

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: (616.72-002.77)-078.33

ДНК-АБЗИМЫ ПРИ АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Т.Е. Наумова¹, О.М. Дурова¹, А.Г. Габитов²,
З.С. Алекберова³, С.В. Сучков¹

РЕЗЮМЕ

ДНК-гидролизующие аутоантитела (аутоАТ) или ДНК-абзимы выявляются при аутоиммунной патологии в клинике и эксперименте. В работе представлена технология экспресс-скрининга сывороток крови на наличие ДНК-абзимов и сравнительное исследование уровней ДНК-гидролизующей активности аутоАТ у больных с различными формами системной (органонеспецифической) и органоспецифической аутоиммунной патологии. Установлено, что в крови клинически здоровых доноров, как правило, ДНК-абзимы IgG-изотипа отсутствуют. Наиболее часто ДНК-абзимы определяются у больных системной красной волчанкой (СКВ) и ревматоидным артритом (РА), реже - у больных с органоспецифическими формами аутоиммунных нарушений. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об аутоиммунном происхождении ДНК-абзимов IgG-изотипа и указывают на возможность их использования в клинической практике для мониторинга активности заболевания при СКВ и РА.

Ключевые слова: ДНК-абзимы, аутоиммунитет, аутоантитела.

Введение.

Помимо аутоантител (аутоАТ) с известными патогенными идиотипами, в последние годы значительное внимание уделяется природным аутоАТ, в том числе аутоАТ с каталитической активностью или абзимам, обнаруживаемым в крови больных с различными аутоиммунными заболеваниями.

Первые сведения об абзимах появились в литературе в конце 80-х годов, однако их физиологическая роль и биологический смысл каталитической активности остаются до сих пор не выясненными [7,15,16,17,19]. Некоторые абзимы способны проявлять каталитические свойства по отношению к различным по природе субстратам и могут быть задействованы в лизисе тканей в ходе развития аутоиммунного воспаления [5,13,18,20].

К настоящему времени охарактеризовано несколько групп природных абзимов, среди которых обоснованный интерес представляют аутоАТ с протеолитической активностью (протеоабзимы) и аутоАТ с ДНК-гидролизующей активностью или ДНК-абзимы [1,2,14,23].

В последнее время изучение патогенетической роли и клинической значимости ДНК-абзимов стало предметом пристального внимания в силу того, что каталитический потенциал ДНК-абзимов может оказаться важным серодиагностическим признаком заболеваний аутоиммунной природы [6]. Так, для больных системной красной волчанкой (СКВ) и лимфопролиферативными заболеваниями характерным является присутствие в крови ДНК-связывающих аутоАТ двух изотипов -IgG и IgM, отличающихся специфичностью, степенью avidности и связывающими характеристиками [8,9,10]. В повседневной клинической практике ДНК-абзимы, обладающие аналогично ДНК-связывающей

аутоАТ специфичностью в весьма широких пределах, сохраняют на определенном промежутке времени своего рода "функциональный нейтралитет, ускользая" от внимания клинициста [22, 25, 26].

Необходимость понимания клинической значимости ДНК-абзимов при системных аутоиммунных заболеваниях определила актуальность настоящих исследований.

Задача работы состояла в разработке экспресс-метода скрининга серийных образцов крови на наличие ДНК-абзимов и сравнительное исследование их распространенности и возможной клинической значимости при различных аутоиммунных заболеваниях в клинике и эксперименте.

Материалы и методы.

Сыворотки 120 больных СКВ, 72 ревматоидным артритом (РА), 82 системной склеродермией (ССД), 60 дискоидной красной волчанкой (ДКВ), 88 очаговой склеродермией (ОСД) и 198 аутоиммунным увеитом (АУ) получены из МОНИКИ, НИИ ревматологии РАМН, ЦВКГ им. Вишневского МО РФ, ГКБ №3 г. Астрахани, Национального института глаза (NEI, NIH, Бетезда, США) и МНИИ ГБ им. Гельмгольца. Контролем служили сыворотки 128 клинически здоровых доноров (Табл.).

СКВ диагностировали согласно критериям Американской Ревматологической Ассоциации (ARA) 1982 г. [24]. Диагноз РА ставился также в соответствии с критериями ARA [11,21]; группу сравнения составили больные с ОСД, ДКВ и АУ.

В качестве экспериментальных моделей в работе использованы аутоиммунные мыши инбредных линий MRL-lpr/lpr, NZB/NZW F1, SJL/J и неаутоиммунные мыши линии BALB/c, по 15 мышей в каждой группе. Мыши, использованные в экспериментах, содержались в стерильных условиях, минимизирующих контакт иммунной системы хозяина с внешними антигенами (Specific Pathogen-Free Status).

Скрининг образцов крови на наличие ДНК-абзимов проводили методом аффинной сорбции на парамагнитных гранулах ("Dynal", Норвегия) или гранулах протеин - А сепарозы 6MB ("Pharmacia", Швеция), покрытых стрептавидином с использованием биотинилированных античеловеческих или антимишинных АТ.

ДНК-гидролизующую активность ДНК-абзимов анали-

¹Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³Институт ревматологии РАМН, Москва, Россия

Адрес для корреспонденции:

С.В. СУЧКОВ
129110 Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2, МОНИКИ,
Лаборатория клинической иммунологии
Тел.: (095) 284-52-63, факс: (095) 330-73-10

Таблица 1.
Средние уровни ДНК-гидролизующей и цитотоксической активности ДНК-абзимов у больных с системными аутоиммунными заболеваниями

Группы обследованных	N	Диапазон колебаний активности	
		ДНК гидролизующей (M±m), усл. ед. ⁷⁾	Цитотоксической (M±m), усл. M ⁸⁾
СКВ ¹⁾	120	775±699**	10 ⁻⁵ ±10 ⁻⁴ ***
РА ²⁾	72	105±49*	10 ⁻⁴ ±10 ⁻² **
ССД ³⁾	82	0,04±0,01*	В пределах фона
ДКВ ⁴⁾	60	25±12*	10 ⁻³ ±10 ⁻² **
ОСД ⁵⁾	88	0,02±0,01*	В пределах фона
АУ ⁶⁾	198	18±10*	10 ⁻³ ±10 ⁻² **
Клинически здоровые доноры	128	0,03±0,01**	В пределах фона

Примечание: 1) СКВ, системная красная волчанка; 2) РА, ревматоидный артрит; 3) ССД, системная склеродермия; 4) ДКВ, дискоидная красная волчанка; 5) ОСД, очаговая склеродермия; 6) АУ, аутоиммунный увеит; 7) за 1 усл. ед. ДНК-гидролизующей активности принимали полное превращение ссДНК в циркулярную или линейную форму в течение 10 часов инкубации с антителами в условиях, описанных ранее [16, 22, 29]; 8) в качестве показателя цитотоксической активности ДНК-абзимов использовали минимальную концентрацию ДНК-абзимов (в молях) в инкубационной смеси, при которой обеспечивается цитотоксический эффект в отношении клеток-мишеней линии L929, как описано ранее [14, 16]. Различия между показателями в группах больных и клинически здоровых доноров статистически достоверны* - $p < 0,001$; ** - $p < 0,05$; *** - $p < 0,01$.

зировали путем слежения за превращением плазмидной суперспирализованной (сс) ДНК в циркулярную или линейную формы, используя для визуализации результатов электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле. Перспективные образцы сывороток, проявляющие ДНК-гидролизующую активность, анализировали далее количественно методом линейного дихроизма [12]. За одну условную единицу (усл. ед.) ДНК-гидролизующей активности принимали полное превращение ссДНК в циркулярную или линейную форму в течение 10 часов после инкубации с ДНК-абзимами.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента t.

Результаты и их обсуждение.

Уровень природных ДНК-связывающих аутоАТ в крови клинически здоровых доноров и неаутоиммунных мышей линии BALB/c относительно низкий [4, 19]. Невысокой является и доля ДНК-абзимов среди суммарного пула сывороточных иммуноглобулинов [6, 14]. В этой связи необходимость в разработке процедуры определения в сыворотках каталитической активности ДНК-абзимов, свободной от следов нуклеаз, является крайне актуальной при манипуляциях с большими объемами образцов.

Суть разработанной для скрининга процедуры аффинной сорбции в том, что из образцовывшихся и изолированных из реакционной смеси аффинных комплексов между ДНК-абзимами сыворотки и индикаторными биотинилированными АТ к фрагментам ДНК-абзимов, последние высвобождаются в раствор, в котором определяют каталитическую активность (рис. 1).

В соответствии с разработанным протоколом проводили сравнительное исследование ДНК-абзимов при различных аутоиммунных заболеваниях, для чего в соответствии

Рис. 1. Схема процедуры аффинной сорбции для экспресс-скрининга образцов крови на наличие ДНК-абзимов.



Рис. 2. Анализ ДНК-гидролизующей активности аутоантител, выделенных из крови больной СКВ в соответствии с протоколом аффинной сорбции.



1 и 2 - контроль отсутствия нуклеазной активности в промывочном буфере и в растворе глицин-HCl, pH 7,5, соответственно; 3 - релаксация ссДНК после инкубации с 1 мкг исходного препарата ДНК-абзимов; 4 - маркерная плазида в трех формах (сверхспирализованная, линейная, кольцевая); 5 и 6 - контроль отсутствия нуклеазной активности на последнем этапе промывки с адсорбцией IgG на антителах к κ- и λ-цепям, соответственно; 7 и 8 - восстановление ДНК-гидролизующей активности антител после диссоциации комплексов антител с κ- и λ-цепями, соответственно.

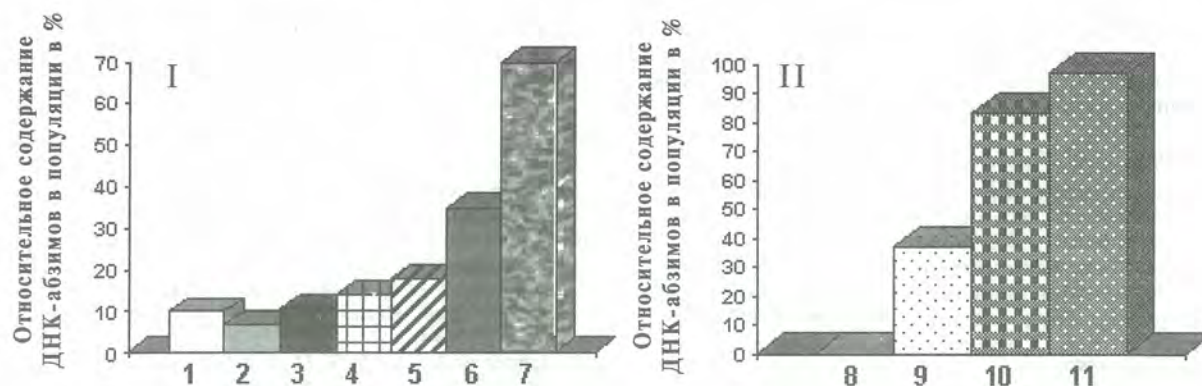
щих образцах крови определяли наличие ДНК-связывающих аутоАТ и ассоциированную с ними ДНК-гидролизующую активность. Представленные на рис. 2 результаты эксперимента иллюстрируют присутствие ДНК-абзимов в образцах крови от больной СКВ, выделенных методом аффинной сорбции.

Из результатов скрининга, суммированных на рис. 3, А следует, что ДНК-связывающие аутоАТ и ассоциированная с ними ДНК-гидролизующая активность наиболее часто выявлялись у больных СКВ (около 70%); реже всего - у больных склеродермией. Больные РА заняли в этом ряду промежуточное положение (18%).

Сравнительный анализ каталитической активности аутоАТ среди обследованных нозологий показывает, что ДНК-абзимы наиболее активны у больных СКВ (рис. 3В).

Рис. 3. ДНК-абзимы при различных формах аутоиммунной патологии.

А. Распространенность ДНК-абзимов у больных с различными аутоиммунными заболеваниями (А-I) и аутоиммунных мышей различных генетических линий (А-II)



В. Каталитическая активность ДНК-абзимов у больных с различными аутоиммунными заболеваниями (В-I) и аутоиммунных мышей различных генетических линий (В-II)



Заметную активность, хотя и порядком ниже, проявляют ДНК-абзимы при РА; еще ниже - у больных ДКВ и АУ.

Среди экспериментальных моделей высокая частота обнаружения ДНК-абзимов (более 90%) отмечена у мышей линии MRL-lpr/lpr с волчаночноподобным синдромом; реже всего ДНК-абзимы выявлялись у неаутоиммунных мышей линии BALB/c (рис. 3.А-II).

Наибольший уровень каталитической активности среди экспериментальных моделей обнаружен у аутоиммунных мышей линии MRL-lpr/lpr; минимальный - у неаутоиммунных мышей линии BALB/c (рис. 3.В-II).

Таким образом, наивысшая и чаще всего определяемая каталитическая активность ДНК-абзимов была характерна для тех форм аутоиммунной патологии, в патогенезе которых ДНК-связывающие аутоАТ играют ключевую роль.

Полученные на клиническом и экспериментальном материале данные свидетельствуют в пользу ранее выдвинутой гипотезы аутоиммунного происхождения ДНК-абзимов IgG-изотипа и позволяют предположить, что механизм об-

разования ДНК-абзимов этого класса, по крайней мере для СКВ и РА, сходен. Важным итогом является также то, что при системных аутоиммунных заболеваниях содержание ДНК-абзимов в кровотоке и их каталитическая активность значительно выше, чем при органоспецифической аутоиммунной патологии.

Предложенный метод скрининга позволяет анализировать большое количество образцов крови на наличие ДНК-гидролизующих аутоАТ, что представляется важным при проведении дифференциальной диагностики, а сам метод может быть использован для создания библиотек ДНК-абзимов с последующим анализом их структуры.

Не исключено, что в будущем ДНК-абзимы как новое поколение функциональных аутоАТ могут стать высокоинформативным молекулярно-серологическим признаком различных аутоиммунных заболеваний, а также будут использоваться для мониторинга пациентов в процессе лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кит Ю.А., Семенов Д.В., Невинский Г.А. Существуют ли каталитически активные антитела у здоровых людей? Мол. биол., 1995, 29, 4, 893-906.
2. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. Биохимия, 2000, 65, 11, 1473-1487.
3. Насонова В.А. Системная красная волчанка. М. Медицина. 1982.
4. Пономаренко Н.А., Александрова Е.С., Воробьев И.И. и др. Каталитическая активность нативных антител у мышей с аутоиммунными нарушениями. ДАН, 2000, 375(2), 256-259.
5. Сучков С.В. Сравнительное исследование каталитических (ДНК-гидролизующих) и цитотоксических свойств анти-ДНК аутоантител. БЭБМ, 2001, 131, 4, 420-423.
6. Сучков С.В., Габитов А.Г. Аутоантитела различных уровней специфичности и их клиническое значение при системных и локализованных формах аутоиммунной патологии. Аллергол. и иммунол., 2001, 2(1), 137-147.
7. Bencovich S.J. Catalytic antibodies. Ann. Rev. Biochem., 1992, 61, 29-54.
8. Bruns A., Blass S., Hausdorf G. et al. Do elevated levels of serum-soluble Fas contribute to the persistence of activated lymphocytes of SLE. Arthr. Reum., 2000, 43(10), 2307-2315.
9. Casiano C.A., Tan E.M. Recent development in the understanding of antinuclear antibodies. Int. Arch. Allerg. Immunol., 1996, 111 (4), 308-313.
10. Chan T.M., Cheng I.K. Identification of endothelial cell membrane proteins that bind anti-DNA antibodies from patients with SLE by direct and indirect mechanisms. J. Autoimmun., 1997, 10(5), 433-439.
11. Edworthy S., Bloch D. The American Rheumatism Association 1987. Revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. J. Rheum., 1988, 31, 315-324.
12. Gabibov A.G. DNA- hydrolyzing antibodies. Appl. Biochem. Biotechnol., 1994, 47, 293-302.
13. Kozyr A.V. Antibodies to nuclear antigens. Appl. Biochem., 2000, 83, 255-270.
14. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Aleksandrova E.S. et al. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases. Appl. Biochem. Biotechnol., 1998, 75, 45-61.
15. Lerner R.A., Janda K.D. Catalytic antibodies of protein function in real time. EXS, 1995, 73, 121-138.
16. Lerner R.A. Catalytic antibodies: the concept and the promise. Hosp. Pract. (Off. Ed.), 1993, 28(7), 53-59.
17. Lerner R.A., Bencovich S.J., Shultz P.G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. Science, 1991, 252(5006), 659-667.
18. Monestier M. Antibodies to nucleosomes and histone DNA complex. Methods, 1997, 4(1), 36-43.
19. Paul S. Natural catalytic antibodies. Mol. Biotechnol., 1996, 5(3), 197-207.
20. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis. Appl. Biochem. Biotechnol., 1998, 75(1), 13-24.
21. Preliminary criteria for classification of scleroderma. Arthr. Rheum., 1980, 23, 5, 581 - 590.
22. Shoenfeld Y. Anti-DNA antibodies: is DNA the self antigen or a shelf antigen, or are all autoimmune diseases immunogen driven? Academ. Press, San Diego, USA, 1997, 139-148.
23. Shuster A., Gololobov G., Kvashuk O. et al. DNA hydrolyzing autoantibodies. Science, 1992, 1 (256), 665-667.
24. Tan E.M., Cohen A., Fries D. et al. The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. Arthr. Rheum., 1982, 25, 1271-1277.
25. Villarreal G.M., Drekard C., Villa A.R. et al. Prevalence of 13 autoantibodies and of the 16/6 and related pathogenic idiotypes in 465 patients with SLE and their relationship with disease activity. Lupus, 1997, 6(5), 425-435.
26. Zamulaeva I.A., Lekakh I.V., Kiseleva V.I. et al. Natural hidden antibodies reacting with DNA or cardiolipin bind to thymocytes and evoke their death. FEBS Lett., 1997, 413(2), 231-235.

DNA-abzymes enzymes in autoimmune diseases in clinic and experiment

T.E. Naumova, O.M. Durova, A.G. Gabibov, Z.S. Alekberova, S.V. Suchkov

DNA-hydrolyzing autoantibodies (AAB) or DNA-abzymes can be found in autoimmune diseases in clinic and experiment. Technology of serum express screening for presence of DNA abzymes is described. Comparative study of DNA-hydrolysing activity in patients with different forms of systemic and organ-specific autoimmune diseases was performed. Blood of clinically healthy donors was usually free of IgG DNA-abzymes. DNA-abzymes were most often revealed in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) less often in patients with organ-specific forms of autoimmune disturbances. The results of the study confirm the hypothesis of autoimmune origin of IgG DNA abzymes and demonstrate the possibility to use them in clinical practice for monitoring to disease activity in SLE and RA.

Key words: DNA- abzymes, autoimmunity, autoantibodies