

## АНТИТЕЛА К ДНК СТИМУЛИРУЮТ ГИБЕЛЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ IN VITRO

© А. З. Гаврилова, Т. А. Невзорова<sup>1</sup>

*Институт фундаментальной медицины и биологии  
Казанского (Приволжского) федерального университета;  
<sup>1</sup> электронный адрес: TNezvorova@mail.ru*

Показано, что поликлональные антитела класса IgG к нативной ДНК приводят к повышению уровня апоптоза мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*. Обсуждается возможная биологическая роль антител к ДНК.

**Ключевые слова:** антитела к ДНК, системная красная волчанка, апоптоз.

**Принятые сокращения:** АТ — антитела, нДНК — нативная ДНК, СКВ — системная красная волчанка, ФСБ — фосфатно-солевой буферный раствор, PI — пропидия иодид.

Системная красная волчанка (СКВ) — хроническое системное аутоиммунное заболевание с неясной этиологией. Повышение уровня антител к нативной ДНК класса IgG (IgG-АТ к нДНК) в крови больных СКВ является одним из диагностических критериев данного заболевания.

В ряде работ показано, что активность СКВ не всегда коррелирует с уровнем АТ к ДНК (Villalta et al., 2003; Becker-Merok et al., 2006). Следовательно, не только уровень, но и свойства АТ к ДНК могут определять течение патологического процесса. Обнаружено, что АТ к ДНК при СКВ обладают ДНК-гидролизующей активностью (Gabibov et al., 1994; Невзорова и др., 2006).

Вероятно, АТ к ДНК являются участниками патологического процесса, но их происхождение и биологическая роль остаются невыясненными.

Большинство исследователей поддерживают мнение о патогенетической роли IgG-АТ к нДНК в аутоиммунитете (Kowal et al., 2004; Isenberg et al., 2007). Исследования последних лет показали, что АТ к ДНК могут проникать в клетки и влиять на внутриклеточные процессы (Yanase, Madaio, 2005; Rivadeneyra-Espinoza, Ruiz-Arguelles, 2006; Иванова, Невзорова, 2013).

Вероятно, IgG-АТ к нДНК могут быть индукторами и участниками аутоиммунного синдрома, нарушая механизмы апоптоза.

Целью настоящей работы была оценка влияния антител класса IgG к нативной ДНК в норме и при СКВ на изменение уровня апоптоза мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*.

### Материал и методика

Объект исследования — IgG-АТ к нДНК, выделенные методами жидкостной хроматографии (Невзорова и др., 2006; Сабирзянова, Невзорова, 2013) из сыворотки

крови 20 здоровых доноров, 7 больных СКВ на стадии обострения и 8 больных СКВ в период ремиссии после гормональной терапии.

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови здоровых доноров по стандартной методике на фиколл-верографине (1.077 г/мл).

Культивирование мононуклеарных клеток в присутствии IgG-АТ к ДНК (125 тыс. кл./мл, 1 мкг/мл АТ) проводили в течение 72 ч при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> (Сабирзянова, Невзорова, 2013). Контрольное культивирование проводили в присутствии ФСБ вместо АТ (отрицательный контроль) или дексаметазона (100 мкМ) для индукции апоптоза вместо АТ (положительный контроль). Каждый опыт повторяли трижды.

Оценка апоптоза клеток методом проточной цитофлуориметрии. Двойное окрашивание клеток (5 · 10<sup>5</sup> клеток) проводили по стандартной методике с использованием коммерческого набора Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit и с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США); программное обеспечение BD CellQuest Pro. Результаты выражали в процентах относительно уровня спонтанного апоптоза в отрицательном контроле (ФСБ), принятом за ноль.

Статистическая обработка результатов. При анализе данных использовали среднее значение и стандартное отклонение.

Использованные реактивы: среда RPMI-1640 (Gibco, Scotland), фиколл 400, глутамин (Serva, Germany), 76%-ный урографин (Schering, Germany), Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit (eBioscience, Austria) и дексаметазон (KRKA, Slovenia).

## Результаты и обсуждение

Обнаружено, что после культивирования клеток с IgG-АТ к нДНК больных СКВ на стадии обострения заболевания наблюдается наибольшее количество мононуклеарных клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, связывающих аннексин V и исключают PI (10.48 ± ± 2.28 %), что сопоставимо с результатами действия дексаметазона в положительном контроле (10.34 ± ± 0.85 %).

Основываясь на данных литературы (Рыжов, Новиков, 2002; Бойчук и др., 2003; Rivadeneyra-Espinoza, Ruiz-Argüelles, 2006) и ранее полученных нами результатах (Сабирзянова, Невзорова, 2013), можно предположить, что некоторые IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период обострения заболевания воздействуют на клетки аналогично дексаметазону и индуцируют митохондриальный путь апоптоза. Другие IgG-АТ к нДНК, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, вероятно, индуцируют р53-опосредованный апоптоз, вызывая нерепарируемые повреждения молекулы ДНК хроматина клеток.

Обнаружено, что количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, после культивирования с IgG-АТ к нДНК здоровых доноров на 6.09 ± ± 0.21 % выше по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ).

Отсутствие у здоровых доноров клинических признаков заболевания при негативном воздействии на клетки IgG-АТ к нДНК объясняется тем, что уровень АТ к нДНК в крови здоровых людей значительно ниже, чем у больных СКВ, и большая их часть находится в составе иммунных комплексов (Shoenfeld, 2004), которые разрушаются в процессе выделения IgG-АТ к нДНК.

Не исключено, что патологические СКВ-АТ к нДНК могут происходить от естественных АТ, выполняющих защитные функции. Таким образом, IgG-АТ к нДНК могут являться одним из факторов нарушения иммунного баланса, взаимодействуя с клетками организма и влияя на внутриклеточные процессы.

Обнаружено, что количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза после 72 ч инкубации с IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания незначительно повышено относительно отрицательного контроля (0.28 ± ± 0.09 %).

Вероятно, гормональная терапия СКВ приводит к изменению структуры и свойств IgG-АТ к нДНК, таким образом, АТ могут различаться конформационной динамичностью, что влияет на их способность взаимодействовать с антигенами плазматической мембраны и оказывать негативное воздействие на клетки, отличное как от СКВ-АТ в период обострения, так и от АТ здоровых доноров.

Нарушение функциональной активности мононуклеарных клеток и повышение уровня их апоптоза приводят к усилению воспалительного процесса (Lorenz et al., 2000; Yung et al., 2001) и могут приводить к усилению выработки АТ иммунной системой. Повышение в крови уровня естественных АТ к ДНК может привести к повреждению клеток иммунной системы и индукции аутоиммунного синдрома за счет интенсификации апоптоза здоровых клеток и накопления В-лимфоцитов, продуцирующих патологические IgG-АТ к нДНК.

Таким образом, IgG-АТ к нДНК являются важным звеном иммунной системы и участвуют в поддержании гомеостаза организма.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанско-

го (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

## Список литературы

Бойчук С. В., Мустафин И. Г., Фассахов Р. С. 2003. Механизмы дексаметазон-индуцированного апоптоза при atopической бронхиальной астме. Пульмонология. 2 : 10—16. (Boichuk S. V., Mustafin I. G., Fassakhov R. S. 2003. Mechanisms of dexamethasone-induced apoptosis in atopic bronchial asthma. Pulmonology. 2 : 10—16.)

Иванова В. В., Невзорова Т. А. 2013. Влияние антител к ДНК на клетки линии MDCK их внутриклеточная локализация. Цитология. 55 (1) : 60—68. (Ivanova V. V., Nevzorova T. A. 2013. Impact and intracellular localization of antibodies to DNA in MDCK cells. Cell Tissue Biol. 7(3) : 271—279.)

Невзорова Т. А., Винтер В. Г., Коновалова О. А., Салахов М. Х. 2006. Механизм действия ДНК-гидролизующих антител к ДНК из крови больных системной красной волчанкой. Биохимия. 71 (11) : 1524—1533. (Nevzorova T. A., Vinter V. G., Konovalova O. A., Salakhov M. Kh. 2006. Mechanism of action of DNA-hydrolyzing antibodies to DNA from blood of patients with systemic lupus erythematosus. Biochemistry (Moscow). 71 (11) : 1238—1246.)

Рыжов С. В., Новиков В. В. 2002. Молекулярные механизмы апоптотических процессов. Рос. биотерапевт. журн. 1(3) : 27—33. (Ryzhov S. V., Novikov V. V. 2002. Molecular mechanisms of apoptotic processes. Russian biotherapeutic J. 1 (3) : 27—33.)

Сабирзянова А. З., Невзорова Т. А. 2013. Цитотоксичность и генотоксичность антител к нативной дезоксирибонуклеиновой кислоте при системной красной волчанке и ревматоидном артрите. Рос. иммунол. журн. 7 (4) : 428—436. (Sabirzyanova A. Z., Nevzorova T. A. 2013. Cytotoxicity and genotoxicity of antibodies to native deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Russ. J. Immunol. 7 (4) : 428—436.)

Becker-Merok A., Nicolaisen C., Nossent H. C. 2006. B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time. Lupus. 15 : 570—576.

Gabibov A. G., Gololobov G. V., Makarevich O. I., Schourov D. V., Chernova E. A., Yadav R. P. 1994. DNA-hydrolyzing autoantibodies. Appl. Biochem. Biotech. 47 : 293—303.

Isenberg D. A., Manson J. J., Ehrenstein M. R., Rahman A. 2007. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? Rheumatology. 46 : 1052—1056.

Kowal C., DeGiorgio L. A., Nakaoka T., Hetherington H., Huerta P. T., Diamond B., Volpe B. T. 2004. Cognition and immunity: antibody impairs memory. Immunity. 21 : 179—188.

Lorenz H. M., Herrmann M., Winkler T., Gaipl U., Kalten J. R. 2000. Role of apoptosis in autoimmunity. Apoptosis. 5 : 443—449.

Rivadeneyra-Espinoza L., Ruiz-Argüelles A. 2006. Cell-penetrating anti-native DNA antibodies trigger apoptosis through both the neglect and programmed pathways. J. Autoimmun. 26 : 52—56.

Shoenfeld Y. 2004. The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. Nature Medicine. 10 : 17—18.

Villalta D., Romelli P. B., Savina C., Bizzaro N., Tozzoli R., Tonutti E., Ghirardello A., Doria A. 2003. Anti-dsDNA antibody avidity determination by a simple reliable ELISA method for SLE diagnosis and monitoring. Lupus. 12 : 31—36.

Yanase K., Madaio M. P. 2005. Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. J. Autoimmun. 24 : 145—151.

Yung R., Kaplan M., Ray D., Schneider K., Mo R. R., Johnson K., Richardson B. 2001. Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies. Lupus. 10 : 539—546.

ANTIBODIES TO DNA STIMULATES DEATH OF MONONUCLEAR CELLS  
OF HEALTHY PERSONS *IN VITRO**A. Z. Gavrilova, T. A. Nevzorova*<sup>1</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University;  
<sup>1</sup> e-mail: TNevezorova@mail.ru

We have shown that polyclonal antibody IgG to native DNA leads to increased levels of apoptosis of mononuclear cells of healthy persons *in vitro*. Possible biological role of antibodies to DNA is discussed.

**Key words:** antibodies to DNA, systemic lupus erythematosus, apoptosis.

---