

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Казанский (Приволжский) федеральный университет"

На правах рукописи

Сабирзянова Алсу Зуфаровна

**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ
АНТИТЕЛ К ДНК СЫВОРОТОК КРОВИ
БОЛЬНЫХ СИСТЕМНЫМИ АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре биохимии Казанского (Приволжского)
федерального университета

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Невзорова Татьяна Александровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Мустафин Ильшат Ганиевич

кандидат биологических наук
Уразов Наиль Гумерович

Ведущая организация: ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия» Министерства
здравоохранения и социального развития
Российской Федерации (г. Казань)

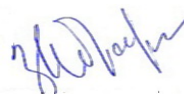
Защита состоится « 16 » февраля 2012 г. в 13 часов на заседании
Диссертационного Совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном
университете по адресу:

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени
Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан « 13 » января 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) – это заболевания, возникающие вследствие гиперактивности иммунной системы, дисбаланса во взаимодействии ее звеньев и нарушения толерантности к молекулам собственного организма (Ройт, 2007).

Общим признаком АИЗ является гиперглобулинемия и избыточное образование широкого спектра ААТ (Насонов и Сура, 1988). Аутоантитела (ААТ) – это антитела (АТ), способные взаимодействовать хотя бы с одним аутоантигеном (антигеном собственных тканей).

При некоторых аутоиммунных патологиях, а также других заболеваниях и физиологических состояниях, таких как стресс, беременность наблюдается повышение содержания в крови больных аутоантител класса IgG к нативной ДНК (IgG-ААТ к нДНК), происхождение и биологическая роль которых на сегодняшний день остаются невыясненными.

Системная красная волчанка (СКВ) и ревматоидный артрит (РА) – это хронические тяжелые системные аутоиммунные заболевания с неясной этиологией и обширной картиной иммунопатогенеза.

Характерное повышение уровня IgG-ААТ к нДНК в крови больных СКВ является одним из диагностических критериев данного заболевания. Российскими учеными было обнаружено, что АТ к ДНК при СКВ обладают ДНК-гидролизующей активностью (Gabibov et al., 1994).

РА – распространенное АИЗ, поражающее 0,5–2% взрослого населения в работоспособном возрасте 35–55 лет (Каратеев, 2007). Было показано, что приблизительно у 25% пациентов с РА наблюдаются повышенный уровень АТ с ДНК-гидролизующей активностью (Suchkov, 2001; Gabibov et al., 2006).

СКВ и РА снижают качество и продолжительность жизни населения, поэтому входят в число важных биомедицинских и социальных проблем современности. К сожалению, с каждым годом число больных СКВ и РА возрастает (Арлеевская и др., 2010; Невзорова и Винтер, 2006).

Вероятно, развитие АИЗ является следствием сочетания многих факторов, среди которых необходимо выделить наследственную предрасположенность, гормональный статус человека и негативное воздействие физико-химических и биологических факторов окружающей среды. Согласно литературным данным, риск развития аутоиммунной патологии у родственников больных АИЗ в 2 раза выше, чем в остальной популяции (Silman and Pearson, 2002). Вместе с тем ранняя диагностика СКВ и РА является сложной

задачей, так как симптомы часто неспецифичны и могут наблюдаться при широком спектре как ревматических, так и неревматических заболеваний.

В связи с этим важной задачей биохимии является разработка подходов и методов диагностики, прогнозирования течения патологического процесса, контроля эффективности комплексной терапии и мероприятий профилактики АИЗ.

Для решения поставленной проблемы необходим поиск и анализ маркера, обладающего свойствами, специфичными для разных АИЗ, и отражающего изменение иммунного статуса человека задолго до развития полномасштабной картины патологического аутоиммунного процесса.

В ряде работ показано, что активность АИЗ (в частности, СКВ) не всегда коррелирует с уровнем ААТ к ДНК (Villalta et al., 2009; Becker-Merok et al., 2006). У многих пациентов с СКВ в период устойчивой ремиссии заболевания и отсутствии клинического синдрома сохраняется высокий уровень ААТ к ДНК по сравнению с нормой. Кроме того, повышенный уровень ААТ к ДНК наблюдается и при других АИЗ, например, РА с клиническими проявлениями, отличными от СКВ. Это наводит на мысль, что не только и не столько уровень, а в большей мере свойства ААТ к ДНК определяют течение патологического процесса при развитии АИЗ и могут различаться при разнообразных аутоиммунных патологиях.

ААТ к ДНК, вероятно, являются участниками патологического процесса, но их роль в развитии и течении СКВ, РА и других АИЗ представляется исследователям неоднозначной.

Большинство авторов поддерживают мнение о патогенетической роли гетерогенной популяции ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих ААТ класса IgG в аутоиммунитете (Reefman et al., 2007; Jacob et al., 2006; Isenberg et al., 2007; Kowal et al., 2004; Невзорова, 2005). Но не исключено, что ААТ к нДНК, как часть пула естественных ААТ, в норме выполняют защитную функцию, способствуя удалению трансформированных и пораженных вирусами клеток, аутоантигенов, образующихся при разрушении тканей, и поддерживая гомеостаз организма (Полетаев и Чурилов, 2009).

В исследованиях последних лет показано, что некоторые ААТ к ДНК способны не только связывать растворимые антигены и рецепторы на поверхности клеток, но и проникать через мембрану внутрь клеток, взаимодействовать с органоидами и локализоваться в ядре, влияя на метаболические процессы (Yanase and Madaio, 2005; Rivadeneuра-Espinoza and Ruiz-Argüelles, 2006; Jang et al., 2009).

Предположительно, IgG-ААТ к нДНК могут быть индукторами и участниками аутоиммунного синдрома, приводя к нарушению апоптоза клеток, следствием чего является увеличение содержания апоптотических телец и времени их циркуляции в

кровоотоке, что часто наблюдается при СКВ и является, по крайней мере, одной из причин утраты аутоотолерантности иммунной системы (Lorenz et al, 2000).

И до сих пор среди исследователей нет единого мнения о роли поликлональных IgG-ААТ к нДНК в нарушении баланса клеточной гибели при развитии СКВ и РА.

Целью работы явилось исследование влияния антител класса IgG к нативной ДНК при системной красной волчанке и ревматоидном артрите на мононуклеарные клетки здоровых лиц *in vitro*.

Были поставлены задачи:

1. Оценить влияние антител к ДНК сывороток крови доноров, больных системной красной волчанкой на стадии обострения и в период ремиссии заболевания, больных ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом на мононуклеарные клетки здоровых лиц *in vitro*;

2. Изучить зависимость влияния антител класса IgG к нативной ДНК на жизнеспособность и метаболизм мононуклеарных клеток *in vitro* от заряда молекулы антител и аффинности к нативной ДНК;

3. Оценить генотоксичность и влияние антител класса IgG к нативной ДНК в норме и при системных аутоиммунных заболеваниях на уровень апоптоза мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*.

Научная новизна

Впервые на первичной культуре мононуклеарных клеток здоровых лиц показано, что патогенетический потенциал поликлональных антител класса IgG к нативной ДНК может быть обусловлен изменением их физико-химических и иммунохимических свойств (суммарного заряда молекулы и аффинности к нативной ДНК) при развитии аутоиммунной патологии и отличается в разных группах системных аутоиммунных заболеваний.

Показано, что высокоочищенные свободные от иммунных комплексов антитела класса IgG к нативной ДНК здоровых доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания оказывают сходное влияние на мононуклеарные клетки периферической крови здоровых лиц *in vitro*. Обнаружено, что положительно заряженные антитела класса IgG к нативной ДНК больных СКВ в активной стадии заболевания обладают более выраженной цитотоксичностью и генотоксичностью по сравнению с антителами доноров.

Поликлональные антитела класса IgG к нативной ДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания не оказывают значимого влияния на мононуклеарные клетки здоровых лиц *in vitro*.

Показано, что наряду с положительно заряженными низкоаффинными

антителами, характерными для доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания, высокоаффинные антитела класса IgG к нативной ДНК больных ревматоидным артритом проявляют цитотоксичность и генотоксичность в культуре мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*.

Влияние субфракций антител класса IgG к нативной ДНК клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом сходно с влиянием антител больных ревматоидным артритом.

Поликлональные антитела класса IgG к нативной ДНК при системных аутоиммунных заболеваниях приводят к повышению уровня апоптоза мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*.

Практическая значимость

Изучение свойств антител класса IgG к нативной ДНК в культуре мононуклеарных клеток крови здоровых лиц способствует более глубокому пониманию фундаментальных основ работы иммунной системы человека в норме и при патологии. Материалы исследования представляют интерес в области биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и могут быть использованы в учебном процессе высших учебных заведений на биологических и медицинских факультетах.

Изменение свойств антител класса IgG к нативной ДНК в норме, при различных аутоиммунных заболеваниях, а также на разных стадиях активности патологического процесса, проявляющееся в воздействии антител на мононуклеарные клетки здоровых лиц, является специфическим маркером, отражающим изменение иммунного статуса, что может быть использовано для создания тест-системы выявления нарушений работы иммунной системы человека.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования субфракций антител класса IgG к нативной ДНК в качестве инструмента, позволяющего диагностировать, прогнозировать развитие и течение, проводить мониторинг состояния больных аутоиммунными заболеваниями и оценивать эффективность терапии с использованием культуры клеток.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на Всероссийской Конференции с элементами научной школы для молодежи «Структура и динамика молекулярных систем» (Казань, 2009), Научно-практической конференции биохимиков, посвященной памяти профессора В.Г. Винтера «История и достижения Казанской биохимической школы» (Казань, 2009), XIII европейском симпозиуме студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-2009» (Казань, 2009), I Всероссийской виртуальной

интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2010), I и II Международных научно-практических конференциях «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2010, 2011).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных действующим перечнем ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 121 странице и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов с 24 рисунками, 3 таблицами и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы со 131 наименованием.

Положения, выносимые на защиту

1. Механизм цитотоксичности ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих антител класса IgG в культуре мононуклеарных клеток здоровых лиц связан с нарушением структуры ДНК хроматина клеток;
2. Цитотоксичность и генотоксичность антител класса IgG к нативной ДНК зависит от их физико-химических и иммунохимических свойств. Изменение свойств антител класса IgG к нативной ДНК отражает нарушения в иммунной системе при аутоиммунных заболеваниях;
3. Антитела класса IgG к нативной ДНК вносят отрицательный вклад в развитие аутоиммунных заболеваний, приводя к повышению уровня апоптоза здоровых иммунокомпетентных клеток крови человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение антител класса IgG к нативной ДНК из сывороток крови человека

Выделение и все этапы очистки субфракций антител класса IgG к нативной ДНК (IgG-АТ к нДНК) проводили по ранее разработанной методике (Невзорова, 2005). В работе были использованы образцы крови лиц женского пола: 20 образцов крови здоровых доноров (21-72 лет), 7 – больных СКВ на стадии обострения заболевания (24-76 лет), 8 – больных СКВ в период ремиссии заболевания после гормональной терапии (35-40 лет), 20 образцов крови больных РА (31-79 лет) и 20 – клинически здоровых родственников больных РА (40-65 лет), полученные из медицинских учреждений г. Казани. Диагноз СКВ и РА был поставлен

квалифицированными ревматологами.

Исследование влияния IgG-АТ к нДНК на клетки *in vitro*

Выделение МНК, лимфоцитов и моноцитов из крови человека

Мононуклеарные клетки (МНК) из свежезабранной крови здоровых лиц выделяли по стандартной методике на фиколл-верографине – плотность 1.077 мг/мл (Metcalf et al., 1985).

Культивирование клеток с АТ к ДНК

Клетки (МНК/моноциты/лимфоциты) инкубировали в трех повторах в 96- / 24-луночном планшете («Linbro», Шотландия) (37°C, 5% CO₂) с АТ к ДНК сывороток / субфракциями IgG-АТ к нДНК. К 160 мкл клеток (2•10⁴ клеток/лунку) в полной среде RPMI-1640 («Gibco», Шотландия), pH 7,4, содержащей 2 mM глутамина («Serva», Германия), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 200 мкг/мл гентамицина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, добавляли АТ до конечной концентрации 1 мкг/мл, подобранной экспериментально. Контрольные образцы вместо АТ к нДНК содержали ФСБ (отрицательный контроль) и панкреатическую дезоксирибонуклеазу I (3 ед/мл – положительный контроль («Serva», Германия)), так как патологические АТ к ДНК проявляют ДНК-гидролизующую активность.

Исследования влияния АТ к нДНК на клетки проводили через 72 часа инкубации при 37°C, 5% CO₂ – время инкубации было подобрано экспериментально.

Для исследования количества клеточного белка, уровня апоптоза, повреждения ДНК МНК, выделения H₂O₂ моноцитами клетки собирали и 4 раза отмывали от среды холодным ФСБ с последующим центрифугированием (200g, 4 минуты).

Исследование общего количества и количества жизнеспособных клеток

По окончании времени культивирования клетки аккуратно собирали при 0°C и оценивали общее количество и количество жизнеспособных клеток методом исключения трипанового синего (0,3% раствор красителя на ФСБ) в камере Горяева.

Определение концентрации клеточного белка

Концентрацию белка в клетках определяли колориметрически (методом Бредфорда). Результаты выражали в нанограммах белка в расчете на одну клетку (Остерман, 1981).

Определение количества потребления глюкозы клетками

Концентрацию глюкозы в среде до и после инкубации клеток определяли колориметрическим глюкозоксидазным методом, используя стандартный коммерческий набор реагентов («Агат», Россия). Результаты поглощения глюкозы клетками выражали в % от содержания глюкозы в полной среде до инкубации.

Определение продукции перекиси водорода моноцитами

Концентрацию перекиси водорода, выделяемой моноцитами после инкубации с АТ к

нДНК, определяли колориметрически по окислению фенолового красного пероксидазой хрена (Pizato et al., 2006). Результаты выражали в наномолях в расчете на одну клетку.

Оценка повреждения ДНК клеток методом флуоресцентной спектрофотометрии

Степень повреждения ядерной ДНК определяли по изменению интенсивности флуоресценции комплекса этидий бромид-ДНК хроматина клеток (Анисимов и Болотников, 1999).

Оценка уровня повреждения клеточной ДНК методом «ДНК-комет»

В микроцентрифужные пробирки с 240 мкл 1% агарозного геля («Fermentas», Канада, $T_{пл} < +42$ °С) вносили 60 мкл клеточной суспензии, содержащей не менее 10^5 клеток. В качестве положительного контроля для визуализации деградации ДНК использовали клетки, инкубированные 5 минут при -20°C в присутствии $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$.

На предметное стекло ($+37^{\circ}\text{C}$), покрытое полилизинном («АреxLab», Россия), наносили 60 мкл полученного агарозного геля с клетками, равномерно распределяли и оставляли на 30 минут для полимеризации геля.

После полимеризации геля предметные стекла помещали в лизирующий раствор (10 мМ трис-НСl, рН 10, 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА- Na_2 , $+4^{\circ}\text{C}$, 1% Triton X-100, 5% ДМСО). Лизис клеток проводили в течение 1 часа при 4°C , после чего стекла переносили в электрофорезный буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА- Na_2 , рН >13 , $+4^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. Электрофорез проводили 20 минут при 1 В/см. По окончании электрофореза стекла переносили в 70% раствор этилового спирта на 15 минут для фиксации, после чего микропрепараты высушивали при 20°C в течение 1-2 часов.

Препараты окрашивали акридиновым оранжевым (20 мкг/мл) 30 минут и анализировали на флуоресцентном микроскопе (AxioScope A1 «Carl Zeiss», Германия) с соответствующими фильтрами (возбуждающий фильтр 490 нм, дихроичное зеркало 510, отсекающий фильтр 530 нм), увеличение 40x (Marlin et al, 2004; Hartmann et al, 2004; McKelvey-Martin et al, 1997; Speit et al, 2006; Morley et al., 2006).

При визуальном анализе подсчитывали 30-50 «ДНК-комет», затем их ранжировали на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4. Степень поврежденности ДНК при этом выражали как индекс «ДНК-комет» ($I_{дк}$), определяемый по формуле:

$$I_{дк} = (0I_0 + 1I_1 + 2I_2 + 3I_3 + 4I_4) / \Sigma, \text{ где}$$

I_0 - I_4 – число «ДНК-комет» каждого типа, Σ – сумма подсчитанных «ДНК-комет» (Сорочинская и Михайленко, 2008).

Оценка апоптоза клеток методом проточной цитометрии

Для оценки апоптоза клеток после инкубации с IgG-АТ к нДНК проводили двойное окрашивание клеток по стандартной методике с использованием

коммерческого набора реагентов (AnnexinV-FITC Apoptosis detection Kit «eBioscience», Австрия).

В качестве положительного контроля для индукции апоптоза МНК использовали клетки, культивированные в присутствии 100 мкМ дексаметазона («KRKA», Словения) в течение 72 часов при 37°C.

Степень связывания красителей с клетками анализировали на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США) с использованием программного обеспечения «BD CellQuest Pro».

Результаты выражали в % относительно отрицательного контроля (ФСБ), принятого за 0%.

Статистическая обработка результатов

Для объективной оценки результатов были использованы непараметрические критерии значимости. Из полученных данных изменения жизнеспособности и биохимических показателей клеток вычисляли медиану, 97,5 и 2,5 перцентили, используя стандартный пакет Microsoft Excel 2003.

При визуальной оценке «ДНК комет» и вычислении $I_{дк}$ различия между группами определяли с помощью критерия Крускала-Уоллиса.

При анализе данных проточной цитометрии использовали параметрические критерии значимости – вычисляли среднее значение и стандартное отклонение для каждой выборки (Акберова, 2004 а, б).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

IgG-АТ к нДНК ассоциируются с обострением СКВ. Уровень IgG-АТ к нДНК в сыворотке крови, как ДНК-связывающих, так и ДНК-гидролизующих (ДНК-абзимов), может отражать состояние пациента: возрастать до и на стадии обострения и снижаться в период ремиссии заболевания. ДНК-гидролизующие АТ обнаруживаются на пике активности РА, при медленно прогрессирующем и длительном течении заболевания и, особенно, при раннем развитии серьезных висцеральных нарушений.

В литературе имеются данные, что родственники больных АИЗ также предрасположены к аутоиммунным патологиям, но определение критической точки начала развития заболевания является сложной задачей.

Поэтому более глубокое понимание молекулярных механизмов развития АИЗ позволит решить актуальную проблему поиска динамичного маркера, имеющего диагностическое и прогностическое значение, который можно использовать в качестве важного критерия мониторинга иммунного статуса здоровых лиц, пациентов

с аутоиммунным синдромом и лиц, предрасположенных к АИЗ.

На сегодняшний день в литературе существуют противоречивые данные о происхождении, механизме действия, биологической роли IgG-АТ к нДНК, что, вероятно, связано с их гетерогенностью. Не исключено, что IgG-АТ к нДНК являются одним из молекулярных факторов, играющих важную роль в развитии АИЗ, вмешиваясь в процессы жизнедеятельности иммунокомпетентных клеток.

Поэтому в работе было исследовано влияние IgG-АТ к нДНК на МНК периферической крови здоровых лиц *in vitro*.

Поскольку МНК периферической крови являются смешанной культурой, состоящей в основном из лимфоцитов и моноцитов, и взаимодействие клеток может влиять на результаты, был проведен анализ воздействия АТ к ДНК на первичную культуру МНК, а также отдельно на моноциты и лимфоциты здоровых лиц.

Влияние АТ к ДНК сывороток на моноциты здоровых лиц *in vitro*

На первом этапе клетки культивировали в присутствии АТ к ДНК сывороток для моделирования условий, приближенных к *in vivo*.

Анализ полученных данных показал, что АТ к ДНК сывороток больных СКВ и РА на стадии обострения заболевания проявляют цитотоксичность и генотоксичность в культуре моноцитов, сравнимую с действием на клетки генотоксичной ДНКазы I (Olivero et al., 2004; Шкляева, 2009; Nevinsky et al., 2001), что отражается в снижении общего количества, количества жизнеспособных клеток и повышении уровня флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина (рис. 1).

Влияние АТ к ДНК сывороток доноров и больных СКВ в период ремиссии заболевания на моноциты не отличается от отрицательного контроля (ФСБ). Это может объясняться как более низким содержанием IgG-АТ к нДНК в крови здоровых людей и больных СКВ в период ремиссии заболевания по сравнению со стадией обострения, так и различиями в свойствах естественных и патологических IgG-АТ к нДНК.

В присутствии АТ к ДНК сывороток клинически здоровых родственников больных РА наблюдается тенденция к снижению пролиферации, количества жизнеспособных моноцитов и повышению флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина клеток, сходная с влиянием АТ к ДНК сывороток больных РА.

При оценке метаболических показателей моноцитов было выявлено снижение потребления глюкозы и содержания белка в образцах, инкубированных с АТ к ДНК сывороток больных СКВ, РА, а также тенденция к снижению показателей в присутствии АТ к ДНК сывороток клинически здоровых родственников больных РА. Отмечено также, что в присутствии АТ данных сывороток происходит повышение продукции перекиси водорода моноцитами (рис. 2).

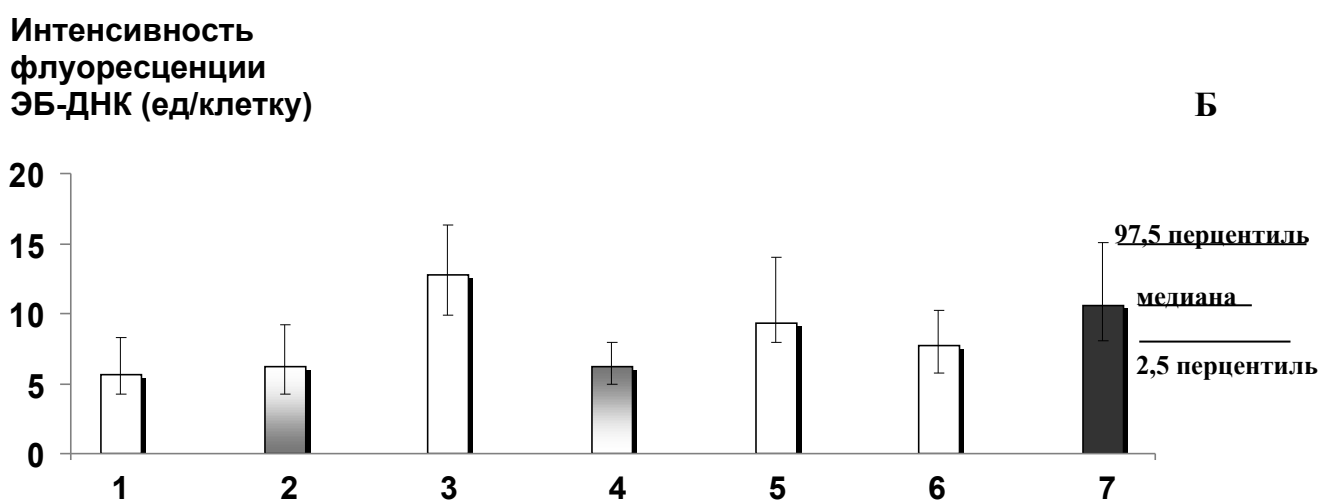
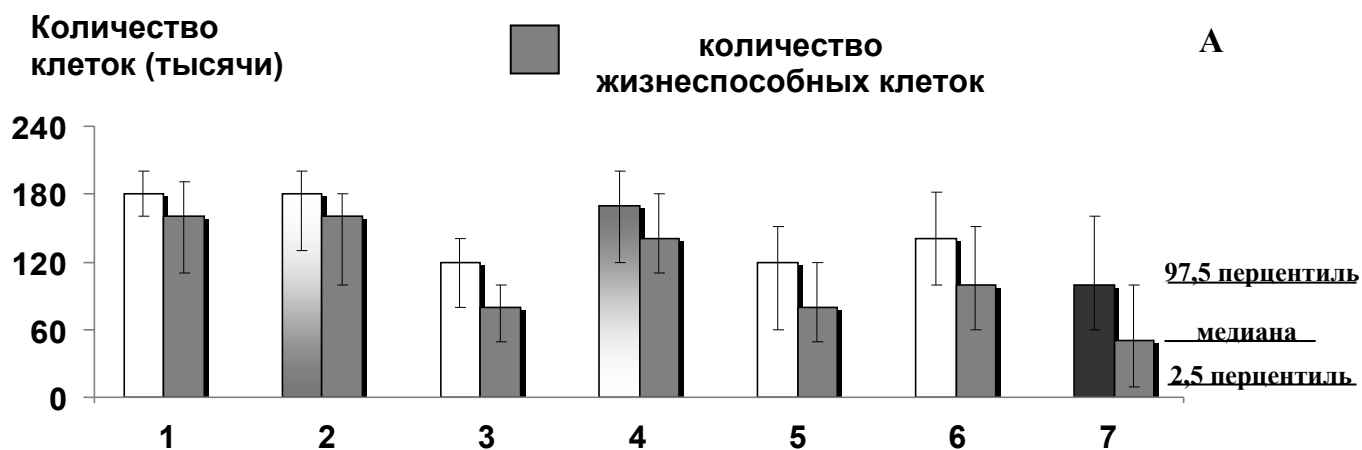


Рис. 1. Влияние АТ к ДНК сывороток на моноциты здоровых лиц *in vitro*
 А – Изменение общего количества и количества жизнеспособных моноцитов после 72 часов инкубации при 37°C с АТ к ДНК сывороток;
 Б – Изменение интенсивности флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина моноцитов после 72 часов инкубации при 37°C с АТ к ДНК сывороток;
 1 – отрицательный контроль (ФСБ), 2 – доноры, 3 – СКВ обострение, 4 – СКВ ремиссия, 5 – РА обострение, 6 – РА родственники, 7 – положительный контроль (ДНКазы I)

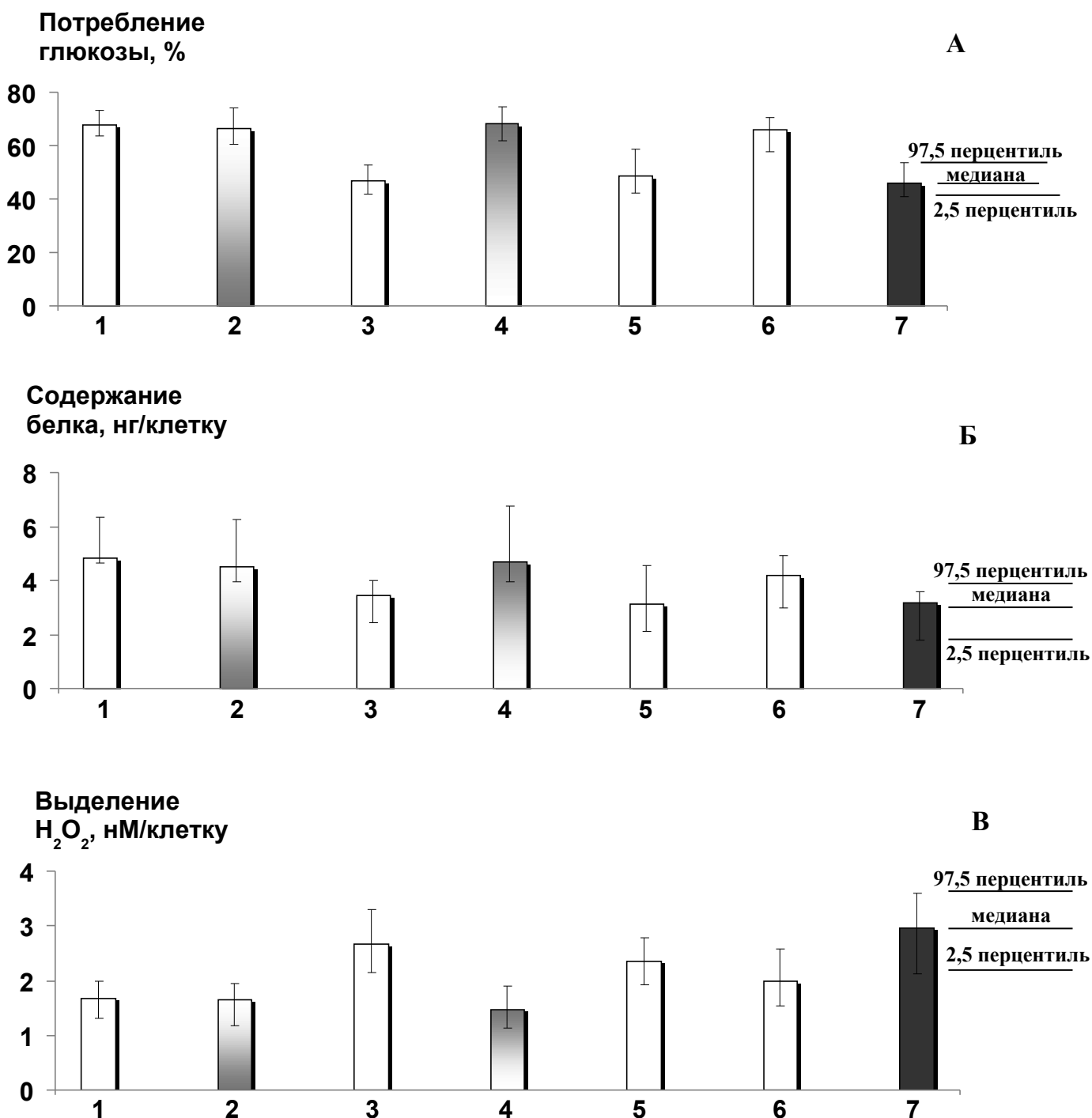


Рис. 2. Изменение метаболических показателей моноцитов здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с АТ к ДНК сывороток
 А – Потребление глюкозы моноцитами;
 Б – Содержание белка в клетках;
 В – Выделение перекиси водорода моноцитами;
 1 – отрицательный контроль (ФСБ), 2 – доноры,
 3 – СКВ обострение, 4 – СКВ ремиссия,
 5 – РА обострение, 6 – РА родственники, 7 – положительный контроль (ДНКза I)

Действие АТ к ДНК сывороток доноров и больных СКВ в период ремиссии на метаболические показатели моноцитов не отличается от отрицательного контроля.

Учитывая негативное воздействие на моноциты АТ к ДНК сывороток здоровых родственников больных РА, можно предположить, что даже в отсутствии каких-либо клинических проявлений в организме генетически предрасположенных к АИЗ лиц на фоне повышенного уровня окислительного стресса (Арлеевская и др., 2010) происходит скрытое зарождение патологического процесса, и IgG-АТ к нДНК могут являться одним из прогностических маркеров аутоиммунного синдрома задолго до полномасштабного проявления заболевания.

Влияние субфракций IgG-АТ к нДНК на моноциты здоровых лиц *in vitro*

Так как сыворотка является многокомпонентной системой и АТ к ДНК, содержащиеся в ней, могут быть «замаскированы» в составе иммунных комплексов для объективной оценки воздействия IgG-АТ к нДНК на клетки необходимо было выделить их в свободном виде. Кроме того, поскольку популяция АТ к ДНК является гетерогенной, для более глубокого понимания роли IgG-АТ к нДНК в индукции и течения АИЗ была оценена зависимость цитотоксичности и генотоксичности очищенных IgG-АТ к нДНК от их физико-химических и иммуно-химических свойств.

Из каждой сыворотки было получено по 4 субфракции свободных от иммунных комплексов IgG-АТ к нДНК, различающиеся зарядом (фракции I – основные АТ, характеризующиеся общим положительным зарядом, и II – кислые АТ с общим отрицательным зарядом) и аффинностью к нДНК – субфракции а, элюированные с нДНК-целлюлозы буфером, содержащим 1М NaCl, и субфракции б, элюированные с сорбента буфером глицин-HCl с низким значением рН 2.3, что позволяет сделать предположение об их большей аффинности к антигену – нативной ДНК.

Полученные субфракции IgG-АТ к нДНК были обозначены как: положительно заряженные низкоаффинные (субфракции Ia), положительно заряженные высокоаффинные (субфракции Ib), отрицательно заряженные низкоаффинные (субфракции IIa) и отрицательно заряженные высокоаффинные (субфракции IIб) (рис. 3).

Показано, что IgG-АТ к нДНК доноров *in vitro* проявляют сходное с СКВ-АТ на стадии обострения заболевания влияние на моноциты здоровых лиц: приводят к замедлению пролиферации, снижению количества жизнеспособных клеток и потребления ими глюкозы, но действие СКВ-АТ, обладающих ДНК-гидролизующей активностью, более выражено по сравнению с естественными АТ и сравнимо с положительным контролем – ДНКазой I (рис. 4, 5).

Отмечено, что заметное цитотоксическое воздействие оказывают положительно

заряженные IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания, как высокоаффинные, так и низкоаффинные (субфракции Ia и Ib).

Обнаружено, что после инкубации моноцитов с положительно заряженными IgG-АТ к нДНК (субфракции Ia и Ib) доноров снижается общее содержание белка в клетках, и моноциты продуцируют повышенное количество перекиси водорода. АТ к ДНК больных СКВ на стадии обострения заболевания оказывают сходный с IgG-АТ к нДНК доноров эффект на клетки *in vitro*, но, отмечено, что их активирующее воздействие на моноциты более выражено (рис. 6, 7).

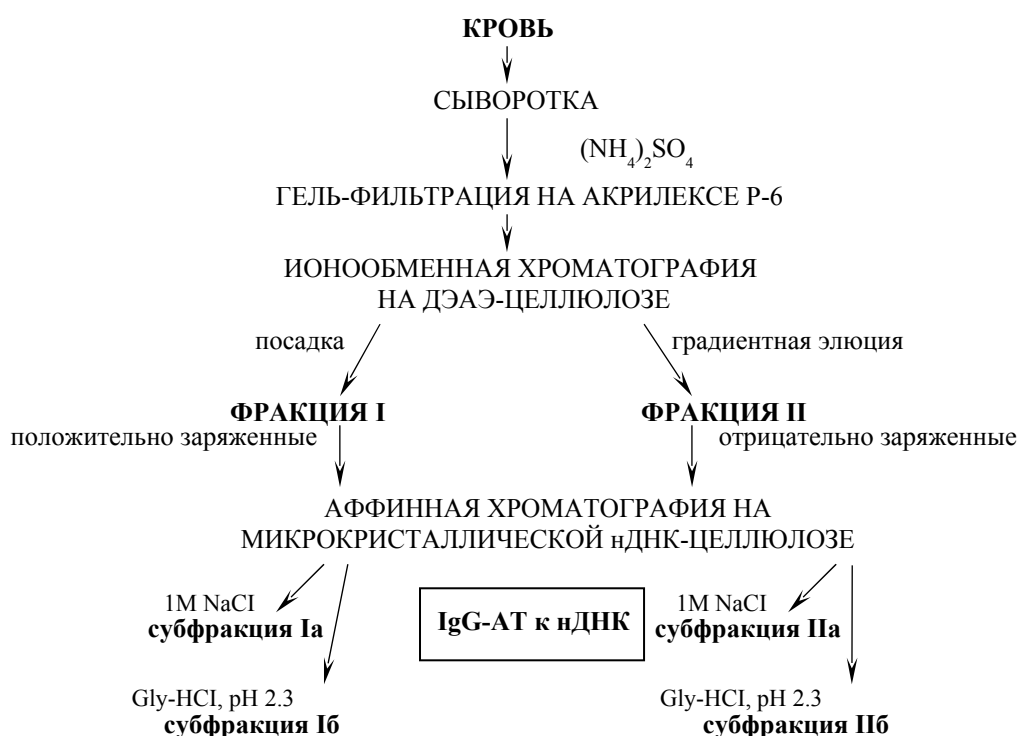


Рис. 3. Схема выделения и очистки антител класса IgG к нативной ДНК из сыворотки крови человека (Невзорова, 2005)

Влияние субфракций IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания на клетки *in vitro* не отличается от отрицательного контроля.

Выявлено, что наряду с положительно заряженными низкоаффинными IgG-АТ к нДНК, характерными для доноров и СКВ-больных на стадии обострения заболевания (субфракции Ia), цитотоксичность в культуре моноцитов проявляют высокоаффинные IgG-АТ к нДНК больных РА и клинически здоровых родственников больных РА (субфракции Ib и IIb) – приводят к снижению общего количества, количества жизнеспособных моноцитов и потребления ими глюкозы из питательной среды (рис. 4, 5).

В присутствии субфракций Ia, Ib и IIb IgG-АТ к нДНК больных РА и клинически

здоровых родственников больных РА наблюдается снижение содержания общего белка

В

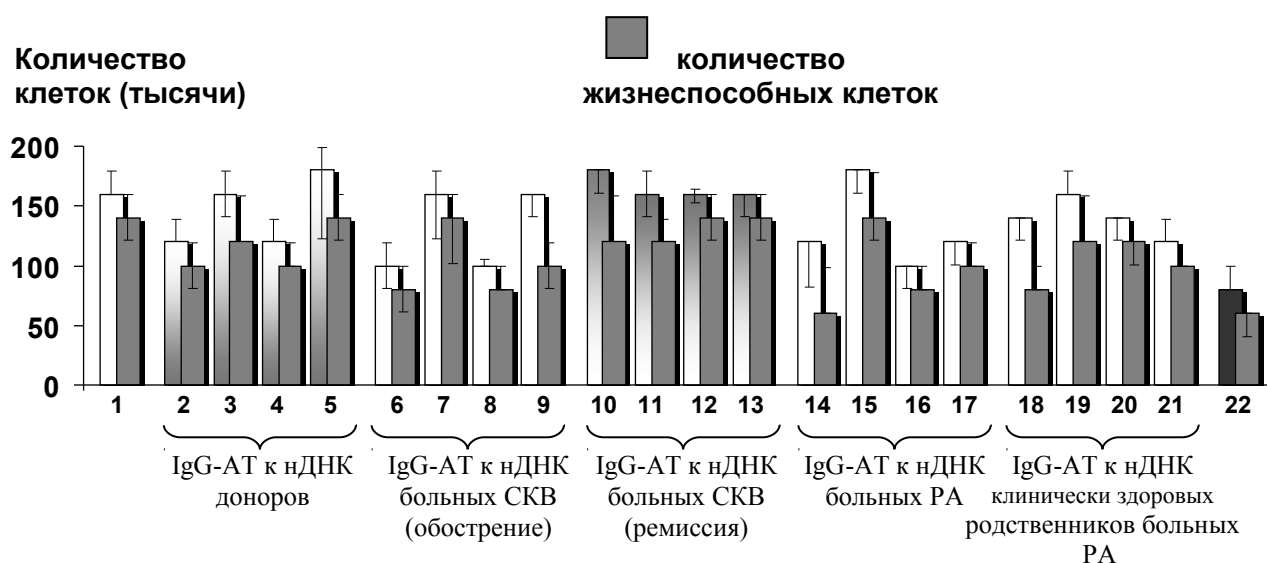


Рис. 4. Изменение общего количества и количества жизнеспособных моноцитов здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с субфракциями IgG-АТ к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

Потребление глюкозы, %

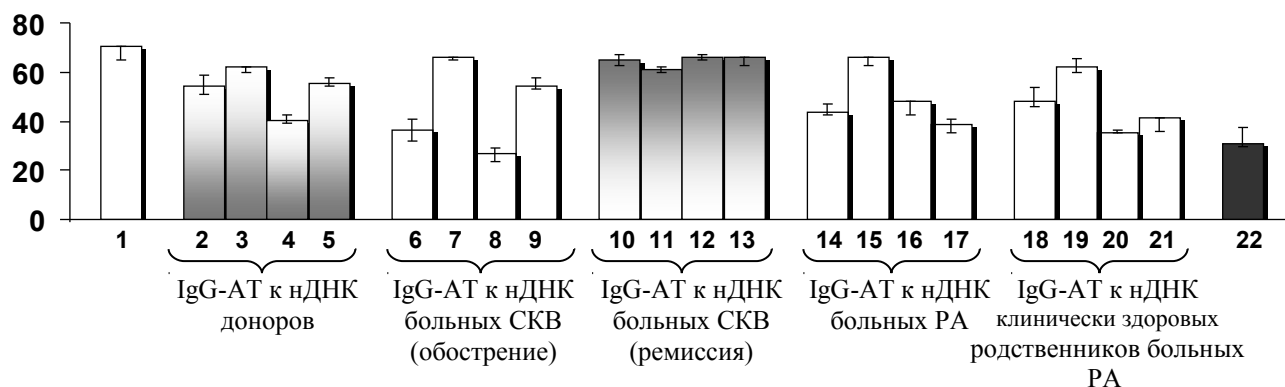


Рис. 5. Изменение потребления глюкозы моноцитами здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с субфракциями IgG-АТ к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

1 – контроль (ФСБ);

2, 6, 10, 14, 18 – субфракции Ia (положительно заряженные низкоаффинные);

3, 7, 11, 15, 19 – субфракции IIa (отрицательно заряженные низкоаффинные);

4, 8, 12, 16, 20 – субфракции Ib (положительно заряженные высокоаффинные);

5, 9, 13, 17, 21 – субфракции IIb (отрицательно заряженные высокоаффинные);

22 – ДНКза I

**Содержание
белка, нг/клетку**

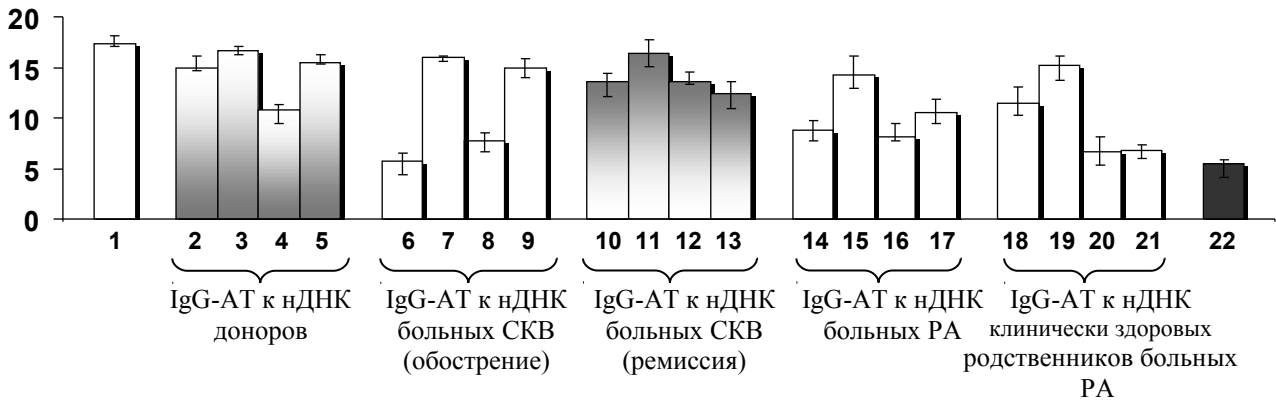


Рис. 6. Изменение содержания белка моноцитов здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с субфракциями IgG-AT к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

**Выделение
H₂O₂, нМ/клетку**

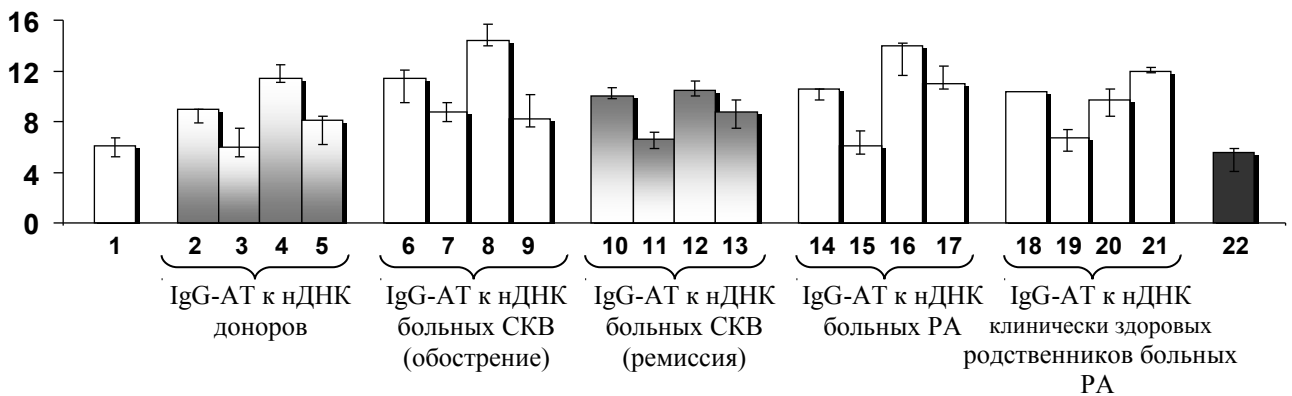


Рис. 7. Изменение выделения перекиси водорода моноцитами здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с субфракциями IgG-AT к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

- 1 – контроль (ФСБ);
 2, 6, 10, 14, 18 – субфракции Ia (положительно заряженные низкоаффинные);
 3, 7, 11, 15, 19 – субфракции IIa (отрицательно заряженные низкоаффинные);
 4, 8, 12, 16, 20 – субфракции Ib (положительно заряженные высокоаффинные);
 5, 9, 13, 17, 21 – субфракции IIb (отрицательно заряженные высокоаффинные);
 22 – ДНКаза I

клетках и усиление генерации перекиси водорода моноцитами (рис. 6, 7).

Результаты оценки влияния субфракций IgG-АТ к нДНК на общую фракцию МНК и отдельно на лимфоциты являются аналогичными результатам, полученным на культуре моноцитов, и подтверждают цитотоксичность АТ к ДНК при системных аутоиммунных патологиях в культуре клеток крови здоровых лиц.

Генотоксичность IgG-АТ к нДНК

Анализ данных флуоресцентной спектрофотометрии показал, что цитотоксичные субфракции IgG-АТ к нДНК доноров, больных СКВ, РА на стадии обострения заболевания и родственников больных РА приводят к повышению флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина лизированных клеток, что свидетельствует об изменении конформации клеточной ДНК, возможном снятии суперспирализации, обусловленным гидролизом ДНК (рис. 8). Для доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания генотоксичные субфракции представлены положительно заряженными IgG-АТ к нДНК (Ia и Ib).

Обнаружено, что в сыворотке крови больных РА и клинически здоровых родственников больных РА спектр генотоксичных субфракций шире, чем при обострении СКВ – Ia, Ib и IIб.

IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания не приводят к изменению флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК клеток.

Для визуальной оценки повреждений ДНК хроматина после инкубации клеток с IgG-АТ к нДНК проводили гель-электрофорез лизированных единичных клеток.

При наличии разрывов в ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация, что приводит к релаксации молекулы. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что придает наблюдаемым объектам вид комет. Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду, может использоваться в качестве показателя, характеризующего уровень повреждения ДНК в изучаемых клетках.

Данные метода «ДНК-комет» подтвердили результаты флуоресцентной спектрофотометрии. Положительно заряженные IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания приводят к повышению $I_{дк}$, что наиболее выражено для ДНК-гидролизующих АТ больных СКВ (рис. 9).

При визуальной оценке «ДНК-комет», повреждения ДНК были выявлены в клетках после инкубации с положительно заряженными IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания. Действие СКВ-АТ к нДНК в активной стадии, характеризующихся высокой ДНК-гидролизующей активностью и цитотоксичностью, сравнимо с действием перекиси водорода, использованной в

**Интенсивность
флуоресценции
ЭБ-ДНК, ед/клетку**

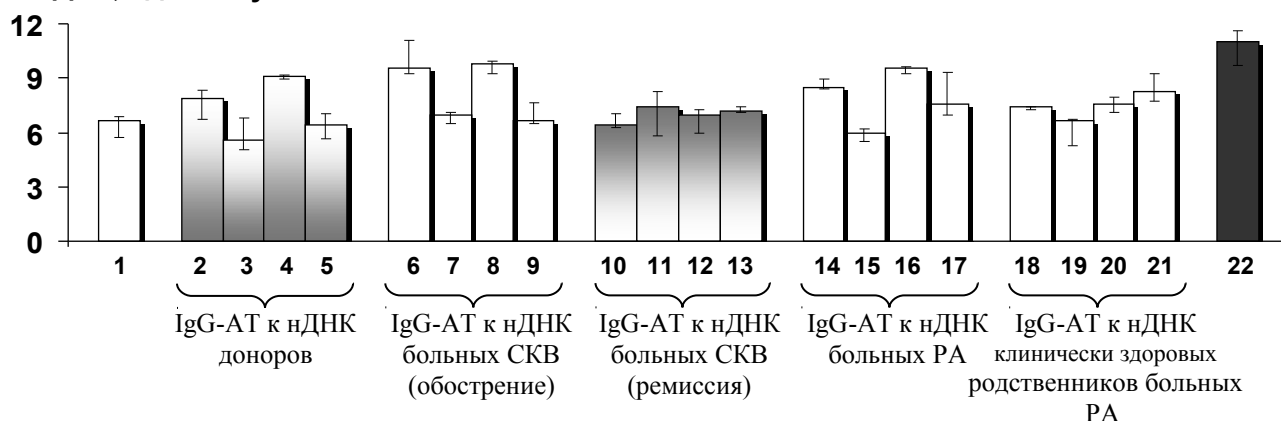


Рис. 8. Изменение интенсивности флуоресценции комплекса ЭБ-ДНК хроматина моноцитов здоровых лиц после 72 часов инкубации при 37°C с субфракциями IgG-АТ к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

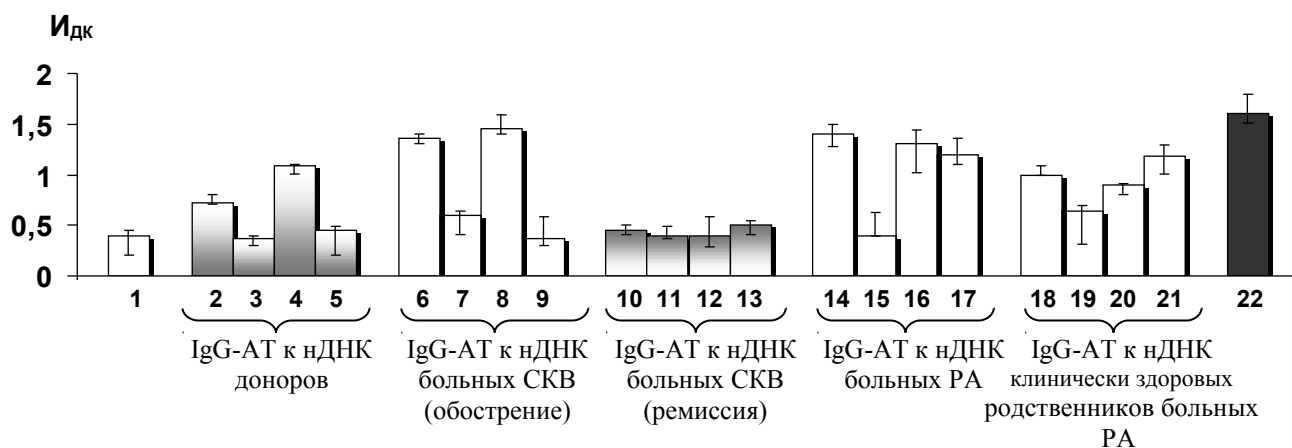


Рис. 9. Изменение индекса «ДНК-комет» после 72 часов инкубации при 37°C мононуклеарных клеток здоровых лиц с субфракциями IgG-АТ к нДНК (медиана, 97,5 и 2,5 перцентили)

- 1 – отрицательный контроль (ФСБ);
 2, 6, 10, 14, 18 – субфракции Ia (положительно заряженные низкоаффинные);
 3, 7, 11, 15, 19 – субфракции IIa (отрицательно заряженные низкоаффинные);
 4, 8, 12, 16, 20 – субфракции Ib (положительно заряженные высокоаффинные);
 5, 9, 13, 17, 21 – субфракции IIb (отрицательно заряженные высокоаффинные);
 22 – H₂O₂ (положительный контроль для метода «ДНК-комет»)

данном эксперименте в качестве положительного контроля (рис. 9, 10).

Поскольку исследуемые АТ являются поликлональными, вероятно, некоторые ДНК-связывающие АТ доноров, проникая в клетки, достигают ядра, связываются с ядерной ДНК и изменяют ее конформацию, открывая сайты рестрикции для действия ДНКаз. Другие АТ к нДНК могут взаимодействовать с компонентами мембраны клеток и индуцировать рецепторопосредованный апоптоз.

Предположительно, IgG-АТ к нДНК способны выступать в качестве лиганда для Fas-рецептора, экспрессируемого на поверхности большинства клеток в организме, что отражается изменением в цитоплазматическом «домене смерти» Fas-рецептора и запуском каскада реакций, приводящих в конечном итоге к апоптозу клетки (Ярилин, 2003а; Rivadeneira-Espinoza and Ruiz-Argüelles, 2006).

На микрофотографиях видно наличие комет с широким диффузным «хвостом» и практически полным отсутствием «головы» в препаратах клеток после инкубации с СКВ-АТ на стадии обострения заболевания (субфракций Ia и Ib), что соответствует описанию апоптотической гибели клеток.

Вероятно, ДНК-гидролизующие IgG-АТ больных СКВ в активной стадии заболевания способны стимулировать p53-опосредованный апоптоз, проникая в клетки и нарушая структуру ядерной ДНК. При повреждении ДНК клеток под влиянием физических или химических факторов происходит активация гена p53, продукт которого – белок p53, являющийся регуляторным онкосупрессором, задерживает клетку в фазе G1/S (посредством репрессии генов, регулирующих транскрипцию), чтобы дать время для работы репаративных систем. Если повреждения генетического аппарата клетки ликвидировать не удастся, то p53 выступает в качестве проапоптотического фактора и запускает программу апоптоза клетки по митохондриальному пути, активируя Вах (Рыжов и Новиков, 2002).

В целом на основании результатов сходной цитотоксичности и генотоксичности положительно заряженных IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания можно заключить, что для взаимодействия с цитоплазматической мембраной и проникновения внутрь клеток в данном случае большее значение имеет заряд молекул IgG-АТ к нДНК, нежели аффинность их к антигену – нативной ДНК.

Отсутствие у доноров клинических признаков заболевания при аналогичном воздействии на клетки IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ на стадии обострения заболевания объясняется тем, что уровень IgG-АТ к нДНК в крови здоровых людей значительно ниже, чем у больных СКВ и представлены они в основном нейтральными для клеток субфракциями отрицательно заряженных АТ (Сидорик, 1992).

В процессе выделения IgG-АТ к нДНК из сывороток происходит разрушение

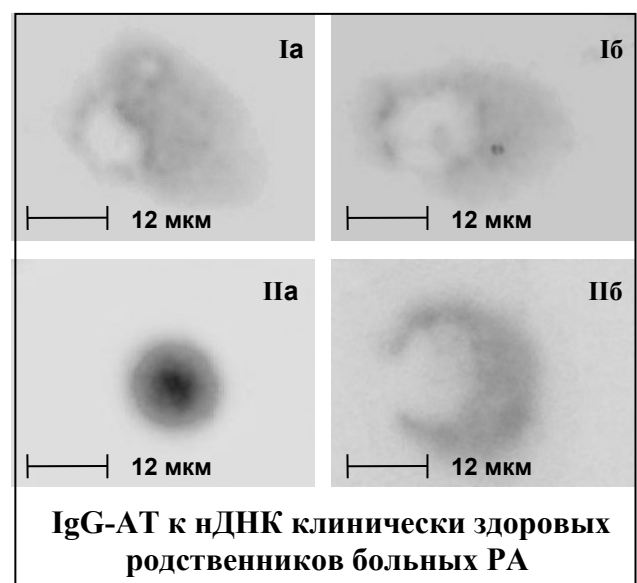
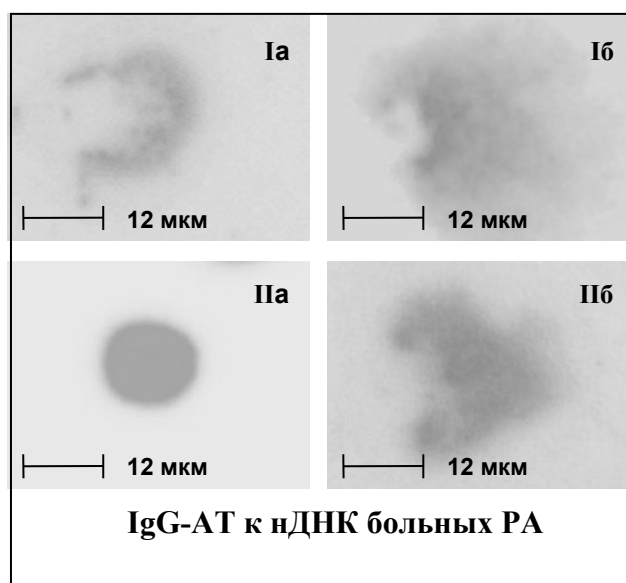
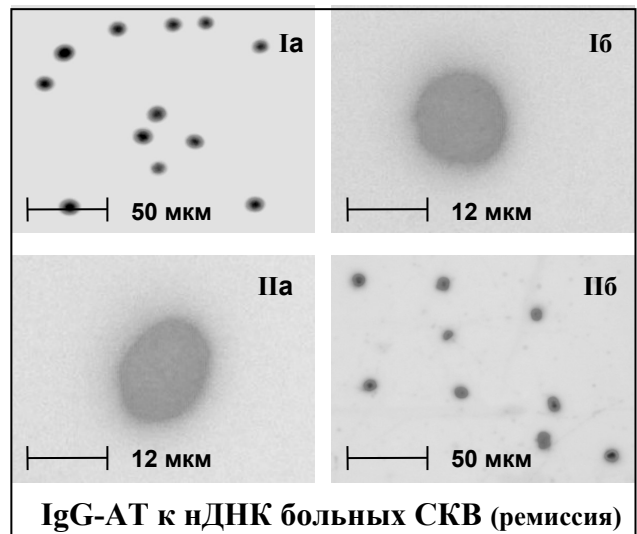
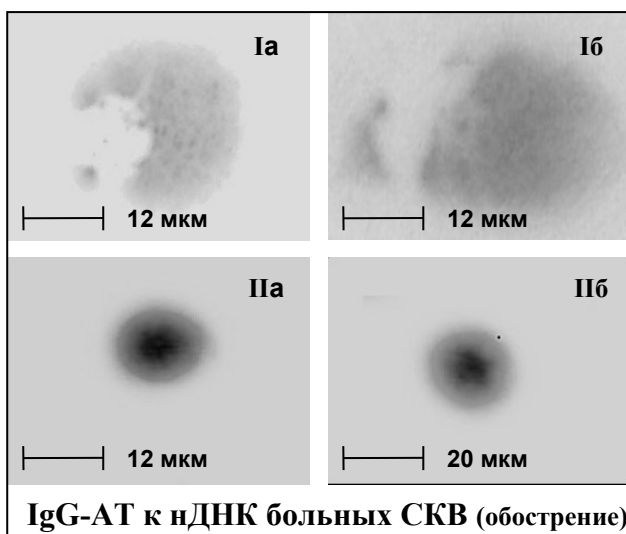
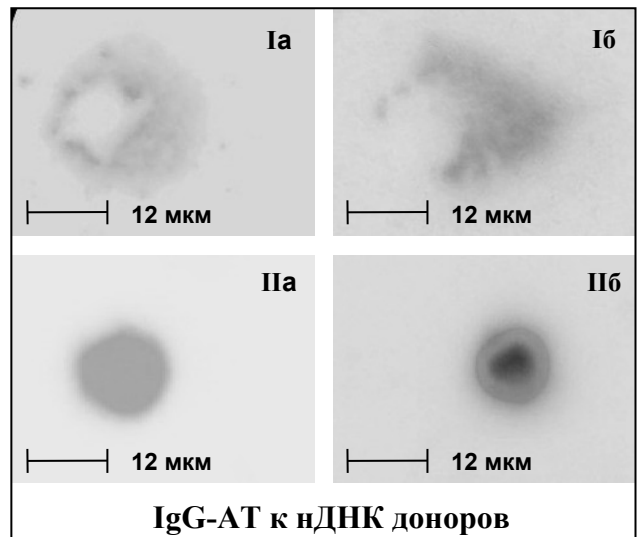
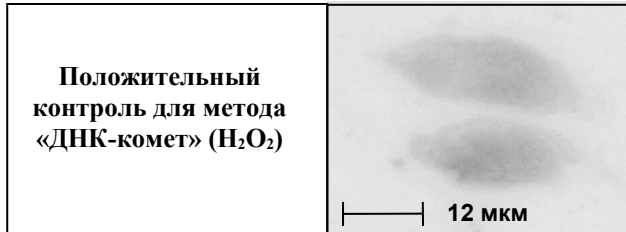
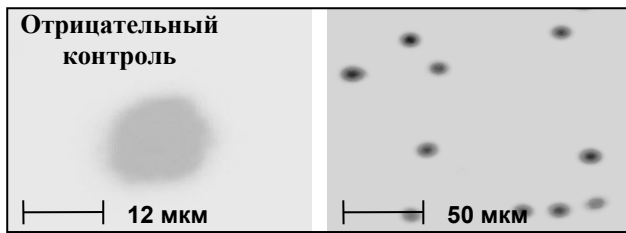


Рис. 10. Типичные микрофотографии «ДНК-комет» после 72 часов инкубации при 37°C МНК здоровых лиц с субфракциями IgG-AT к нДНК

иммунных комплексов АТ-ДНК с образованием свободных АТ к нДНК, а в опытах на клетках были использованы равные концентрации всех исследуемых АТ, что дало возможность наблюдать потенциальный негативный эффект на иммунокомпетентные клетки *in vitro* АТ здоровых доноров.

Не исключено, что патологические СКВ-АТ к нДНК могут происходить от естественных IgG-АТ к нДНК, выполняющих в организме защитные функции, но вопрос о причинах подобного аномального переключения остается открытым.

Поскольку патологические СКВ-АТ к нДНК обладают широкой перекрестной реактивностью, можно предположить, что свойства АТ к ДНК различаются в норме и при аутоиммунных патологиях, потому что исходно синтез этих АТ к ДНК В-лимфоцитами был стимулирован антигенами различной природы.

Субфракции IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания не обладают генотоксичностью.

На основании полученных результатов можно заключить, что под воздействием гормональной терапии в период ремиссии СКВ изменяется структура и свойства IgG-АТ к нДНК, в результате чего они, сохраняя невысокую ДНК-гидролизующую активность, утрачивают способность проникать в клетки. Вероятно, молекулы IgG-АТ к нДНК в норме, при обострении и в период ремиссии СКВ различаются конформационной динамичностью, что влияет на их способность взаимодействовать с антигенами на мембране клеток и оказывать цитотоксический и генотоксический эффект.

При визуальной оценке образцов «ДНК-комет» после инкубации клеток с субфракциями IgG-АТ к нДНК больных РА выявлено образование выраженных «хвостов комет» и повышение $I_{ДК}$ под воздействием субфракций Ia, Ib и IIb (рис. 9, 10). Эти субфракции представлены положительно заряженными низкоаффинными и высокоаффинными положительно и отрицательно заряженными IgG-АТ к нДНК. Аналогичные субфракции клинически здоровых родственников больных РА проявляют генотоксичность, сравнимую с АТ к ДНК больных РА.

Основываясь на вышеизложенных результатах, можно выдвинуть предположение, что при РА IgG-АТ к нДНК, воздействуя на генетический аппарат МНК, могут изменять транскрипционную активность генов либо вызывать летальные повреждения ДНК.

По-видимому, как положительно, так и отрицательно заряженные высокоаффинные IgG-АТ к нДНК больных РА *in vivo* могут способствовать развитию и обострению патологического процесса в суставной полости.

С одной стороны IgG-АТ к нДНК цитотоксически воздействуют на здоровые иммунокомпетентные клетки. Это может быть первопричиной иммунного дисбаланса в организме человека и исходным пусковым механизмом развития хронического

воспаления. К тому же поражение здоровых клеток иммунной системы РА-антителами, приводящее к иммунодефициту, частично объясняет гипотезу триггерной роли инфекции в развитии полномасштабной картины нарушения иммунного статуса при РА, согласно которой аутоиммунный РА-процесс является следствием пролонгированного кумулятивного эффекта повторяющихся банальных инфекций (Арлеевская и др., 2010).

Полученные результаты свидетельствуют, что популяция патологических АТ к нДНК при РА даже шире, чем при СКВ, поскольку наблюдается цитотоксичность и генотоксичность высокоаффинных IgG-АТ к нДНК, наряду с положительно заряженными АТ, характерными для периода обострения СКВ.

Это позволяет выдвинуть предположение об исходно иной природе происхождения IgG-АТ к нДНК при РА.

Усиление патогенетического потенциала IgG-АТ к нДНК может быть связано не только с изменением аминокислотной последовательности IgG, но также с вариациями углеводных компонентов молекул. Данное предположение подкрепляется открытием дефекта гликозилирования IgG у больных РА. Примерно 14% IgG клинически здоровых доноров не содержат галактозы ни в одной из углеводных цепей Fc-фрагмента молекулы АТ. В то же время у больных РА содержание полностью лишенных галактозы IgG всегда оказывается выше, чем в группе доноров и иногда достигает 60% (Ройт, 2007). Это может усиливать аутоиммуногенность Fc-фрагмента Ig, что объясняет генерацию ревматоидного фактора при РА. Кроме того, изменение гликозилирования АТ может отражаться на общей конформационной лабильности молекул и их способности взаимодействовать с клетками. В то же время при СКВ не наблюдается дефекта гликозилирования IgG.

Наличие в организме родственников больных РА потенциально патогенных IgG-АТ к нДНК с измененными свойствами является следствием нарушения АТ-синтезирующей функции В-лимфоцитов. Сложно сказать, сама патология В-лимфоцитов является генетически детерминированной или в организме наследственно восприимчивых людей присутствует дополнительный фактор, активируемый банальными инфекциями, воздействующий на В-лимфоциты и вызывающий соматические мутации генов, приводящие к синтезу цитотоксичных IgG-АТ к нДНК. Но обнаруженное явление сходной цитотоксичности и генотоксичности IgG-АТ к нДНК родственников и больных РА может свидетельствовать о скрытых патологических изменениях в организме клинически здоровых родственников больных РА и возможном зарождении аутоиммунного синдрома на фоне повышения частоты инфекционных процессов и уровня окислительного стресса (Арлеевская и др., 2010).

Количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза после воздействия

IgG-АТ к нДНК оценивали методом проточной цитофлуориметрии по уровню связывания белком аннексином V фосфотидилсерина на внешней стороне цитоплазматической мембраны и способности клеток исключать пропидий йодид (PI). В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубированные с глюкокортикостероидом дексаметазоном, обладающим выраженным проапоптотическим действием на иммунокомпетентные клетки.

Среднее количество клеток, связывающих аннексин V, но исключаящих PI, после воздействия субфракций АТ к ДНК доноров, больных ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом повышено на 6% по сравнению с отрицательным контролем (ФСБ), принятым за 0% (таблица 1). Субфракции АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания не приводят к апоптозу МНК *in vitro*. Значительное количество клеток (выше ~ на 10% по сравнению с отрицательным контролем), находящихся на ранней стадии апоптоза, сравнимое с положительным контролем дексаметазоном, наблюдается после воздействия субфракций АТ к ДНК больных СКВ на стадии обострения заболевания.

Таблица 1

Среднее количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза после 72 часов инкубации с субфракциями IgG-АТ к нДНК относительно контроля (ФСБ), принятого за ноль %

Субфракции АТ к нДНК	Содержание клеток, связывающих аннексин V и исключаящих PI, % (среднее значение ± стандартное отклонение)
IgG-АТ к нДНК здоровых доноров	6,09 ± 0,21
IgG-АТ к нДНК больных СКВ на стадии обострения заболевания	10,48 ± 2,28
IgG-АТ к нДНК больных СКВ в период ремиссии заболевания	0,28 ± 0,09
IgG-АТ к нДНК больных РА	6,61 ± 0,44
IgG-АТ к нДНК клинически здоровых родственников больных РА	6,15 ± 0,3
Дексаметазон	10,34 ± 0,85

В совокупности полученные данные флуоресцентной спектрофотометрии комплексов ЭБ-ДНК хроматина и проточной цитофлуориметрии свидетельствуют о том, что часть клеток после инкубации с IgG-АТ к нДНК, связывающая FITC-аннексин V и исключаящая PI, находится на ранней стадии апоптоза, но также результаты электрофореза единичных лизированных клеток обнаруживают значительную популяцию клеток на поздней стадии апоптоза с высоким уровнем деградации ДНК.

При использовании в качестве модели первичной культуры лимфоцитов здоровых

лиц были получены аналогичные результаты воздействия субфракций IgG-АТ к нДНК. Это является подтверждением того, что именно IgG-АТ к нДНК, а не перекись водорода, интенсивно секретируемая моноцитами под воздействием АТ, являются причиной повреждения ДНК хроматина иммунокомпетентных клеток *in vitro*, поскольку лимфоциты не продуцируют перекись водорода.

Нарушение функциональной активности мононуклеарных клеток, повышение уровня их апоптоза приводит к иммунонедостаточности и усилению воспалительного процесса в результате повреждения тканей активными формами кислорода макрофагов, снижению фагоцитоза, повышению содержания апоптотических телец и времени их циркуляции в кровотоке, что и наблюдается при СКВ (Walport, 2000; Yung et al, 2001) и РА. Так как в процессе апоптоза клеток на мембране иммобилизуется значительное количество ядерных аутоантигенов (например, нуклеосом), накопление в организме апоптотических клеток может направлять иммунную систему к продукции новой волны АТ (Lorenz et al, 2000), генерации субпопуляций АТ к ДНК с новыми свойствами, например, с ДНК-гидролизующей активностью и цитотоксичностью.

Вероятно, аномальное повышение уровня в крови естественных АТ к ДНК в определенных условиях способно привести к повреждению клеток иммунной системы, нарушению их функциональной активности, изменению экспрессии генов. Это может отразиться в нарушении иммунного статуса и индукции аутоиммунного синдрома за счет интенсификации апоптоза здоровых клеток и накопления модифицированных В-лимфоцитов, продуцирующих патологические IgG-АТ к нДНК.

Различия во влиянии IgG-АТ к нДНК доноров и больных СКВ в период ремиссии заболевания является свидетельством изменения свойств АТ к ДНК после гормональной терапии, а, следовательно, и иммунного статуса пациентов с тенденцией к иммунодефициту.

На основании полученных результатов можно сделать общее заключение, что механизм цитотоксичности ДНК-связывающих и ДНК-гидролизующих АТ класса IgG в культуре МНК здоровых лиц связан с нарушением структуры ДНК хроматина клеток. Цитотоксичность и генотоксичность АТ класса IgG к нДНК зависит от их физико-химических и иммунохимических свойств. Изменение свойств АТ класса IgG к нДНК отражает нарушения в иммунной системе при АИЗ, и вариабельность субфракционного состава АТ к ДНК может определять развитие и течение аутоиммунной патологии.

IgG-АТ к нДНК вносят отрицательный вклад в развитие системных АИЗ, приводя к повышению уровня апоптоза здоровых иммунокомпетентных клеток крови человека.

ВЫВОДЫ

1. Антитела к ДНК сывороток крови больных системной красной волчанкой на стадии обострения заболевания, ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом проявляют цитотоксичность, генотоксичность и изменяют метаболизм мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*.

АТ к ДНК сывороток крови здоровых доноров и больных системной красной волчанкой в период ремиссии заболевания значимого влияния на мононуклеарные клетки здоровых лиц *in vitro* не оказывают;

2. Положительно заряженные низкоаффинные и высокоаффинные к нативной ДНК антитела класса IgG доноров и больных системной красной волчанкой на стадии обострения заболевания проявляют цитотоксичность в культуре мононуклеарных клеток здоровых лиц и приводят к нарушению клеточного метаболизма. Антитела класса IgG к нативной ДНК больных системной красной волчанкой на стадии обострения заболевания оказывают более выраженное негативное влияние на жизнеспособность и метаболизм мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*;

3. Субфракции антител класса IgG к нативной ДНК больных системной красной волчанкой в период ремиссии заболевания значимого влияния на мононуклеарные клетки здоровых лиц *in vitro* не оказывают;

4. Высокоаффинные антитела класса IgG к нативной ДНК больных ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом приводят к гибели мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro* и нарушению клеточного метаболизма;

Цитотоксичные субфракции IgG-антител к нативной ДНК доноров, больных системной красной волчанкой на стадии обострения заболевания, больных ревматоидным артритом и клинически здоровых родственников больных ревматоидным артритом проявляют генотоксичность в культуре мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro*. Антитела класса IgG к нативной ДНК приводят к гибели мононуклеарных клеток здоровых лиц *in vitro* путем апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сабирзянова, А.З.** Влияние антител класса IgG к нативной ДНК на моноциты человека *in vitro* / А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, кн. 2. – С. 186-200.
2. **Сабирзянова, А.З.** Антитела к ДНК сывороток крови больных системной красной волчанкой и ревматоидным артритом проявляют генотоксичность в первичной культуре лимфоцитов здоровых лиц / А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 5; URL: www.science-education.ru/99-4811.
3. **Сабирзянова, А.З.** Свойства антител к ДНК в культуре клеток / А.З. Сабирзянова, В.В. Иванова, А.Ю. Храмова, Т.А. Невзорова // Структура и динамика молекулярных систем (электронный журнал). – 2009. – №7. – часть А. – С. 32-42., http://ksu.ru/sdms/sod_7_2009.htm.
4. **Сабирзянова, А.З.** Экспресс-диагностикум аутоиммунных заболеваний на основе оценки свойств молекулярных маркеров крови / А.З. Сабирзянова, В.В. Иванова, Т.А. Невзорова // Материалы научно-практической конференции “Становление и достижения биохимической школы Казанского Университета (памяти В.Г. Винтера)” – Казань. – 2009. – С. 103-104.
5. Ivanova, V.V. Dependence of the influence of antibodies to DNA on the cells from activity of immunoreactive fragments of IgG / V.V. Ivanova, A.Z. Sabirzanova, A.Yu. Chramova, T.A. Nevzorova // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of borders» / Kazan, 2009. – P. 78-79.
6. **Сабирзянова, А.З.** Оценка изменения ДНК иммунокомпетентных клеток после воздействия ДНК-гидролизующих антител / А.З. Сабирзянова, А.Ю. Храмова, В.В. Иванова, Т.А. Невзорова // Материалы I Всероссийской интернет-конференции «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии» – Казань. – 2010. – С. 137-138.
7. Невзорова, Т.А. Антитела к ДНК в норме и при аутоиммунных заболеваниях / Т.А. Невзорова, **А.З. Сабирзянова**, В.В. Иванова, Р.Э. Мурадимова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» – Казань. – 2010. – С. 47-48.
8. Храмова, А.Ю. Влияние антител к ДНК на культивирование почек эмбриона свиньи (СПЭВ) в присутствии ультрафиолетового излучения *in vitro* / А.Ю. Храмова, В.В. Иванова, **А.З. Сабирзянова**, Т.А. Невзорова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» – Казань. – 2010. – С. 102-103.
9. **Сабирзянова, А.З.** Влияние антител класса IgG к нативной ДНК на иммунокомпетентные клетки человека / А.З. Сабирзянова, Т.А. Невзорова // Материалы II Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» – Казань. – 2011. – С. 35-36.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание КФУ, к. 104, отдел
аттестации, ученому секретарю Диссертационного Совета Д 212.081.08 профессору
Абрамовой З.И., факс: (843) 238-76-01, E-mail: 111v_alsusa@inbox.ru