

ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К ДНК НА КЛЕТКИ ЛИНИИ MDCK И ИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

© В. В. Иванова,¹ Т. А. Невзорова

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра биохимии, Казань;
¹ электронный адрес: jassyra@mail.ru*

Объектом исследования явились высокоочищенные методами жидкостной хроматографии антитела к ДНК класса IgG из сывороток крови здоровых доноров, а также больных системной красной волчанкой, ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом. Показано, что в зависимости от патологии антитела различаются по ДНК-гидролизующей активности и по-разному влияют на количество жизнеспособных клеток, их морфологию и конденсацию хроматина клеток линии MDCK после их совместного культивирования. Обнаружено, что антитела к ДНК в основном локализуются в ядре. Обсуждается возможная биологическая роль антител к ДНК.

Ключевые слова: антитела к ДНК, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, здоровые родственники, MDCK.

Принятые сокращения: РА — ревматоидный артрит, СКВ — системная красная волчанка, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунные заболевания, характеризующиеся повреждением различных органов и тканей. Клинические симптомы разнообразны, но почти всегда при СКВ происходит поражение почек, которое обычно является причиной смерти больного, а при РА — поражение суставов и кровеносных сосудов, что иногда приводит к нарушениям работы сердца — кардиоваскулиту (Palomino-Morales et al., 2010).

Антитела к ДНК в небольших количествах присутствуют и в организме здоровых людей, вероятно как регуляторный элемент иммунной системы, но для СКВ и РА характерен один из самых высоких уровней антител к ДНК класса IgG в крови. Причем уровень антител к ДНК коррелирует с периодами заболевания: перед обострением и в период активной стадии концентрация антител к ДНК возрастает, а в период ремиссии снижается. Следовательно, определение концентрации антител к ДНК в сыворотке крови позволяет своевременно менять тактику лечения. Однако у некоторых пациентов в состоянии ремиссии уровень антител повышен, а некоторые обостренные состояния характеризуются низкой концентрацией антител, близкой к состоянию нормы (Арлеевская и др., 2010). Известно, что антитела к ДНК могут обладать ДНК-гидролизующей активностью (Невинский и др., 2000; Невзорова и др., 2006; Kolthur-Seetharam et al., 2009; Mahe et al., 2009).

Причина генерации и биологическая роль антител в норме и при патологии как связывающих, так и гидролизующих ДНК не выяснены. Являются ли антитела к ДНК класса IgG одной из причин развития заболевания или его следствием, пока неизвестно. Большинство авторов

придерживаются мнения о том, что антитела к ДНК способствуют развитию аутоиммунных заболеваний (Невинский и др., 2000; Biesenbach et al., 2009). В зависимости от типа заболевания антитела к ДНК могут различаться по происхождению, а следовательно, и биологическим свойствам. В последних исследованиях показано, что они могут взаимодействовать с клетками организма и вызывать их разнообразные функциональные изменения, последствия которых тяжелы или летальны (Biesenbach et al., 2009; Palomino-Morales et al., 2010).

В настоящее время нет единого мнения о проникновении антител в живые клетки; мнения авторов разноречивые, а сами исследования проводятся в основном на моноклональных антителах к ДНК (Yanase et al., 1994; Yung, Chan, 2007).

Изучение взаимодействия антител с клеткой и внутриклеточными структурами позволит в дальнейшем своевременно выделять группы риска, предупреждать переход от нормы к патологии и проводить целенаправленную терапию аутоиммунных заболеваний, а также внесет фундаментальный вклад в понимание работы иммунной системы.

Популярным направлением современной медицинской биохимии является использование целевых антител, в том числе и к ДНК, как дополнительного агента к лекарственному препарату для его адресной доставки в клетки, а также внедрение непосредственно самих молекул антител в ту или иную систему органов человека (Backer et al., 2002). Дополнительные сведения о взаимодействии антител к ДНК с клеточной поверхностью и внутриклеточными структурами позволят в дальнейшем более объективно применять эту новую технологию — лекарства на основе антител.

Поэтому целью было исследование влияния и внутреклеточной локализации аффинно очищенных антител к ДНК, выделенных из сыворотки крови больных и здоровых лиц, на клетках линии MDCK *in vitro*.

Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: акрилекс Р-6 (Reanal, Венгрия), ДЭАЭ-целлюлоза и целлюлоза микрокристаллическая (Serva, Германия), бромистый этидий (Merk, Германия), среда RPMI-1640 и DMEM (GIBCO, Шотландия), плазмидная ДНК pBR-322 и ДНК/Hind III фага λ (Сибэнзим, Россия), нативная ДНК из эритроцитов цыплят (Reanal, Венгрия), DAPI (4',6-дiamino-2-фенилиндол) (BioVitrum, Россия), противовидовые антитела к IgG человека, меченные FITC (Beckman Coulter, США), набор антибиотиков для культивирования клеток (Serva, Германия), трипановый синий (Lachema, Чехия).

Объектом исследования были антитела к ДНК класса IgG, выделенные из сыворотки крови и очищенные методами жидкостной хроматографии: гель-фильтрации, ионообменной и аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе. Применение разработанной нами ранее методики (Невзорова и др., 2006) позволяет освободить гетерогенные антитела к ДНК класса IgG из иммунных комплексов (Невинский и др., 2000) и разделить их по суммарному заряду ионообменной хроматографией, а применение аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе — выделить обладающие высоким сродством к антигену антитела к ДНК. Все полученные препараты аффинно очищенных субфракций антител, согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноферментному анализу, являются IgG с мол. массой 150 кДа и взаимодействуют с ДНК (Невзорова и др., 2006). Использовали сыворотку крови лиц женского пола (по 6 в каждой группе): здоровых доноров, больных СКВ в активной стадии заболевания, больных СКВ на стадии ремиссии, больных РА и их близких клинически здоровых родственниц. Диагноз больных был установлен квалифицированными ревматологами Казанской государственной медицинской академии.

Гидролиз плазмидной ДНК pBR-322 аффинно очищенными антителами к ДНК осуществляли в реакционной смеси, содержащей 25 mM Трис-НС1-буфер, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM ЭДТА и 20 мкг/мл плазмидной ДНК pBR-322 (Невзорова и др., 2006). Известно, что антитела к ДНК прекрасно реагируют с ДНК не только эукариот, но и прокариот (Kimberly et al., 2006). Поэтому для оценки ДНК-гидролизующей активности использовали плазмидную ДНК pBR-322, у которой можно визуализировать даже единичный разрыв фосфодиэфирной связи за счет перехода суперскрученной формы ДНК pBR-322 в открытую кольцевую. Реакцию начинали добавлением антител до конечной концентрации 5 мкг/мл (Невзорова и др., 2006). Антитела предварительно инкубировали в течение 45 мин при 56 °C для инактивации возможных примесей нуклеаз. Контроль не содержал антител к ДНК. Пробы инкубировали в течение 24 ч при 37 °C. Результаты гидролиза плазмидной ДНК оценивали методом горизонтального электрофореза в 0.5%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием нуклеиновых кислот в растворе бромистого этидия и детекцией в проходящем ультрафиолете.

Влияние антител к ДНК на жизнеспособность клеток *in vitro* исследовали на перевиваемой клеточной линии MDCK (эпителия почки собаки), полученные из Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности — Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (Казань). Монослои MDCK сокультивировали совместно с антителами к ДНК в течение 2 и 4 сут при 37 °C и 5 % CO₂ в питательной среде, содержащей 20 % среды RPMI-1640, 70 % среды DMEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, прогретой при 56 °C в течение 45 мин, и набор антибиотиков. Сыворотки, содержащие антитела к ДНК, предварительно инкубировали при 56 °C в течение 45 мин для инактивации нуклеаз и белков комплемента и нормировали по белку до конечной концентрации 100 мкг/мл для моделирования условий, приближенных к *in vivo*. Отрицательный контроль: к монослою MDCK в свежей питательной среде добавляли равный объем раствора антител объем PBS (2 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.2 M NaCl, 8 mM NaHPO₄ · 2H₂O, pH 7.4).

После сокультивирования определяли общее количество и количество жизнеспособных клеток методом исключения трипанового синего на световом микроскопе Carl Zeiss (Jena, Германия) в камере Горяева.

Уровень повреждения и изменения конформации ядерной ДНК клеток после сокультивирования с антителами к ДНК оценивали по интенсивности флуоресценции комплекса ДНК хроматина с бромистым этидием на флуоресцентном спектрофотометре MPF-4 Hitachi (Япония). Известно, что бромистый этидий связывается только с нуклеиновыми кислотами и степень связывания зависит от суперспирализации молекул ДНК (Morgan, 2007).

К лизированным клеткам добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 4 мкг/мл (Анисимов, Болотников, 1999). Флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 490 нм, регистрировали при длине волны 610 нм. Изменение интенсивности флуоресценции выражали в %. За 100 % принимали интенсивность флуоресценции комплекса ДНК хроматина с бромистым этидием контрольных клеток MDCK, инкубированных с добавлением PBS.

Для выявления локализации аффинно очищенных антител к ДНК класса IgG в клетках MDCK после их сокультивирования в течение 4 сут (конечная концентрация антител подобрана экспериментально — 1 мкг/мл) покровные стекла с клетками промывали PBS, окрашивали DAPI (0.6 мкг/мл в PBS, содержанием 0.5 % Тритона X-100, в течение 10—15 мин) и отмывали PBS. Затем клетки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида на PBS в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали с противовидовыми антителами к IgG человека, мечеными FITC (FITC-антитела), в разведении 1 : 2000 в течение 2 ч во влажной камере, затем отмывали в PBS 2 раза по 10 мин. Образцы заключали в глицерин. Контроли: нефиксированные живые клетки, заключенные в глицерин; фиксированные клетки, сокультивированные с антителами или с PBS, не окрашенные флуоресцентными красителями; фиксированные клетки, сокультивированные с антителами или с PBS, обработанные либо DAPI, либо FITC-антителами.

Флуоресценцию регистрировали на флуоресцентном микроскопе LOMO МИКМЕД-2 (объектив Olympus, 60×, камера Carl Zeiss), используя соответствующие светофильтры. Флуоресценцию FITC возбуждали и регистри-

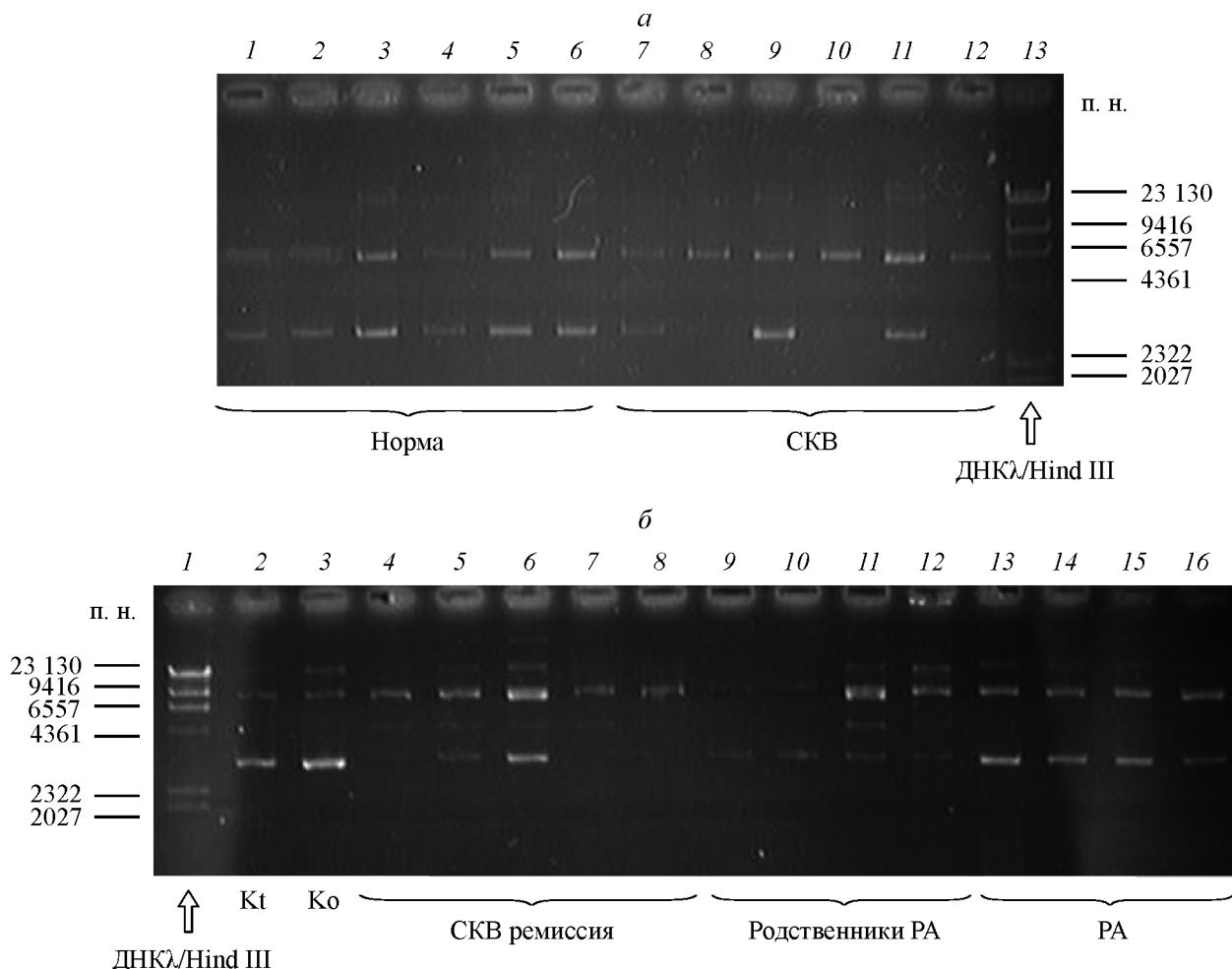


Рис. 1. Электрофореграммы плазмидной ДНК pBR-322 после инкубации с субфракциями аффинно очищенных антител к ДНК класса IgG.

а: 1—6 — здоровые доноры, 7—12 — больные СКВ в активной стадии заболевания, 13 — ДНК/HindIII фага λ (маркер). *б:* 1 — ДНК/HindIII фага λ , 2 (Kt) — плазмидная ДНК pBR-322, инкубированная без антител, 3 (Kо) — плазмидная ДНК pBR-322 до инкубации с антителами, 4—8 — больные СКВ на стадии ремиссии, 9—12 — здоровые родственники больных РА, 13—16 — больные РА; п. н. — пары нуклеотидов.

ровали при длинах волн 460—480 и 520—560 нм соответственно, флуоресценцию DAPI возбуждали и регистрировали при длинах волн 340—400 (360 нм в комплексе с ДНК) и 450—480 нм соответственно.

Так как данные имели выраженный эксцесс и асимметрию, для статистической обработки использовали непараметрические методы (Акберрова, 2004): вычисляли медиану, 95 и 5 перцентили, используя стандартный пакет Microsoft Excel. По непараметрическому критерию Стьюдента достоверных различий внутри субфракций аффинно очищенных антител, полученных методами поэтапной жидкостной хроматографии, не было, поэтому результаты объединяли по заболеваниям. Далее проводили обработку данных, используя непараметрический критерий Манна—Уитни ($P < 0.01$), для сравнения влияния антител на монослои MDCK на 2-е и 4-е сут сокульттивирования и относительно отрицательного контроля (PBS).

Результаты и обсуждение

ДНК-гидролизующая активность аффинно очищенных субфракций антител к ДНК, которые различаются по заряду и сродству

к антигену. На рис. 1, *а* представлена типичная электрофореграмма продуктов гидролиза плазмидной ДНК антителами здоровых доноров (*дорожки 1—6*). Так как форма ДНК pBR-322 после воздействия антител клинически здоровых доноров в целом не отличается от контролей Kt и Ko (рис. 1, *б*, *дорожки 2, 3*), следовательно, антитела не проявляют ДНК-гидролизующей активности.

Антитела к ДНК при СКВ в активной стадии заболевания приводят к образованию одноцепочечных разрывов в молекуле ДНК (рис. 1, *а*, *дорожки 8, 10, 12*), так как плазмидная ДНК pBR-322 из суперскрученной формы перешла в открытую кольцевую. Но действие антител варьирует от субфракции, т. е. от заряда и сродства к антигену, так как количество продуктов в дорожках различно (рис. 1, *а*, *дорожки 7—12*).

В случае антител к ДНК на стадии ремиссии СКВ (рис. 1, *б*, *дорожки 4—8*) ДНК pBR-322 переходит из суперскрученной не только в кольцевую, но и линейную форму, т. е. в молекуле ДНК происходят как одноцепочечные, так и двухцепочечные разрывы. Следовательно, антитела к ДНК на стадии ремиссии СКВ отличаются от антител в активной стадии заболевания по ДНК-гидролизующей активности и действие антител варьирует в зависимости от заряда и сродства к антигену, так как прои-

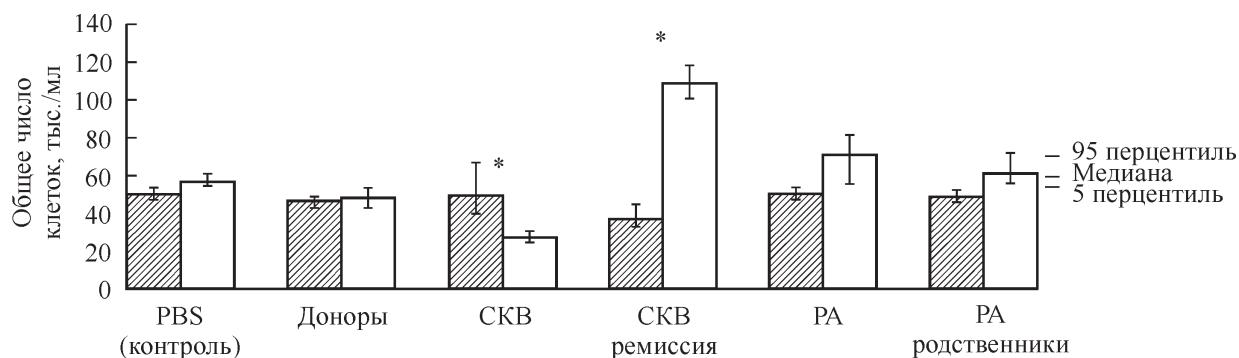


Рис. 2. Общее число клеток MDCK после их сокульттивирования в течение 2 (темные столбики) и 4 (светлые столбики) сут с антителами к ДНК сывороток крови: здоровых доноров, больных СКВ, больных РА и их здоровых родственников.

Звездочкой показано достоверное отличие числа клеток ($P < 0.01$) от контрольных клеток, культивированных с добавлением PBS (критерий Манна—Уитни).

ходят изменения в интенсивности флуоресценции продуктов гидролиза.

У антител при РА (рис. 1, б, *дорожки 13—16*) ДНК-гидролизующая активность слабая, сходная с контролями Kt и Ko и не зависит от субфракции антител, следовательно, ДНК-гидролизующая активность антител при РА и СКВ различна (рис. 1, а, *дорожки 7—12*).

Интересно, что антитела к ДНК родственников больных РА в зависимости от субфракции вносят в молекулу ДНК pBR-322 как одно-, так и двухцепочечные разрывы (рис. 1, б, *дорожки 9—12*), т. е. обладают сильной ДНК-гидролизующей активностью и различаются в зависимости от заряда и сродства к антигену, их действие отличается от действия антител как в норме, так и при патологии РА.

Таким образом, ДНК-гидролизующая активность антител варьирует в зависимости от аутоиммунной патологии и стадии заболевания. Наличие ДНК-гидролизующей активности у антител здоровых родственников больных РА может свидетельствовать об аутоиммунных процессах, происходящих в организме, что в свою очередь может рассматриваться как потенциальный маркер-предвестник развития заболевания.

Влияние антител к ДНК на количество и жизнеспособность клеток. Антитела в зависимости от патологии по-разному влияют на общее число и количество жизнеспособных клеток монослоя MDCK по-

сле их сокульттивирования (рис. 2, 3). Антитела к ДНК сывороток здоровых доноров по сравнению с отрицательным контролем PBS (рис. 3) способствуют достоверному снижению числа жизнеспособных клеток монослоя MDCK на 2-е сут сокульттивирования, следовательно, они могут вмешиваться в метаболизм клеток и влиять на пролиферацию.

Антитела к ДНК сывороток крови больных СКВ в активной стадии заболевания снижают общее число и долю живых клеток по сравнению с контролем PBS, что особенно проявляется на 4-е сут культивирования (рис. 2, 3).

Антитела больных СКВ на стадии ремиссии в целом снижают долю жизнеспособных клеток по отношению к контролю PBS, тогда как общее количество клеток увеличивается к 4-м сут сокульттивирования. Действие антител на клетки MDCK на стадии ремиссии СКВ отличается от действия антител в активной стадии заболевания. Возможно, гормональная терапия снижает негативное цитотоксическое действие антител на генетическом уровне, изменяя экспрессию антител с нуклеазной активностью плазматитами.

Антитела к ДНК больных РА в отличие от антител больных СКВ в активной стадии заболевания не обладают цитотоксичностью и не снижают жизнеспособности клеток (рис. 2, 3). Это, возможно, связано с различиями в происхождении антител к ДНК при данных заболеваниях.

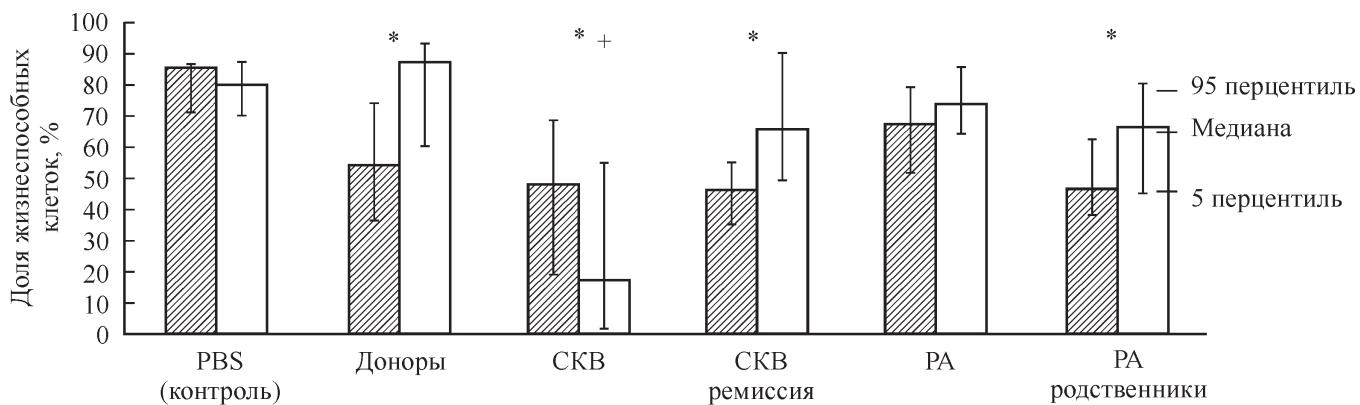


Рис. 3. Доля жизнеспособных клеток MDCK после сокульттивирования с антителами к ДНК сывороток крови в течение 2 (темные столбики) и 4 (светлые столбики) сут.

Знаком плюс показано достоверное различие ($P < 0.01$) между долями жизнеспособных клеток на 2-е и 4-е сут сокульттивирования (непараметрический критерий Стьюдента); звездочкой показана достоверность отличия данных ($P < 0.01$) от данных в контроле PBS (критерий Манна—Уитни).

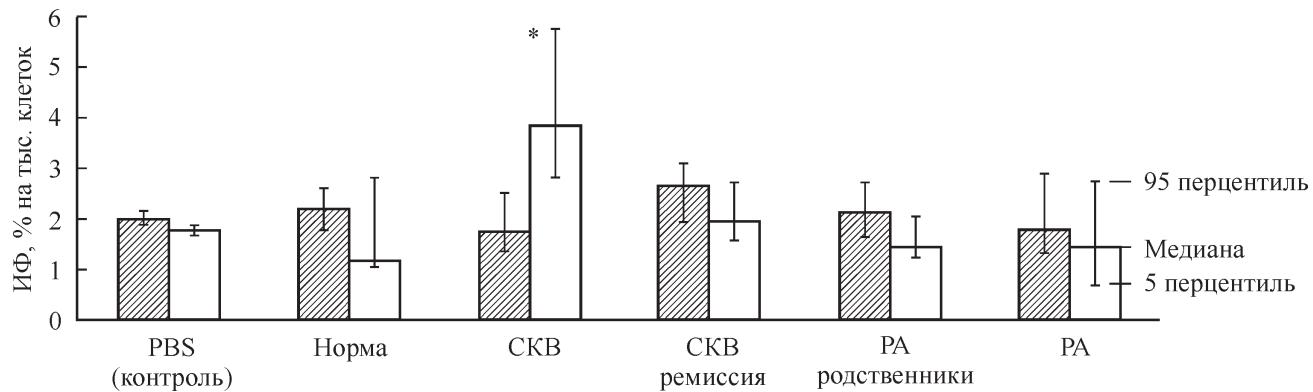


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции (ИФ) комплексов ДНК хроматина с бромистым этидием после сокультивирования клеток MDCK с антителами к ДНК сывороток крови в течение 2 (темные столбики) и 4 (светлые столбики) сут.

Звездочкой показано достоверное отличие ИФ ($P < 0.01$) от данных в контроле PBS (критерий Манна—Уитни).

Действие антител к ДНК здоровых родственников больных РА подобно действию антител при РА: появляется тенденция к увеличению общего количества клеток на 4-е сут сокультивирования относительно контроля PBS, но антитела родственников приводят к снижению доли жизнеспособных клеток.

Таким образом, антитела к ДНК выбранных групп больных и здоровых лиц обладают разной степенью цитотоксичности и могут по-разному вмешиваться в метаболизм и жизненный цикл клеток MDCK. Во всех случаях действие антител к ДНК на клетки может проявляться не сразу, а на 4-е сут сокультивирования. Вероятно, это связано с изменениями в метаболизме, вызванными антителами к ДНК, опосредованными сначала взаимодействием антител с мембраной клеток, инициацией сигнала в клетку и, вероятно, проникновением антител (Biesenbach et al., 2009).

Таким образом, влияние антител на жизнеспособность клеток зависит от патологии, возможно, наследственности, стадии заболевания и предложенной медикаментозной терапии.

Kozyg и соавтор. (Kozyg et al., 2002) при исследовании действия антител к ДНК на опухолевые клетки продемонстрировали наличие корреляции между цитотоксичностью и ДНК-гидролизующими свойствами антител к ДНК при СКВ. Авторами было показано, что цитотоксические антитела к ДНК, проникая в опухолевые клетки,

связывают хроматин и вызывают фрагментацию ДНК, что приводит к апоптозу клеток.

В некоторых исследованиях была показана избыточная пролиферация клеток почек, что также негативно скаживается на тканях, подверженных воздействию антител к ДНК при СКВ (Ruiz-Arguelles, Alarcon-Segovia, 2001). Например, отмечено, что некоторые антитела к ДНК в цитоплазме реагируют с ДНКазой 1 и ингибируют ее энзиматическую активность *in vitro* и *in vivo*, блокируя таким образом апоптоз и приводя к гиперклеточности клубочков почек (Yanase et al., 1994; Madaio et al., 1998). Следовательно, некоторые из антител к ДНК могут обладать перекрестной реактивностью к нуклеазам и (или) взаимодействовать с хроматином и ДНК, реализуя патологический потенциал и вызывая разнообразные морфологические и функциональные изменения клеток.

Влияние сывороточных антител к ДНК на хроматин клеток МДСК. Интенсивность флуоресценции ДНК хроматина клеток с бромистым этидием после сокультивирования с антителами к ДНК доноров, при ремиссии СКВ, РА и родственников больных РА не отличалась от интенсивности флуоресценции в контроле PBS (рис. 4). В случае антител при ремиссии СКВ это можно объяснить применением соответствующей терапии, но тем не менее следует отметить тенденцию к усилению интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем PBS.

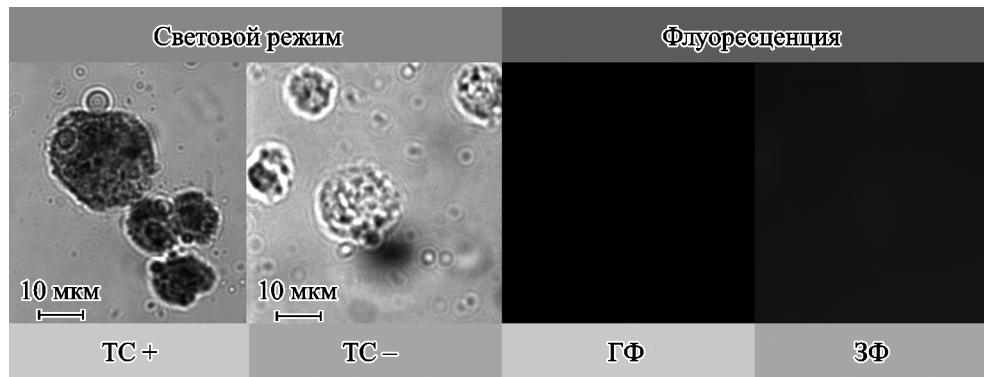


Рис. 5. Изображения нефиксированных клеток MDCK (контроль) в присутствии трипанового синего (ТС).

ГФ — голубая флуоресценция (520—560 нм, область DAPI), ЗФ — зеленая флуоресценция (450—480 нм, область FITC). ТС+ — погибшие окрашенные клетки; ТС — живые неокрашенные клетки. Об. 60×.

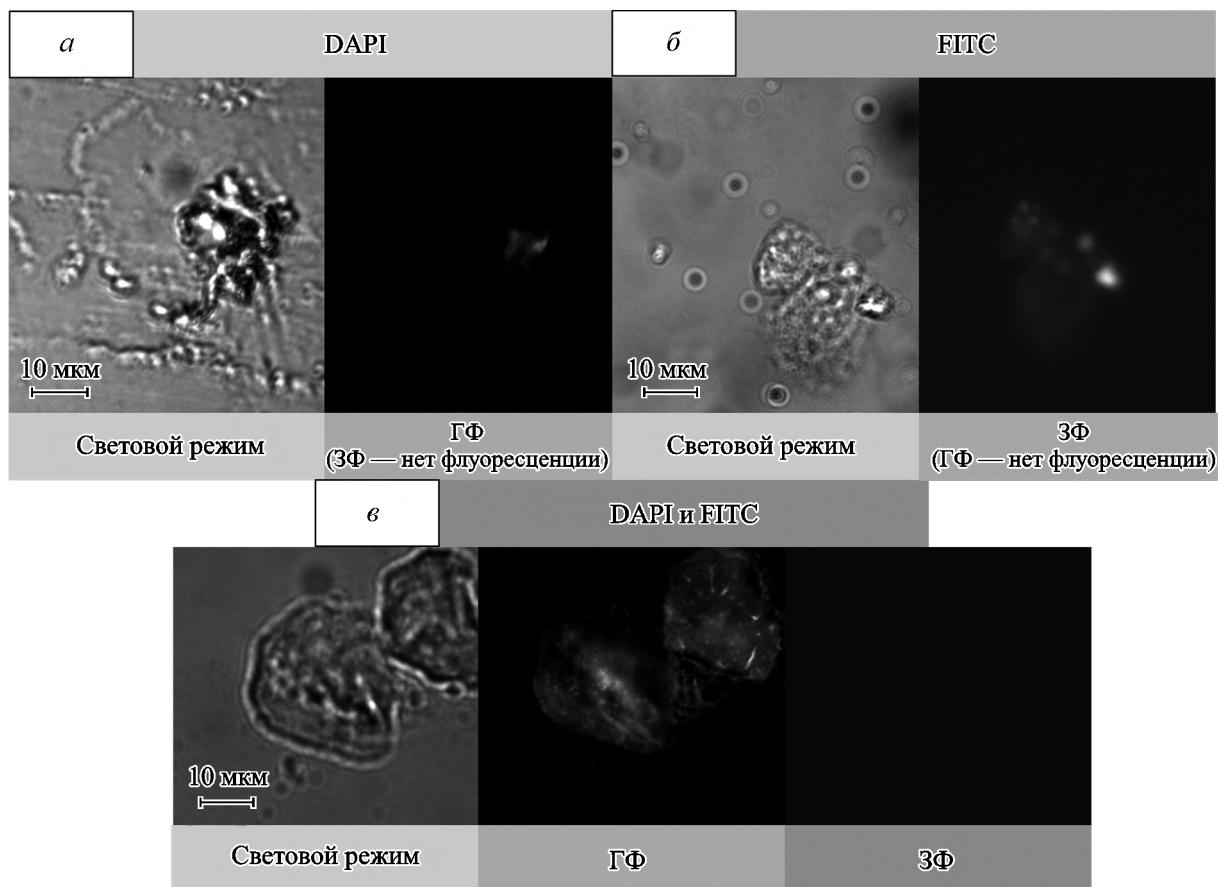


Рис. 6. Изображения фиксированных клеток MDCK, культивированных с добавлением PBS (контроль).

a — клетки, окрашенные DAPI; *б* — клетки, окрашенные FITC-антителами; *в* — клетки, окрашенные DAPI и FITC-антителами. ГФ — голубая флуоресценция (520—560 нм, область DAPI), ЗФ — зеленая флуоресценция (450—480 нм, область FITC). Об. 60×.

Антитела к ДНК при СКВ в активной стадии заболевания приводят к усилению флуоресценции комплексов ДНК хроматина клеток с бромистым этидием на 4-е сут сокульттивирования, т. е. происходит изменение конформации ДНК, что может быть связано с ДНК-гидролизующей способностью антител: в случае одноцепочных разрывов происходят деконденсация хроматина и усиление флуоресценции (рис. 4).

Отсутствие каких-либо изменений во флуоресценции комплексов ДНК хроматина с бромистым этидием в случае с антителами при РА коррелирует с отсутствием цитотоксичности этих антител и гидролиза ими плазмидной ДНК pBR-322, что свидетельствует о другой биологической роли антител к ДНК при РА, отличной от антител к ДНК при СКВ.

Антитела родственников больных РА с ДНК-гидролизующей активностью не приводят к изменению интенсивности флуоресценции ДНК хроматина в комплексе с бромистым этидием относительно контроля PBS (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют о совершенно иных механизмах влияния антител родственников на монослой MDCK *in vitro*.

Локализация антител к ДНК в клетках MDCK. Автофлуоресценции в области FITC и DAPI контролльных клеток, инкубированных в присутствии PBS, не наблюдали (рис. 5). Клетки, окрашенные только DAPI, не флуоресцируют в области FITC. При окрашивании клеток только вторичными FITC-антителами клетки

не флуоресцировали в области DAPI. В контрольных клетках, окрашенных двумя красителями, флуоресцировал только DAPI. Следовательно, отсутствует неспецифическое связывание FITC-антител с внутриклеточными структурами (рис. 6).

Ввиду того что различий по влиянию субфракций антител к ДНК в группах на исследуемые параметры клеток не наблюдали, представлены типичные данные по группам заболеваний и донорам. В морфологии клеток и распределении ядерного материала после их сокульттивирования с антителами к ДНК обнаружены различия между исследованными группами (рис. 7). Антитела к ДНК здоровых доноров (рис. 7, норма) не приводили к каким-либо заметным морфологическим различиям клеток от контроля PBS.

Клетки, сокульттивированные с антителами к ДНК при СКВ в активной стадии заболевания, имели неровную форму, быстрее подвергались действию фиксирующих агентов по сравнению с клетками, сокульттивированными с антителами доноров (рис. 7, СКВ-АС).

Клетки после сокульттивирования с антителами к ДНК при ремиссии СКВ морфологически, по интенсивности и локализации флуоресценции были сходны с клетками после культивирования с антителами к ДНК доноров. Следовательно, гормональная терапия снижает биологический эффект антител при патологии на монослои клеток MDCK (рис. 7, СКВ-Р).

Антитела к ДНК больных РА и их родственников по-разному повлияли на морфологию клеток. В случае

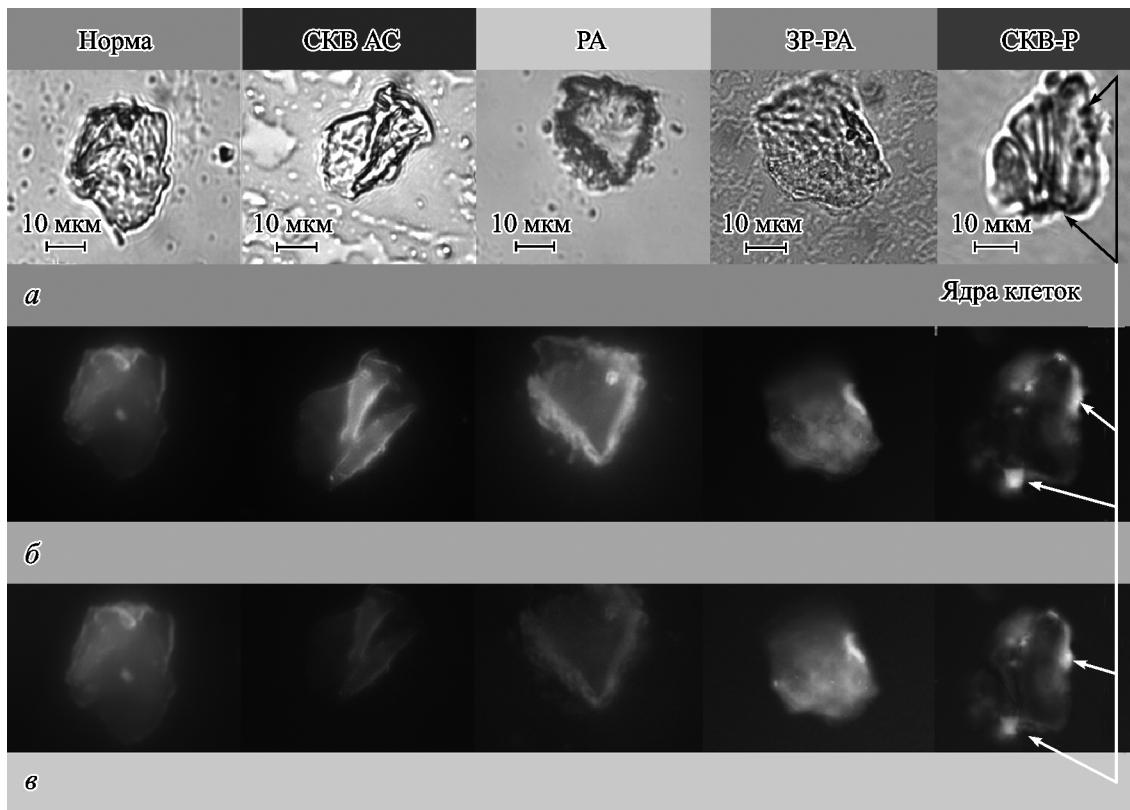


Рис. 7. Изображения фиксированных клеток MDCK после сокульттивирования с аффинно очищенными антителами к ДНК. *a* — световой режим, *b* — область флуоресценции DAPI (520—560 нм), *c* — область флуоресценции FITC (450—480 нм). Норма — клинически здоровые доноры; СКВ-АС — СКВ, активная стадия заболевания; ЗР-РА — здоровые родственники больных РА; СКВ-Р — СКВ, ремиссия заболевания. Стрелками показаны ядра клеток. Об. 60×.

сокульттивирования монослоя MDCK с антителами к ДНК при РА клетки имели неровную форму и плохо прикреплялись к стеклу, как и в случае с СКВ. В клетках с антителами к ДНК родственников РА наблюдалась пересортировка хроматина и развитие многочисленных оформленных и диффузных ядерных включений различной плотности, что свидетельствует о разрушении ядерной мембраны. Это можно объяснить высокой ДНК-гидролизующей активностью антител родственников больных РА. Следовательно, родственники больных РА предрасположены к аутоиммунным патологиям, и механизм работы иммунной системы отличается от клинически здоровых людей (рис. 7, РА и ЗР-РА).

Так как наибольшая интенсивность флуоресценции как FITC, так и DAPI проявляется в области ядер, можно считать, что антитела к ДНК и доноров, и больных аутоиммунными заболеваниями проникают внутрь клеток MDCK и локализуются в области ядер клеток. Замечено, что в случае антител больных РА флуоресценция наблюдается и в области цитоплазмы, что может свидетельствовать о расположении антител как на клеточной поверхности, так и в самой цитоплазме. Это может означать, что антитела к ДНК могли вмешаться в жизненный цикл и метаболизм клеток (в отличие от контроля с PBS).

Таким образом, антитела к ДНК класса IgG в зависимости от типа аутоиммунной патологии, свойств и ДНК-гидролизующей активности оказывают различное действие на клетки MDCK, проникают внутрь клеток, где локализуются в области ядер.

Рядом авторов (Koren et al., 1995; Reichlin et al., 1995) были проведены исследования моноклональных антител к ДНК СКВ-моделей мышей и крыс. Авторами показано, что некоторые антитела при патологии СКВ, связываясь с рецепторами цитоплазматической мембрany, остаются на поверхности клеток, что может приводить к нарушению функций клеточной мембрany и (или) активации комплемента с последующим лизисом клеток-мишеней (комплементзависимой цитотоксичности). Другие антитела к ДНК проникают в клетки и связываются с цитоплазматическими или (и) ядерными структурами.

Результаты других исследователей (Yanase et al., 1994; Madaio et al., 1998) показали, что проникновение СКВ-антител в клетку инициируется белком с мол. массой 110 кДа, который был идентифицирован как миозин 1. Позже обнаружили другой белок с мол. массой 50 кДа — калретикулин, с которым также могут взаимодействовать антитела, проникающие в клетки (Seddiki et al., 2001).

Некоторые исследователи (Koren et al., 1995; Chan, Cheng, 1997) продемонстрировали, что для прохождения в клетку одних антител к ДНК необходимо их связывание с ДНК, находящейся на поверхности клеток, тогда как для других антител ДНК клеточной поверхности не важна, поскольку при обработке поверхности клеток ДНК-зай антитела не утрачивают способности проникать внутрь клеток.

Антитела к ДНК, преодолев цитоплазматическую мембрану, могут локализоваться в эндосомах, рибосомах, комплексе Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме,

рибосомах, ядерных порах и в ядре (Yanase et al., 1994). Авторы предположили, что после проникновения в клетку антитела связываются с комплексом пор на мемbrane ядра, где солокализуются с белками миозином-1 и кавеолином в кавеоле, что сопутствует проникновению их в ядро и связыванию с ДНК хроматина (Yanase, 1994).

С помощью меченого фрагмента (scFv) 3D8 моноклональных антител к ДНК при СКВ было выявлено, что проникновение антител происходит с помощью эндоцитоза липидной кавеолы (Jang et al., 2009). Авторы показали, что фрагмент 3D8 стабилизировал активность нуклеазы, которая гидролизовала клеточные РНК, главным образом матричные, в конечном счете вызывая апоптоз и некроз клеток.

Проникшие в клетку СКВ-антитела к ДНК могут влиять на внутриклеточные процессы и клеточный цикл. Например, показано, что антитела ингибируют транскрипцию, трансляцию, ферментативную активность, транспорт белков в ядро, митоз, апоптоз, трансформацию клеток. Некоторые антитела *in vitro* ингибируют синтез ДНК и РНК, тогда как другие, усиливая синтез ДНК, не влияют на синтез РНК (Kozyr et al., 2002).

Вопрос о перекрестной активности антител пока до конца не выяснен и будет являться предметом дальнейших исследований. Возможно, некоторые антитела к ДНК вмешиваются в метаболизм благодаря своей перекрестной реактивности, например к ДНКазе 1, и, ингибируя ее энзиматическую активность, блокируют апоптоз, как показано на гломелулярных клетках в случае антител при СКВ (Yanase et al., 1994; Madaio et al., 1998). Показано, что СКВ-антитела к ДНК взаимодействуют с ядерным рибонуклеопротеином A2 (hnRNP), который принимает участие в процессах транскрипции, трансляции и экспрессии генов (Sun et al., 2003). Связывание антител с hnRNP A2 увеличивает его метилирование протеин-аргинин-метил-трансферазой 1, что может приводить к изменению экспрессии генов цитокинов и развитию аутоиммунных заболеваний.

Нами было проведено комплексное исследование с использованием поликлональных антител к ДНК класса IgG, что приближает модельную систему к условиям *in vivo*, так как поликлональные антитела в целом могут обладать большей перекрестной реактивностью (Sun et al., 2003; Yung, Chan, 2007; Арлеевская и др., 2010). Мы провели сравнительный анализ антител к ДНК в зависимости от патологии и в группе риска, оценили способность антител влиять на клетки линии MDCK и визуализировали их ядерную локализацию в клетках. Полученные данные указывают на вклад антител к ДНК в развитие и течение РА и СКВ.

Авторы выражают благодарность ревматологам ЦНИЛ Казанской государственной медицинской академии и А. В. Яковлеву (Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского университета).

Список литературы

- Акберова Н. И. 2004. Сравнение данных. II. Непараметрические критерии значимости. Казань: Изд-во КГУ. 50 с.
- Анисимов А. Г., Болотников И. А. 1999. Обработка синхронизированных клеток K562 тетрафторалюминатом не модулирует флуоресценцию бромистого этидия и 4,6-диамино-2-фенилиндола при связывании с нуклеоидной ДНК. Цитология. 41 (8) : 680—684.
- Арлеевская М. И., Габдулхакова А. Г., Цибулькин А. П. 2010. Диагностические и прогностические маркеры ревматоидного артрита с точки зрения патофизиолога. Казань: Шип. 128 с.
- Невзорова Т. А., Винтер В. Г., Коновалова О. А., Салахов М. Х. 2006. Механизм действия ДНК-гидролизующих АТ к ДНК из крови пациентов с системной красной волчанкой. Биохимия. 71 (11) : 1238—1246.
- Невинский Г. А., Канышкова Т. Г., Бунева В. Н. 2000. Природные катализитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. Биохимия. 65(11) : 1473—1487.
- Backer M. V., Aloise R., Przekop K., Stoletov K., Backer M. J. B. 2002. Molecular vehicles for targeted drug delivery. Bioconjugate Chem. 13 : 462—467.
- Biesenbach P., Schmalzien S., Smolen J. S., Hörl W. H., Derfler K., Stummvoll G. H. 2009. Immunoadsorption in SLE: three different high affinity columns are adequately effective in removing autoantibodies and controlling disease activity. Atherosclerosis Suppl. 10 : 114—121.
- Chan T. M., Cheng K. P. 1997. Identification of endothelial cell membrane proteins that bind anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus by direct or indirect mechanisms. Autoimmun. 10 : 433—439.
- Jang J. Y., Jeong J. G., Jun H. R., Leeb S. C., Kimc J. S., Kimd Y. S., Kwona M. H. 2009. A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity. Cell. Mol. Life Sci. 66 : 1985—1997.
- Kimberly Hamilton J., Georg Schett, Reich Charles F., Josef Smolen S., Pisetsky David S. 2006. The binding of sera of patients with SLE to bacterial and mammalian DNA. Clin. Immunol. 118 : 209—218.
- Kolthur-Seetharam Pradeepa U., Gupta N., Narayanaswamy R. 2009. Spatiotemporal organization of AT- and GC-rich DNA and their association with transition proteins TP1 and TP2 in rat condensing spermatids. Histochem. Cytochem. 57 : 951—962.
- Koren E., Koscec M., Wolfson M., Reichlin M. 1995. Murine and human antibodies to native DNA that cross-react with the A and D SnRNP polypeptides cause direct injury of cultured kidney cells. Immunol. 154 : 4857—4864.
- Kozyr A. V., Sashchenko L. P., Kolesnikov A. V., Zelenova N. A., Khaidukov S. V., Ignatova A. N., Bobik T. V., Gabibov A. G., Alekberova Z. S., Suchkov S. V., Gnuchev N. V. 2002. Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines. Immunol. Lett. 80 : 41—47.
- Madaio M. P., Yanase K., Foster M. H., Smith R. M., Emmons T. K., Fabbi M., Puccetti A., Jarett L. 1998. Nuclear localizing of antibodies. Novel insights into protein traslocation and cellular function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 815 : 263—266.
- Mahe B., Vogt A., Liard C., Duffy D., Abadie V., Bonduelle O., Boissonnas A., Sterry W., Verrier B., Blume-Peytavi U., Combadiere B. 2009. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. J. Invest. Dermatol. 129 : 1156—1162.
- Moran Laurence A. 2007. Ethidium bromide binds to DNA. <http://sandwalk.blogspot.com/2007/07/ethidium-bromide-binds-to-dna.html>.
- Palomino-Morales R., Gonzalez-Juanatey C., Tomas R., Vazquez-Rodriguez L. 2010. A1298C polymorphism in the MTHFR gene-predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Therapy. 10 : 1186—1189.
- Reichlin M., Hahn B., Koren E. 1995. Characterization of anti-dsDNA antibodies: cross-reaction with SnRNP polypeptides and cell-binding abilities. Immunologist. 3 : 84—88.
- Ruiz-Arguelles A., Alarcon-Segovia D. 2001. Novel facts about an old marker: the LE cell. Clin. Lab. Invest. Scand. J. 61 : 31—37.
- Seddiki N., Nato F., Lafaye P., Amoura Z., Charles Piette J. Claude Mazié J. 2001. Calreticulin, a potential surface receptor involved in cell penetration of anti-DNA antibodies. Immunology. 166 : 6423—6429.

Sun K. H., Tang S. J., Wang Y. S., Lin W. J., You R. I. 2003. Autoantibodies to dsDNA cross-react with the arginine-glycine-rich domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (hnRNP A2) and promote methylation of hnRNP A2. *Rheumatology*. 42 : 154—161.

Yanase K., Smith R. M., Cizman B. 1994. A subgroup of murine monoclonal anti- deoxyribonucleic acid antibodies traverse the

cytoplasm and enter the nucleus in a time- and temperature-dependent manner. *Lab. Invest.* 71 : 52—60.

Yung S., Chan T. M. 2007. Mycophenolic acid reduces anti-DNA antibody binding and cytokine secretion in renal proximal tubular epithelial cells — implications in lupus nephritis. *Suppl. 16* : 46—47.

Поступила 20 II 2012

INFLUENCE OF ANTIBODIES TO DNA ON MDCK CELLS AND THEIR INTRACELLULAR LOCALIZATION

V. V. Ivanova,¹ T. A. Nevzorova

Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology,

Department of Biochemistry, Kazan;

¹ e-mail: jassyra@mail.ru

Objects of the study were highly purified by liquid chromatography antibodies to DNA (IgG class) from the blood serums of healthy donors, patients with systemic lupus erythematosus (SLE) or rheumatoid arthritis (RA), and clinically healthy relatives of RA patients. It has been shown that, depending on the pathology, these antibodies differ in the DNA-hydrolyzing activity and differently affect the number of viable cells, morphology and chromatin of MDCK cells after co-culture. The antibodies to DNA were located in the area of nuclei. Biological role of the antibodies to DNA is discussed.

Key words: antibodies to DNA, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, healthy relatives, MDCK.