молекулярной массы и характера повреждения клеточной ДНК.

При исследовании влияния полученных антител к нДНК на *моноциты здорового человека* было показано, что в присутствии нормальных антител заметно снижается количество (рис. 3, а), жизнеспособность и потребление глюкозы моноцитами донора по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ), что особенно заметно для антител, смытых с сорбента 1 М NaCl.

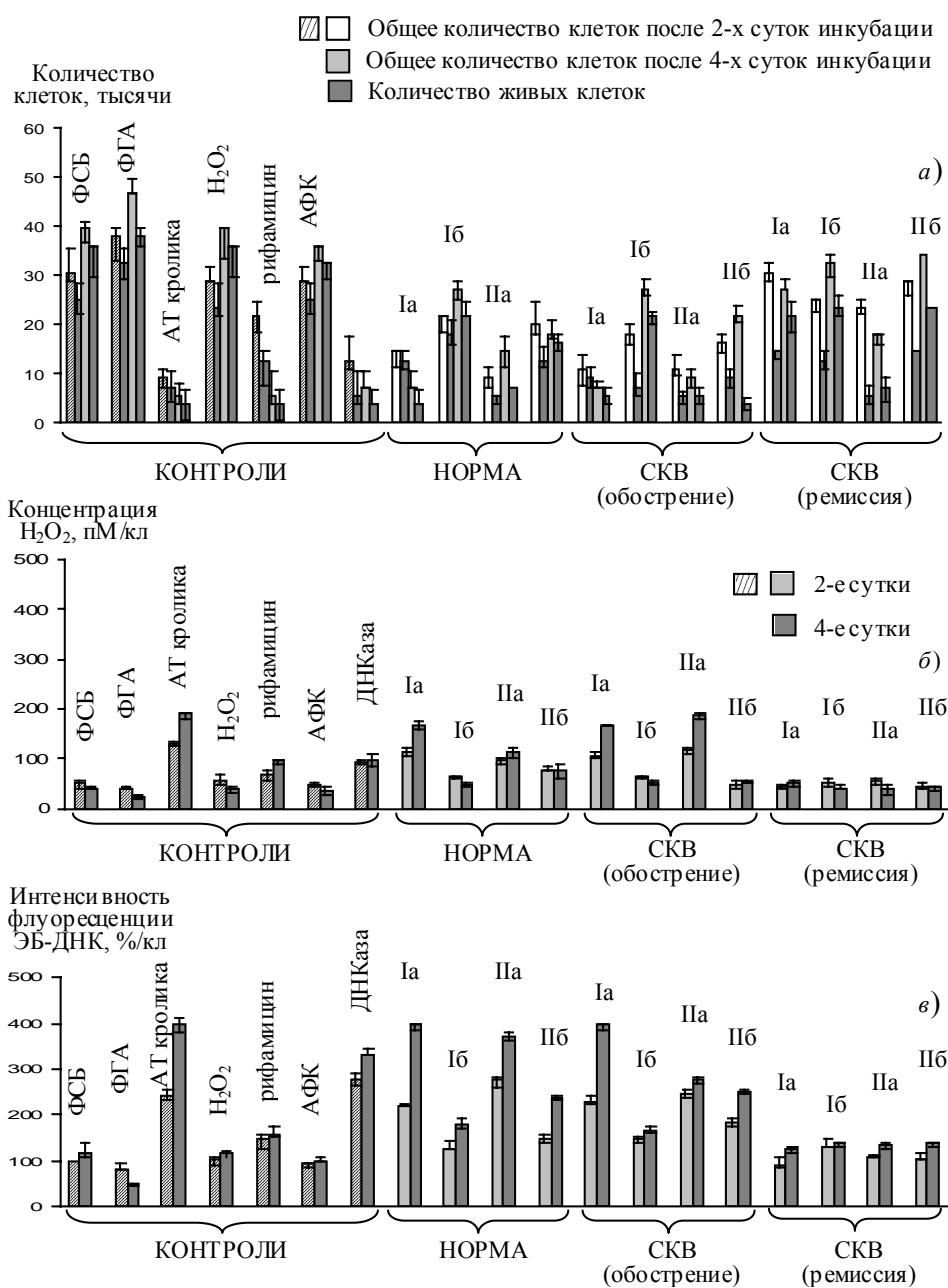


Рис. 3. Показатели жизнедеятельности и метаболизма моноцитов здорового человека при инкубации при 37 °С: а) общее количество и жизнеспособность; б) выделение перекиси водорода; в) уровень повреждения ДНК

Антитела больного СКВ на стадии обострения оказывают сходное с нормальными антителами и положительным контролем (сывороткой кролика) влияние на клетки здорового человека, но их воздействие в ряде случаев более выражено. При инкубации здоровых моноцитов с СКВ-антителами периода ремиссии наблюдается тенденция к уменьшению количества клеток, но в большинстве случаев результаты не отличаются от контроля.

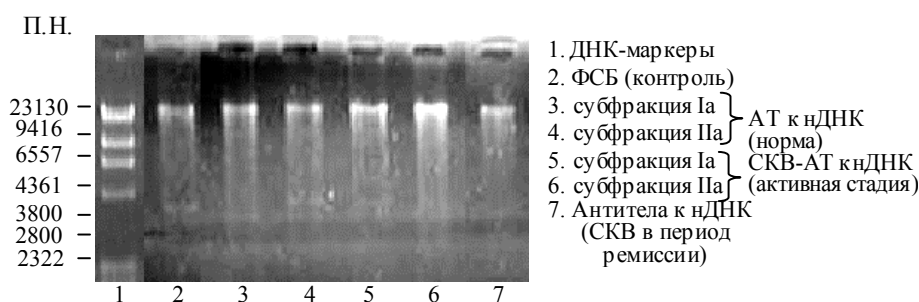


Рис. 4. Электрофоретический анализ ДНК моноцитов здорового человека после инкубации при температуре +37 °С

В присутствии нормальных антител клетки вырабатывают избыточное количество  $H_2O_2$  (рис. 3, б), что является свидетельством активации моноцитов.

Высокая интенсивность флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК в образцах, инкубированных с антителами клинически здорового человека, свидетельствует об образовании разрывов в ДНК (рис. 3, в). Вероятно, антитела донора способствуют повреждению клеточной ДНК перекисью водорода, которая в избытке образуется при их действии. Возможно, ААТ к нДНК способствуют окислительному разрушению ДНК, изменяя ее структуру и делая доступными для АФК сайты расщепления нуклеиновой кислоты [31, 32].

Как и в случае нормальных для антител больного СКВ на стадии обострения характерно усиленное выделение перекиси здоровыми клетками и высокий уровень повреждения клеточной ДНК. Наибольшие изменения показателей заметны при действии антител с высокой ДНК-гидролизующей активностью субфракций а. В присутствии же антител больного СКВ в период ремиссии показатели практически не отличаются от контроля.

Антитела здорового донора и больного СКВ в период обострения приводят к снижению количества белка в клетках. Поскольку данные образцы характеризуются высоким уровнем повреждения ДНК, низкое содержание белка можно считать вполне закономерным. В присутствии антител больного СКВ в период ремиссии после гормонального лечения синтез белка, как и остальные показатели, в целом остается практически на контрольном уровне.

Замечено, что способность здоровых моноцитов к адгезии на пластике в присутствии всех исследуемых препаратов снижена по сравнению с контролем, что, вероятно, связано со структурным изменением мембраны клеток.

Мы предполагаем, что антитела больного СКВ в период ремиссии после гормонального лечения, хоть и не оказывают заметного влияния на метаболизм клеток, связываются с компонентами мембраны и модифицируют ее, в результате чего у моноцитов снижается способность к адгезии. Возможно, дальнейшее лечение снимет и этот эффект патологических АТ.

Методом электрофореза в агарозном геле было обнаружено, что молекулярная масса выделенной ДНК моноцитов составляет 3.8–23.2 тыс. п. н. (рис. 4). Поскольку в присутствии антител здорового человека она не изменяется, а повреждения в ДНК наблюдаются, вероятно, нормальные АТ способствуют образованию одноцепочечных разрывов в ДНК.



В присутствии СКВ-антител стадии обострения заметно образование более низкомолекулярных фрагментов ДНК (2.8 тыс. п. н.). Это свидетельствует о том, что кроме внесения одноцепочечных разрывов высокоактивными ДНК-гидролизующими антителами, содержащиеся в препаратах ДНК-связывающие АТ к нДНК, могут способствовать образованию двуцепочечных разрывов в присутствии перекиси водорода или других активных форм кислорода, которые вырабатываются моноцитами после инкубации с антителами.

Полученные результаты снижения жизнеспособности клеток и высокого уровня повреждения геномной ДНК моноцитов под влиянием патологических антител к нДНК подтверждают литературные данные, свидетельствующие о наличии корреляции между цитотоксичностью и ДНК-гидролизующими свойствами аутоантител [10]. Вероятно, ДНК-гидролизующие антитела, внося повреждения в ДНК, способны индуцировать апоптоз клеток.

Из полученных данных можно сделать заключение – антитела из сывороток здорового донора и больного СКВ в активной стадии заболевания проявляют сходное действие на моноциты крови клинически здорового человека. Вероятно, повышение уровня в крови антител к ДНК может способствовать повреждению клеток иммунной системы и приводить к чрезмерному синтезу патологических антител к ДНК, в том числе с ДНК-гидролизующей активностью.

Аутоантитела к ДНК входят в нормальный пул антител, но в крови здоровых людей и животных их содержание намного ниже, чем при патологии, и в норме они обычно находятся в комплексе с другими заряженными биополимерами сыворотки или антиидиотипическими антителами [33, 34]. Видимо, поэтому в здоровом организме аутоантитела к нДНК не проявляют своих патологических возможностей.

В нашей работе были использованы свободные от иммунных комплексов антитела класса IgG в концентрациях, одинаковых как для здоровых людей, так и для пациентов СКВ.

Из полученных результатов сходного влияния на моноциты антител к нДНК здорового донора и больного СКВ в период обострения заболевания можно заключить, что патологические аутоантитела к нДНК могут происходить от натуральных аутоантител, но вопрос о причинах такого переключения на сегодняшний день остается открытым. Некоторые авторы предполагают, что нарушение в системе идиотип-антиидиотипического ингибирования активности натуральных аутоантител – одна из возможных причин усиления активности ААТ и развития аутоиммунного процесса [34].

Предположительно, механизм воздействия нормальных и СКВ-антител на ДНК может отличаться. Возможно, нормальные ДНК-связывающие антитела взаимодействуют с молекулой ДНК и изменяют ее конформацию, открывая сайты расщепления для активных форм кислорода, что может инициировать начало патологического процесса. В то же время патологические ДНК-гидролизующие антитела, проникая в клеточное ядро, повреждают геномную ДНК, способствуя развитию заболевания. Вероятно, в результате действия как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих аутоантител в организме повышается уровень клеточного апоптоза [10].

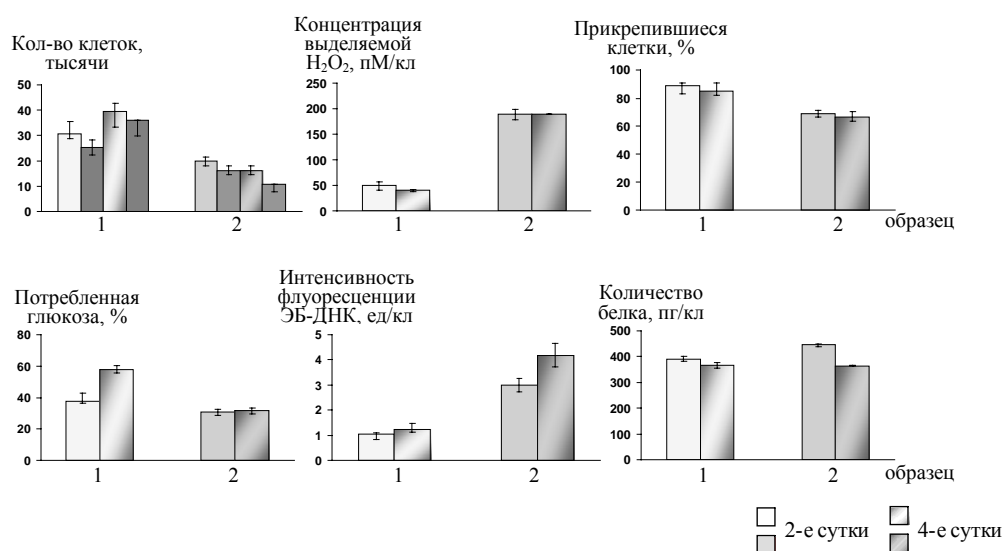


Рис. 5. Сравнение контрольных проб (ФСБ) моноцитов здорового человека и больного СКВ после инкубации при +37 °С: 1 – клетки здорового донора 2 – клетки больного СКВ

Антитела из сыворотки крови больного СКВ в период ремиссии практически не оказывают разрушительного воздействия на моноциты крови здорового человека и на внутриклеточную ДНК, что свидетельствует об эффективности гормонального лечения. Возможно, в период ремиссии происходит изменение структуры и свойств патологических аутоантител к ДНК, в результате чего снижается их ДНК-гидролизующая активность, и, вероятно, они теряют способность проникать в моноциты.

На втором этапе исследовали влияние антител на *моноциты больного СКВ*. При сравнении отрицательных контролей (ФСБ) показано, что метаболизм моноцитов здорового донора и больного СКВ заметно отличается (рис. 5).

Для СКВ-клеток характерна более низкая жизнеспособность, интенсивное выделение перекиси, более высокая степень разрушения ДНК, возрастающая к 4-м суткам инкубации и пониженная способность к адгезии на пластике. Не исключено, что патологические антитела к ДНК играют немаловажную роль в процессе развития СКВ, активируя моноциты к избыточному выделению активных форм кислорода.

При сравнении положительных контролей с отрицательным (ФСБ) было показано, что в присутствии митогена, неспецифического стимулятора активации клеток иммунной системы (ФГА), клетки больного СКВ делятся значительно медленнее, чем здоровые. Это заметно из результатов количества, жизнеспособности моноцитов и содержания клеточного белка. Предположительно, клетки больного СКВ находятся в активированном состоянии и уже не отвечают на действие стимуляторов.

Влияние ОН<sup>•</sup> на здоровые клетки не отличается значимо от контроля. Вероятно, при добавлении к клеткам ОН<sup>•</sup> реагирует с компонентами инкубационной среды и не оказывает воздействия на мембрану здоровых моноцитов вследствие нормального функционирования антиоксидантной системы клеток. Поскольку ОН<sup>•</sup> оказывает заметное влияние на моноциты больного СКВ, мы предполагаем,

что в патологических клетках в результате повреждений ДНК нарушена работа антиоксидантной системы. Как видно из результатов способности к адгезии, при патологии структура поверхности моноцитов больного СКВ изменяется, что может способствовать взаимодействию  $\text{OH}^\cdot$  с клеточной мембраной.

Сравнение влияния ДНКазы I на здоровые и моноциты больного СКВ показало, что фермент оказывает сходное воздействие на клетки как в норме, так и при патологии. Замечен высокий уровень повреждения ДНК, приводящий к усилению гибели клеток. По литературным данным, механизм разрыва ДНК абзимами и ДНКазой I, предположительно, сходен. Возможно, имеет место нуклеофильная атака гидроксил-ионом, активируемым  $\text{Mg}^{2+}$ . Но сайты абзимного гидролиза ДНК отличаются от сайтов для ДНКазы I и сывороточной ДНКазы [31, 35]. Не исключено, что абзимы к нДНК, как и специфические ДНКазы могут играть важную роль в клеточном апоптозе.

При использовании в качестве модели *клеток больного СКВ* было обнаружено, что антитела к ДНК оказывают сходное действие на здоровые и СКВ-моноциты. В присутствии нормальных антител и антител больного на стадии обострения у СКВ-моноцитов снижается количество и жизнеспособность (рис. 6, а), а также потребление глюкозы. Антитела больного СКВ в период ремиссии не оказывают значимого воздействия на СКВ-клетки.

Выделение перекиси и уровень повреждения ДНК моноцитов больного СКВ в присутствии нормальных и особенно СКВ-антител стадии обострения повышены с резким увеличением показателей к 4-м суткам инкубации (рис. 6, б, в). Действие СКВ-антител в период ремиссии значимо от контроля не отличается. Количество белка в клетках резко снижается при действии нормальных и антител активной стадии СКВ и не изменяется под действием антител к ДНК в период ремиссии.

Способность клеток к адгезии на пластике не снижается при действии почти всех исследуемых препаратов, а в ряде случаев даже повышается. Это, предположительно, может быть связано с тем, что мембрана патологических клеток имеет измененную структуру, и антитела к ДНК уже не оказывают на нее заметного воздействия.

Как показывают результаты, антитела к ДНК могут способствовать развитию и усилению патологического процесса.

Моноциты являются важным звеном иммунной системы человека, они защищают организм от генетически чужеродных объектов и способствуют элиминации аутореактивных лимфоцитов, поврежденных и трансформированных клеток. Нарушение функций моноцитов, повышение уровня их апоптоза приводит к усилению воспалительного процесса в результате повреждения тканей активными формами кислорода, снижению фагоцитоза, повышению содержания апоптотических телец и времени их циркуляции в кровотоке, что и наблюдается при СКВ. Рядом авторов показано, что нарушение фагоцитоза апоптотических телец приводит к увеличению их количества в организме, что может являться соответствующим фактором развития СКВ [36, 37]. Так как в процессе апоптоза клеток высвобождаются и/или иммобилизуются на поверхностной мембране значительные количества ядерных аутоантигенов (например, нуклеосом), накопление в организме апоптотических клеток может направлять иммунную систему к продукции ААТ к нДНК [38].

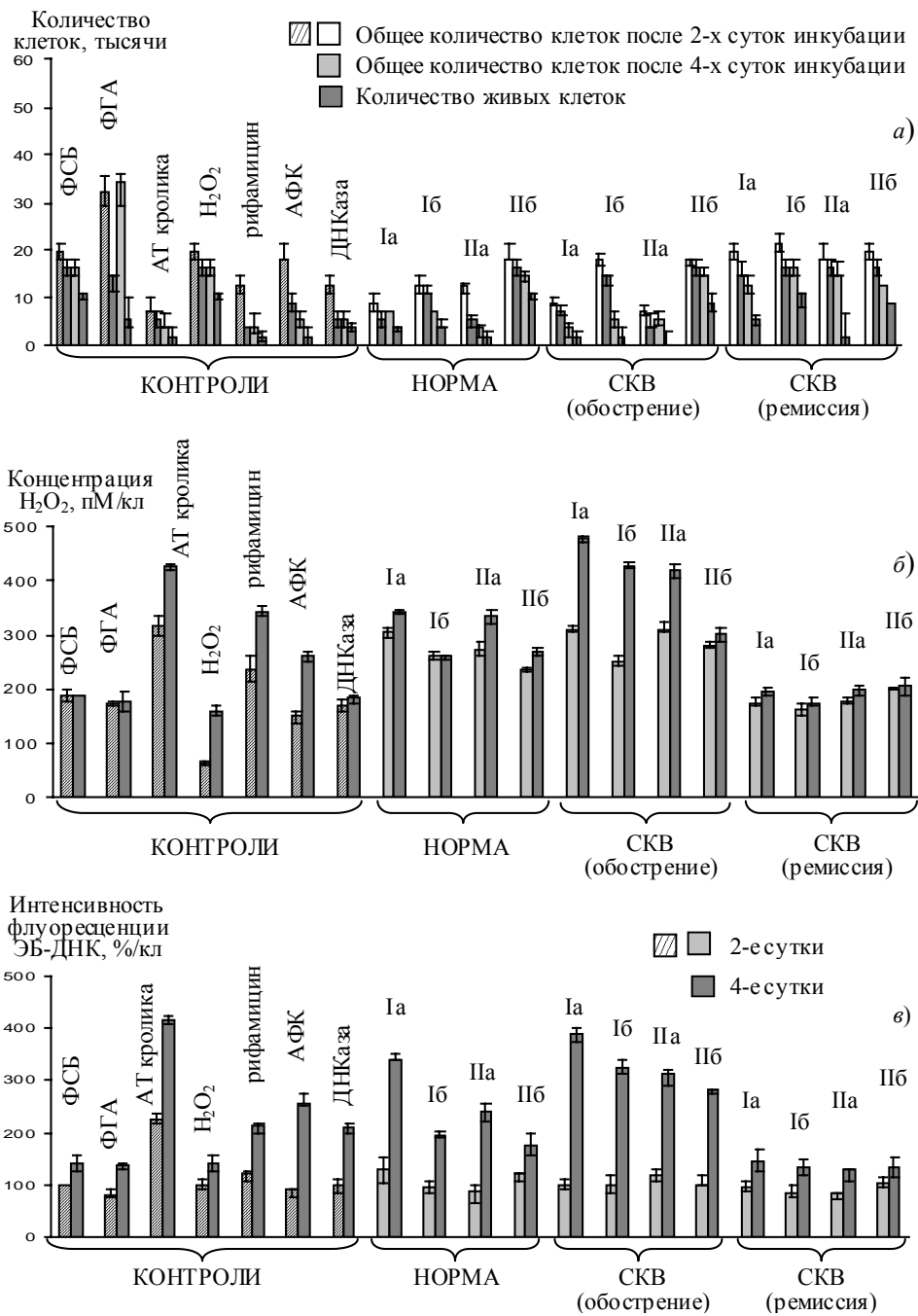


Рис. 6. Показатели жизнедеятельности и метаболизма моноцитов больного СКВ при инкубации при 37 °С: а) общее количество и жизнеспособность; б) выделение перекиси водорода; в) уровень повреждения ДНК

### Summary

*A.Z. Sabirzyanova, T.A. Nevzorova.* Influence of IgG Antibodies to Native DNA on Human Monocytes *in vitro*.

The work investigates DNA-binding and DNA-hydrolyzing autoantibodies (AAb) of a class immunoglobulins G (IgG), whose titer increase in the patients with the autoimmune disease – systemic lupus erythematosus (SLE). Current literature presents conflicting data about origin, mechanisms of action, biological role of both DNA-binding and DNA-hydrolyzing of IgG AAb. Source data states that antibodies to DNA are capable of penetrating different cells and their nuclei, and thus inducing morphological and functional changes in the cells. The influence of antibodies on cells of organism depends both on the type of cells and on properties of antibodies to DNA. It is shown that antibodies to native DNA (nDNA) of healthy donor and patient SLE at the stage of exacerbation *in vitro* have a similar effect on healthy and pathologic monocytes. Indeed, they reduce the quantity of cells and the content of protein in them and contribute to the damage DNA of monocytes. Antibodies to nDNA of the patient SLE into period of remission do not have significant influence on the cells of healthy person and patient SLE *in vitro*. The article discusses possible reasons for the generation of pathologic IgG AAb to nDNA and their biological role.

**Key words:** antibodies to DNA, immunoglobulins G (IgG), abzymes, systemic lupus erythematosus, monocytes.

### Литература

1. *Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L. et al.* Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals // *J. Immunol. Methods.* – 1998. – V. 216, No 1–2. – P. 117–137.
2. *Насонов Е.Л., Сура В.В.* Современные подходы к иммунологической диагностике аутоиммунных и иммунокомплексных болезней // *Территориальный архив.* – 1988. – № 6. – С. 144–150.
3. *Вершигора А.Е.* Общая иммунология. – Киев: Высш. шк. 1990. – 736 с.
4. *Mok C.C., Lau C.S.* Pathogenesis of systemic lupus erythematosus // *J. Clin. Pathol.* – 2003. – V. 56, No 7. – P. 481–490.
5. *Pisetsky D.S.* Antibody responses to DNA in normal immunity and aberrant immunity // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1998. – V. 5, No 1. – P. 1–6.
6. *Nevinsky G.A., Breuzov A.A., Baranovskii A.G. et al.* Effect of different drugs on the level of DNA-hydrolyzing polyclonal IgG antibodies in sera of patients with Hashimoto's thyroiditis and nontoxic nodal goiter // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – V. 7, No 2. – P. 201–211.
7. *Eilat D., Naparstek V.* Anti-DNA autoantibodies: a puzzle of autoimmune phenomena // *Immunol. Today.* – 1999. – V. 20, No 8. – P. 339–342.
8. *Koren E., Koscec M., Wolfson-Reichlin M. et al.* Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells // *J. Immunol.* – 1995. – V. 154, No 9. – P. 4857–4867.
9. *Reichlin M., Hahn B., Koren E.* Characterization of anti-dsDNA antibodies: cross-reaction with SnRNP polypeptides and cell-binding abilities // *The Immunologist.* – 1995. – V. 3, No 3. – P. 84–88.
10. *Kozyr A.V., Sashchenko L.P., Kolesnicov A.V. et al.* Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines // *Immunol. Lett.* – 2002. – V. 80, No 1. – P. 41–47.
11. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология / Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 581 с.

12. *Невзорова Т.А.* ДНК-гидролизующая активность антител к ДНК при системной красной волчанке: Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2005. – 170 с.
13. Практическая химия белка / Отв. ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 621 с.
14. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981. – 286 с.
15. *Кузнецова Н.Н., Винтер В.Г.* Методы генной инженерии. – М.: Биоинформсервис, 1997. – 180 с.
16. *Yang R., Kaplan M., Ray D. et al.* Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies // *Lupus*. – 2001. – V. 10, No 8. – P. 539–541.
17. *Pizato N., Bonatto S., Piconcelly M. et al.* Fish oil alters T-lymphocytes proliferation and macrophage responses in Walker-256 tumor-bearing rats // *Nutrition*. – 2006. – V. 22, P. 425–432.
18. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
19. *Анисимов А.Г., Болотников И.А.* Обработка синхронизированных клеток K562 тетрафторалюминатом не модулирует флуоресценцию бромистого этидия и 4,6-диамидино-2-фенилиндола при связывании с нуклеотидной ДНК // *Цитология* – 1999. – Т. 41, № 8. – С. 680–684.
20. *Акберова Н.И.* Описательная статистика. Интервальные оценки. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2004. – 40 с.
21. *Barbas S.M., Ditzel H.J., Saloneh E.M. et al.* Human autoantibody recognition of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – V. 92, No 7. – P. 2529–2533
22. *Foster M.H., Cizman B., Madaio M.P.* Biology of Disease. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, Mechanisms of immune deposition, and genetic origins // *Lab. Invest*. – 1993. – V. 69, No 5. – P. 494–507.
23. *Невзорова Т.А., Темников Д.А., Винтер В.Г.* Особенности ДНК-гидролизующей активности антител при системной красной волчанке // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68, Вып. 12. – С. 1616–1623.
24. *Барановский А.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А.* Дезоксирибонуклеазы человека // *Биохимия*. – 2004. – Т. 69, Вып. 6. – С. 725–742.
25. *Шустер А.М., Гололобов Г.Б., Кващук О.А., Габибов А.Г.* Антиидиотипические и природные каталитически активные антитела // *Мол. биол.* – 1991. – Т. 25, № 3. – С. 593–602.
26. *Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др.* ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусного гепатита // *Биохимия*. – 1997. – Т. 62, Вып. 12. – С. 1590–1599.
27. *Генералов И.И., Новиков Д.К.* Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение // *Усп. соврем. биол.* – 1998. – Т. 118, № 2. – С. 178–193.
28. *Yanase K., Smith R.M., Puccetti A. et al.* Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1 // *J. Clin. Invest*. – 1997. – V. 100, No 1. – P. 25–31.
29. *Madaio M.P., Yanase K.* Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implications and applications // *J. Autoimmun.* – 1998. – V. 11. – P. 535–538.
30. *Фахруллин Р.Ф., Винтер В.Г., Абрамова З.И. и др.* Наногравиметрический ДНК-биосенсор: формирование биорецепторной пленки и определение антител к ДНК // *Биомедицинские технологии и радиоэлектроника*. – 2006. – № 8–9. – С. 69–77.

31. *Kubota T., Watanabe N., Kanai Y., Stollar B.D.* Enhancement of oxidative cleavage of DNA by the binding sites of two anti-double-stranded DNA antibodies // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271, No 11. – P. 6555–6561.
32. *Watanabe N., Kubota T., Miyasaka N., Kanai Y.* Enhancement of hydroxyl radical DNA cleavage by serum anti-dsDNA antibodies in SLE // *Lupus.* – 1998. – V. 7, No 2. – P. 108–112.
33. *Сидорик Л.Л.* Белковый синтез и аутоиммунитет // *Биополимеры и клетка.* – 1992. – Т. 8, № 4. – С. 3–19.
34. *Лекаш И.В., Ротм Г.М., Поверенный А.М.* Гетерогенность и avidность аутоантител, реагирующих с ДНК // *Мол. биол.* – 1991. – Т. 25, № 5. – С. 1391–1399.
35. *Щуров Д.В.* Каталитические антитела // *Мол. биол.* – 1997. – Т. 31, № 1. – С. 5–15.
36. *Yang R., Kaplan M., Ray D. et al.* Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies // *Lupus.* – 2001. – V. 10, No 8. – P. 539–546.
37. *Walport M.J.* Lupus, DNase and defective disposal of cellular debris // *Nat. Genet.* – 2000. – V. 25, No 2. – P. 135–136.
38. *Lorenz H.-M., Herrmann M., Winkler T. et al.* Role of apoptosis in autoimmunity // *Apoptosis.* – 2000. – V. 5, No 5. – P. 443–449.

Поступила в редакцию  
21.02.08

---

**Сабирзянова Алсу Зуфаровна** – студент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: [Sabiralsou@mail.ru](mailto:Sabiralsou@mail.ru)

**Невзорова Татьяна Александровна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: [Tatyana.Nevzorova@ksu.ru](mailto:Tatyana.Nevzorova@ksu.ru)