

Влияние сывороточных антител к ДНК на клетки почки собаки *in vitro* в зависимости от иммунореактивных регионов молекулы IgG

В.В. Иванова, Т.А. Невзорова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Influence of serum antibodies to DNA on the Madin–Darby canine kidney epithelial cells *in vitro* in depend of immunoreactive regions of the IgG molecule

V.V. Ivanov, T.A. Nevzorova

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

Данные, полученные на культуре клеток почки собаки MDCK, показали, что для осуществления биологической функции антител к ДНК как в норме, так и при патологии, необходимо участие как Fab-, так и Fc фрагментов молекулы IgG. Однако антигенсвязывающий регион, ответственный за проявление биологической функции антител к ДНК при СКВ (системная красная волчанка), более иммунореактивен, чем у антител в норме, а константный регион, вероятно, ответственен за активную конформацию молекулы антитела, при которой осуществляется патобиологическая функция антител к ДНК на клетку.

Ключевые слова: антитела к ДНК, системная красная волчанка, MDCK.

The data obtained on cell lines MDCK showed that for implementation of the biological function of antibodies to DNA both normal and pathological need the participation as Fab- and Fc-fragments of molecules of IgG. However, antigen-binding region is responsible for the manifestation of the biological function of SLE antibodies to DNA more immunoreactive than antibodies in normal and constant region is probably responsible for the active conformation of antibody for pathobiological function of antibodies to DNA in the cell.

Key words: antibodies to DNA, systemic lupus erythematosus, MDCK.

Актуальным вопросом в молекулярной биологии и иммунологии являются свойства антител (АТ) к ДНК, взаимодействующих с системой рецепторов клеток органов и тканей, способных проникать внутрь клеток и вызывать их функциональные и морфологические изменения. Однако происхождение и биологическая роль АТ к ДНК как в норме, так и при аутоиммунной патологии не выяснена. В связи с этим, изучение взаимодействия антител с различными антигенами, в том числе с клетками и их рецепторами, является логичным для исследования аутоиммунных патологий, таких как системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит и др., которые характеризуются высоким содержанием АТ к ДНК [1–3].

Вопрос о механизмах проникновения АТ к ДНК в клетку остается открытым. Исследования вклада структурных участков молекулы IgG, как Fab-, так и Fc-, во взаимодействие и проникновение в клетку проводились, в основном, на моноклональных АТ и полученные данные противоречивы [4–6]. Следовательно, для понимания биологической роли АТ к ДНК необходимо изучить функцию и вклад в патологический процесс каждого иммунореактивного фрагмента поликлональных антител. Была поставлена цель: оценить влияние АТ к ДНК класса IgG в зависимости от структурных участков молекулы антитела на эукариотические клетки *in vitro*. Модель исследования — культура клеток почки собаки (MDCK), так как почки — это орган, наиболее часто поражающийся при СКВ.

Материал и методы

В работе использовались следующие реактивы: бромистый этидий (Merk, Германия), среда RPMI-1640 (GIBCO, Шотландия), ДНК из тимуса теленка (Serva, Германия), стафилококковый протеин А (PrA) (Serva, Германия), Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells (ФЦТРБ-ВНИВИ, Россия), среда DMEM (GIBCO, Шотландия), набор антибиотиков для культивирования (Serva, Германия), трипановый синий (Lachema, Чехия).

Объекты исследования — антитела к ДНК класса IgG, выделенные из сывороток крови методами жидкостной хроматографии низкого давления, которые методами электрофореза и ИФА были охарактеризованы как АТ класса IgG с молекулярной массой 150 кДа, специфичные к ДНК [2]. В работе использовали сыворотки лиц женского пола по $n = 3$ в каждой группе: доноров и больных СКВ в активной стадии заболевания. Диагноз больных был установлен ревматологами ГБОУДПО Казанской государственной медицинской академии (Казань).

Для оценки влияния полученных высокоочищенных АТ класса IgG, преинкубированных при 56°C в течение 45 мин, на MDCK (10 тыс/мл в 200 мкл) проводили инкубацию (10% DMEM, 80% RPMI-1640, pH 7.4, 2 mM глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки) при 37°C, 5% CO₂. Контрольные образцы, вместо АТ, содержали фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Для исследования вклада регионов IgG клетки инкубировали с комплексами «АТ–ДНК»

e-mail: jassyra@mail.ru

(связывание антиген-связывающего Fab-фрагмента антигеном) и «АТ–PrA» *St. aureus* (связывание константного Fc-региона). Конечная концентрация АТ к ДНК во всех исследованиях подобрана экспериментально — 1 мкг/мл. После инкубации оценивали выживаемость клеток в камере Горяева методом исключения трипанового синего (микроскоп Carl Zeiss Jena, Германия); изменение конформации ДНК клеток методом флуориметрии (MPF-4 Hitachi, Япония).

Статистическую обработку проводили, используя Microsoft Excel (медиана, перцентили 5 и 95).

Результаты

Аффинно выделенные АТ к ДНК здоровых доноров и больных СКВ ингибировали рост и деление клеток, приводили к увеличению флуоресценции комплекса «этидий бромид–ДНК» клеток почки собаки (рис. 1, 2); комплекс АТ–PrA приводил к изменению влияния IgG и PrA на жизнеспособность и метаболизм клеток МДСК; взаимодействие АТ к ДНК с антигеном отменяло влияние IgG здоровых доноров и снижало биологическое действие АТ больных СКВ на клетки почки собаки *in vitro*.

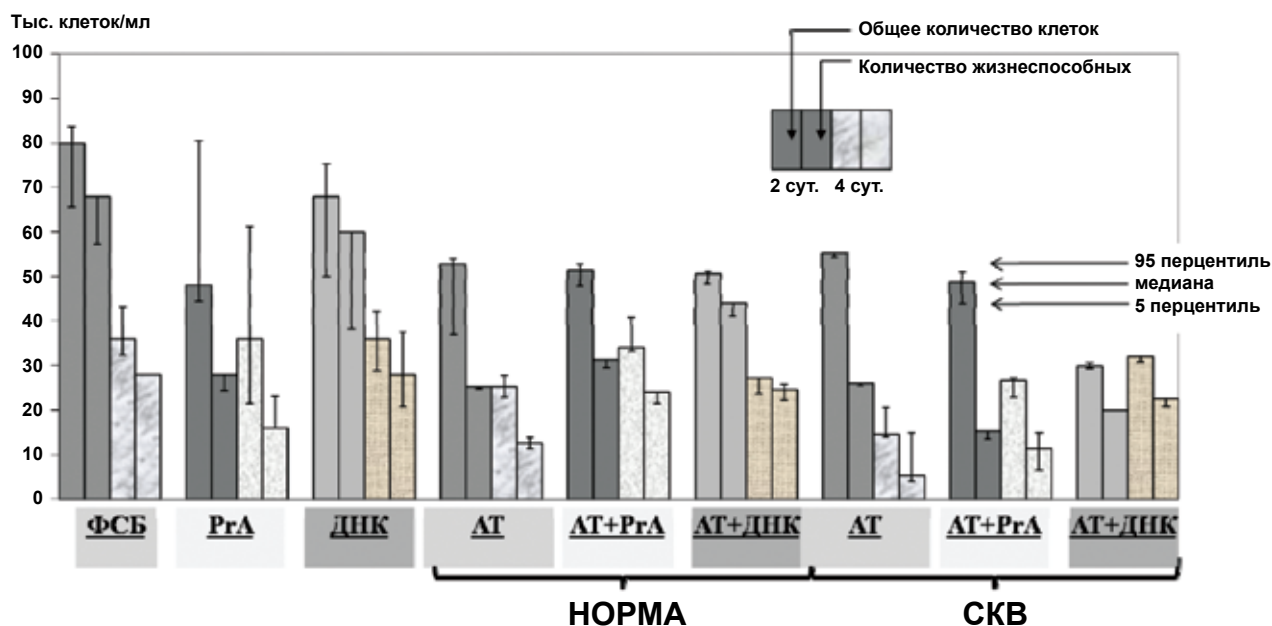


Рис. 1. Влияние АТ к ДНК класса IgG в зависимости от иммунореактивных участков молекулы антитела на количество и жизнеспособность клеток MDCK *in vitro*

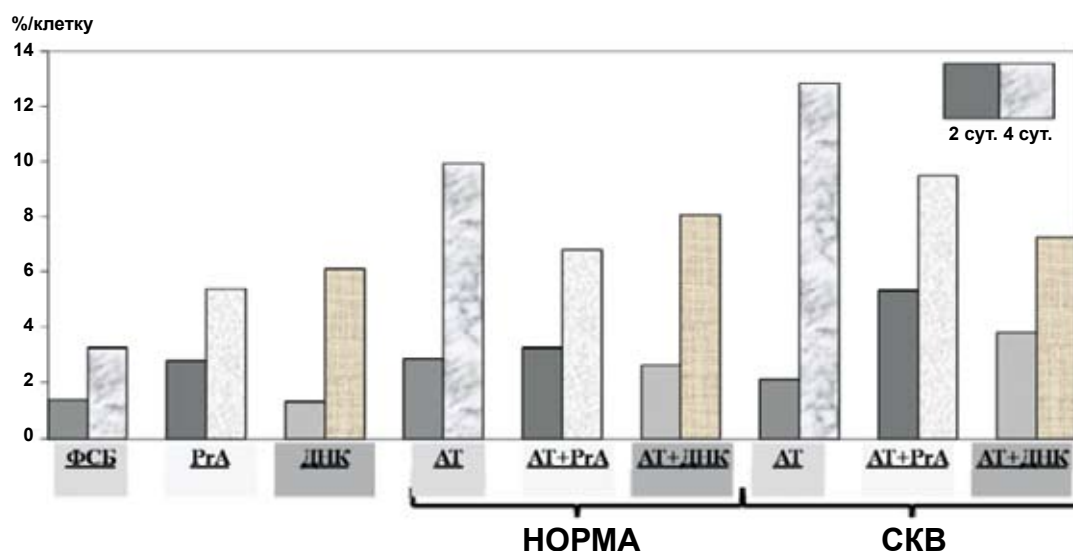


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции (%/клетку) комплексов ДНК–хроматина клеток с бромистым этидием после культивирования с АТ к ДНК класса IgG в зависимости от иммунореактивных участков молекулы антитела. Возбуждение флуоресценции — при 490 нм, запись флуоресценции — при 610 нм

Обсуждение

АТ клинически здоровых доноров и патологические антитела вмешиваются в метаболизм и жизнеспособность клеток почки собаки, но у патологических антител данный эффект выражен сильнее. Полученные результаты позволяют постулировать о функциональных, а возможно, и структурных различиях нормальных и патологических СКВ-антител и их биологическом влиянии на клетки почек.

Некоторые авторы предполагают, что для осуществления биологической роли антителам необходимо связаться с FcR клеточной поверхности [7]. Другими авторами показано, что F(ab)₂'-фрагменты АТ при СКВ способны проникать в клетку и локализоваться в ядре [8]. К настоящему времени найдено много антигенов, с которыми связываются АТ к ДНК в различных типах клеток: FcR на Т-клетках, нуклеосомы в лейкоцитах, ДНК в мононуклеарных клетках, рибосомальный Р-белок в эндотелиальных и мезангиальных клетках и др. неидентифицированные белки. Посредством связывания с этими молекулами в различных клетках АТ могут влиять на апоптоз и клеточную пролиферацию [4, 5, 9].

Нами обнаружено изменение влияния АТ класса IgG на жизнеспособность и метаболизм клеток MDCK как при блокировании антигенсвязывающего Fab-региона АТ антигеном, который ответственен за функции АТ к ДНК, такие как, например, ДНК-гидролизующая активность [2], так и Fc-региона молекулы PrA. Полученные результаты свидетельствуют, что комплексообразование АТ с лигандами отменяет воздействия свободных молекул на клетки [10, 11]. Таким образом, можно предположить, что для осуществления биологической функции АТ к ДНК как в норме, так и при патологии необходимо участие как Fab-, так и Fc-фрагментов молекулы IgG. Антигенсвязывающий регион, ответственный за проявление биологической функции СКВ АТ к ДНК более иммунореактивен, чем у АТ в норме, а константный регион, вероятно, ответственен за активную конформацию АТ, при которой осуществляется патобиологическая функция АТ к ДНК на клетку, опосредованная взаимодействием АТ с клеткой. Вероятно, взаимодействие АТ к ДНК как с антигеном, так и с клеточными рецепторами происходит по механизму индуцированного соответствия, что определяет дальнейшее действие АТ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Арлеевская М. И., Габдулхакова А. Г., Цибулькин А. П.. Диагностические и прогностические маркеры ревматоидного артрита с точки зрения патофизиолога. Казань; 2010.
2. Невзорова, Т. А., Винтер В. Г., Коновалова О. А. и др. Механизм действия ДНК-гидролизующих АТ к ДНК из крови пациентов с системной красной волчанкой. Биохимия 2006; 71 (11): 1238–46.
3. Kolthur-Seetharam Pradeepa U., Gupta N., Narayanaswamy R. Spatiotemporal organization of AT- and GC-rich DNA and their association with transition proteins TP1 and TP2 in rat condensing spermatids. Histochem. Cytochem. 2009; 57(10): 951–62.
4. Williams J.M., Colman R., Brookes C.J. et al. Anti-endothelial cell antibodies from lupus patients bind to apoptotic endothelial cells promoting macrophage phagocytosis but do not induce apoptosis. Rheumatology 2005; 44: 879–84.
5. Madaio M.P., Yanase K., Foster M.H. et al. Nuclear localizing of antibodies. Novel insights into protein translocation and cellular function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998; 815: 263–6.
6. Yung S., Chan T. M. Mycophenolic acid reduces anti-DNA antibody binding and cytokine secretion in renal proximal tubular epithelial cells — implications in lupus nephritis Suppl. 2007; 16: 46–7.
7. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleo-protein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. Nature. 1978; 271 (640): 67–9.
8. Vlahakos D., Foster M.H., Ucci A.A. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo J. Am. Soc. Nephrol. 1992; 2: 1345–54.
9. Katz J.B., Diamond B.J. Mutational analysis of an autoantibody: differential binding and pathogenicity. Exp. Med. 1994; 180: 925.
10. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N. et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumors: DNA quantification and analysis of tumor-related gene methylation. British J. Cancer. 2006; 94: 1492–5.
11. Widaa A., Claro T., Foster T.J. et al. Staphylococcus aureus protein A plays a critical role in mediating bone destruction and bone loss in osteomyelitis. PLoS One 2012; 7(7): 1–9.

Поступила 10.08.2012