

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ И РЕАКТИВНОМ АРТРИТАХ

Волкова М.В.¹, Кундер Е.В.¹, Генералов И.И.², Петрович Д.М.¹

¹ ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

² УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Резюме. В последние годы активно исследуются каталитические свойства иммуноглобулинов. Установлено, что нуклеазная активность иммуноглобулинов повышается при системных аутоиммунных заболеваниях. Учитывая патогенетические особенности ревматоидного артрита и реактивного артрита, целесообразным является уточнение характера нуклеазной активности при данных заболеваниях. Этому может послужить определение ДНКазной активности иммуноглобулинов с использованием различных ДНК-субстратов и поиск специфических субстратов для конкретных нозологических единиц.

Целью работы является определение ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G при ревматоидном и реактивном артрите с использованием различных методов.

Для оценки нуклеазной активности используются различные методы. В настоящей работе изложены разработанные и модифицированные нами методики для определения ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G. Особое внимание уделено электрофоретическому методу оценки ДНКазной активности. Материалом для исследования являются поликлональные иммуноглобулины класса G, выделенные из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом и реактивным артритом.

Выводы: 1. В сыворотке пациентов с ревматоидным артритом, реактивным артритом присутствуют антитела, обладающие дезоксирибонуклеазной активностью. 2. ДНКазные абзимы проявляют гетерогенную способность гидролизовать различные ДНК-субстраты. 3. Абзимный гидролиз ДНК-субстратов длиной более 700 пар оснований более выражен по сравнению с ДНК-субстратами короткой (100 пар оснований) длины.

Ключевые слова: иммуноглобулины, абзимы, нуклеазная активность, гетерогенность, ревматоидный артрит, реактивный артрит

Адрес для переписки:

Волкова Маргарита Васильевна
ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования»
220013, Республика Беларусь, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3.
Тел.: +375 (44) 777-39-00.
Факс: +375 (17) 292-25-33.
E-mail: margovolkova@gmail.com

Address for correspondence:

Volkova Margarita V.
Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education
220013, Republic of Belarus, Minsk, Brovki str., 3, bldg 3.
Phone: +375 (44) 777-39-00.
Fax: +375 (17) 292-25-33.
E-mail: margovolkova@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Волкова, Е.В. Кундер, И.И. Генералов, Д.М. Петрович «Гетерогенность нуклеазной активности поликлональных иммуноглобулинов при ревматоидном и реактивном артрите» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 771-778.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

© Волкова М.В. и соавт., 2017

For citation:

M.V. Volkova, A.V. Kunder, I.I. Generalov, D.M. Petrovich "Heterogeneity of polyclonal immunoglobulins nuclease activity in rheumatoid and reactive arthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 771-778.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-771-778

HETEROGENEITY OF POLYCLONAL IMMUNOGLOBULINS NUCLEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID AND REACTIVE ARTHRITIS

Volkova M.V.^a, Kunder A.V.^a, Generalov I.I.^b, Petrovich D.M.^a

^a Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

^b Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. Catalytic properties of immunoglobulins are widely studied within recent years. It was found that nuclease activity of immunoglobulins is increased in systemic autoimmune diseases. Given some pathogenetic features of rheumatoid arthritis and reactive arthritis, it is appropriate to clarify the nature of nuclease activity in these diseases. Determination of DNase activity of immunoglobulins with different DNA substrates, and search for specific substrates for distinct clinical entities could serve these purposes. The aim of present work is to determine DNase activity of the polyclonal class G immunoglobulins in rheumatoid and reactive arthritis using various methods.

Different methods are used to evaluate nuclease activity. In this paper we present newly developed and modified techniques for determination of DNase activity of polyclonal IgGs. Particular attention was paid to the electrophoretic method of DNase activity assessment. Polyclonal IgG isolated from blood serum of patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis were used for assays. In this study, we demonstrated the presence of an inhomogeneous DNase activity of immunoglobulins in relation to different substrates.

Along with calf thymus DNA, we used bacterial plasmid DNA and PCR products based on bacterial gene sequences. Levels of DNase activity by rivanol clot method with calf thymus DNA as substrate proved to be higher in patients with rheumatoid arthritis than the control values ($p < 0.01$). DNase abzyme activity in patients with rheumatoid arthritis was elevated, as compared to the patients with reactive arthritis ($p < 0.01$). When examining ability of the IgG to hydrolyze procaryotic DNA (bacterial plasmid DNA and PCR products, based on bacterial genes), we obtained heterogeneous results. Different Ig samples showed varying degrees of DNA hydrolysis. Abzyme hydrolysis of DNA substrates longer than 700 bp was more pronounced, as compared to short DNA substrates (100 base pairs).

Conclusions: 1) antibodies having deoxyribonucleic activity are present in serum of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis; 2) DNase abzymes exhibit heterogeneous ability to hydrolyze various DNA substrates; 3) Abzyme-mediated hydrolysis of DNA substrates longer than 700 base pairs is more pronounced, as compared to a short DNA substrates (100 bp) length.

Keywords: immunoglobulins, abzymes, nuclease activity, heterogeneity, rheumatoid arthritis, reactive arthritis

Введение

В последние годы взаимодействие нуклеиновых кислот и системы нуклеаз крови рассматривается как один из механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний. Для этого существует ряд научных предпосылок. Во-первых, концентрация эндогенных циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме при аутоиммунных процессах в десятки раз выше по сравнению со здоровыми донорами [5]. Во-вторых, при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка и ревматоидный артрит, кроме циркулирующей ДНК, в сыворотке крови появляются антитела к ДНК и циркулирующие иммунные комплексы с ДНК. Обнаружено повышение ДНКазной активности сыворотки крови при ревматоидном артрите, спондилоартритах [4, 9]. Описано снижение ДНКазной активности сы-

воротки при СКВ, в биологических моделях показано развитие клинических проявлений СКВ у мышей, дефицитных по гену ДНКазы I, у 2-х пациентов с СКВ обнаружены дефекты в гене, кодирующем ДНКазу I [10, 16].

Также установлено, что наряду с дезоксирибонуклеазами плазмы крови нуклеазную активность способны проявлять иммуноглобулины [15]. Наиболее высокие уровни ДНКазной активности иммуноглобулинов установлены при ревматоидном артрите, псориатическом артрите, системной красной волчанке [9, 18].

Для оценки ДНКазной активности используются различные методы. В настоящей работе изложены разработанные и модифицированные нами методики для определения ДНКазной активности поликлональных иммуноглобулинов класса G, особое внимание уделено электрофо-

ретическому методу оценки ДНКазной активности.

Материалы и методы

Для исследования использовались поликлональные иммуноглобулины класса G. IgG выделялись из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом и реактивным артритом риванол-аффинохроматографическим методом с использованием агарозы, конъюгированной с протеином А [1]. Контроль чистоты и гомогенности проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с окраской нитратом серебра и Coomassie Brilliant Blue [2].

Базовым методом определения ДНКазной активности в нашей лаборатории является метод риванолового сгустка [3].

Для работы используется матричный 0,1% раствор ДНК тимуса теленка (Sigma) путем растворения ДНК в дистиллированной воде. Рабочий раствор ДНК в концентрации 0,25–0,35 мг ДНК/мл изготавливается из матричного раствора непосредственно перед постановкой реакции. Обязательно контролируется состояние рабочего раствора ДНК. Для этого к 0,2 мл раствора ДНК следует прибавить 0,1 мл 0,9% NaCl и 0,1 мл 0,02 М трис-НСl буфера pH 8,3 с 0,01 М хлоридом магния. Затем добавить 0,02 мл 0,75% раствора риванола и встряхнуть до образования сгустка ДНК. Далее сгусток отмыть, экстрагировать при 100 °С 0,5–1 М раствором HCl в течение 1–2 минут и фотометрировать на длине волны 405 нм. Пригодным для работы считается оптическая плотность сгустка ДНК 0,7–0,9.

Постановка осуществляется в центрифужных пробирках. К 0,1 мл поликлональных иммуноглобулинов в концентрации 1 мг/мл следует прибавить 0,2 мл стандартизованного раствора ДНК и 0,1 мл 0,02 М pH 7,4 Трис-НСl буфера, содержащего 0,01 М MgCl₂, затем встряхнуть. Реакция ставится в дублях. В контрольных пробах используется 0,02 М pH 8,3 Трис-НСl буфер, не содержащий солей магния, что блокирует ДНКазную активность, а также сыворотка донора, не проявляющая собственной ДНКазной активности в указанном разведении. Пробы необходимо инкубировать при 37 °С в течение 2 часов. После инкубации к пробам добавляется по 20 мкл 0,75% риванола. Результат оценивается по сгустку. Визуальный учет реакции проводится в баллах: 0 – отсутствие активности (компактный сгусток); 1 – минимальная активность (рыхлый сгусток); 2 – слабая активность (рыхлый сгусток, хлопья, нити); 3 – умеренная активность (хлопья, нити); 4 – высокая активность (распад сгустка, хлопья, нити); 5 – максималь-

ная активность (полный распад сгустка с образованием гомогенной взвеси).

Время инкубации реакции составило 20 часов. Забор аликвот производился сразу после смешивания компонентов (без инкубации), через 5 и 20 часов инкубации.

Наличие ДНКазной активности также определялось электрофорезом продуктов распада ДНК под влиянием иммуноглобулинов в 1,5% агарозном геле [2]. Для постановки электрофореза субстратно-буферная смесь (0,01 мл) вносилась в агарозный гель, содержащий Трис-боратный буфер (89 мМ Трис, 2,5 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 8,9 мМ H₃BO₃) с бромидом этидия (0,4 мкг/мл). Электрофорез выполнялся в аппарате для горизонтального электрофореза, заполненном Трис-боратным буфером при силе тока 30 мА, напряжении 120 В, в течение 2 часов или до момента достижения образцами края геля. Результаты электрофореза оценивались при помещении агарозного геля под ультрафиолетовый свет для визуализации продуктов реакции.

Для изучения патогенетической значимости феномена нуклеазной активности поликлональных иммуноглобулинов также были использованы другие субстраты ДНК, а именно бактериальная плазмидная двухспиральная ДНК *Escherichia coli*, ДНК *Chlamydia trachomatis* и *E. coli*, полученная методом ПЦР. ДНК-гидролизующую способность антител в отношении ДНК *E. coli* и *C. trachomatis* оценивали по изменению электрофоретической подвижности субстрата.

Для определения способности IgG гидролизовать бактериальную плазмидную ДНК *E. coli* использовалась разработанная нами методика. Реакционная смесь (0,3 мл) состояла из 0,1 мл двухспиральной плазмидной ДНК (3,400 пар оснований) в концентрации 100 мкг/мл, 0,1 мл препарата поликлональных IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,1 мл 0,9% раствора NaCl в контрольной пробе и 0,1 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01 М MgCl₂. Субстратно-буферная смесь инкубировалась в течение 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались путем электрофореза в агарозном геле согласно вышеописанной методике.

Субстратом реакции гидролиза ДНК *Chlamydia trachomatis* под влиянием IgG послужила ДНК, полученная путем амплификации. Модифицированный, клонированный в плазмиде, фланкированный праймерами СТ-1, СТ-2, выбранными в области генома криптоической плазмиды, фрагмент ДНК *Chlamydia trachomatis* амплифицировали по протоколу производителя тест-системы. Реакционная смесь состояла из 0,01 мл ДНК *Chlamydia trachomatis*, 0,01 мл IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,01 мл 0,9% раствора NaCl в контро-

ле и 0,01 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01М MgCl₂. Инкубацию проводили 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались методом электрофореза.

Также было произведено определение ДНКазной активности иммуноглобулинов с использованием смеси синтезированных нами согласно стандартному протоколу ПЦР-продуктов stx2e (733 пары оснований) и aggR (100 пар оснований).

ПЦР продукты представляют собой последовательности ДНК, соответствующие определенным генам кишечной палочки, stx2e представляет собой ген, кодирующий Shiga токсин 2Е [6], последовательность нуклеотидов aggR является транскрипционным регулятором энтеро-агрегативных штаммов *Escherichia coli* (ЕАЕС) [11].

Реакционная смесь (0,3 мл) состояла из 0,1 мл смеси ПЦР-продуктов, 0,1 мл препарата поликлональных IgG в концентрации 1 мг/мл или 0,1 мл 0,9% раствора NaCl в контрольной пробе и 0,1 мл буферного раствора 0,02 М Трис-НСl pH 7,4 с 0,01 М MgCl₂. Субстратно-буферная смесь инкубировалась в течение 20 часов при 37 °С. Результаты оценивались путем электрофореза в агарозном геле согласно вышеописанной методике.

Результаты

При исследовании ДНКазной активности методом риванолового сгустка у пациентов с РА установлено наличие ДНКазной активности иммуноглобулинов, уровни которой превышают ($p < 0,01$) контрольные величины. ДНКазная абзимная активность у пациентов с РА превышает ($p < 0,01$) значения данной активности у пациентов с РеА (табл. 1).

Выявлена взаимосвязь ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью поликлональных IgG и оценкой общего состояния здоровья пациентом по ВАШ ($r = 0,27$), оценкой активности заболевания по шкале Ликкерт ($r = 0,30$), а также между

удельной ДНКазной активностью поликлональных IgG и уровнем СОЭ ($r = 0,42$). При оРеА отмечена зависимость ($p < 0,05$) между ДНКазной активностью поликлональных IgG и уровнем ЦИК ($r = 0,42$), количеством Т-лимфоцитов ($r = 0,40$).

На рисунке 1 приведены результаты электрофореза продуктов реакции гидролиза ДНК под действием 3 препаратов (продукты реакции № 1-3) поликлональных иммуноглобулинов. Данные препараты были выделены от разных пациентов с ревматоидным артритом и обладали высокой (5 баллов) ДНКазной активностью, определенной методом риванолового сгустка. При электрофорезе в 1,5% агарозном геле наблюдалось разделение субстрата на высоко- и низкополимерную фракции (рис. 1 – 1, 4, 7). После 20 часов инкубации происходил полный гидролиз обеих фракций субстрата с образованием так называемого «шмера» (рис. 1 – 3, 6, 9).

На рисунке 2 представлены результаты оценки ДНКазной активности IgG, выделенных из сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом в отношении плазмидной ДНК *E. coli*. Исследуемые образцы IgG обладали различной способностью гидролизовать данный субстрат. Так, образец IgG одного пациента с рРА (рис. 2 – 4) полностью гидролизировал ДНК в течение 20 часов инкубации. Три других образца IgG (рис. 2 – 2, 3, 5) в большей степени воздействовали на суперскрученную фракцию плазмидной ДНК, приводя к образованию одноцепочечных разрывов и перехода суперскрученной ДНК в релаксированную форму по сравнению с контрольным образцом (рис. 2 – 1) в течение 20 часов.

При исследовании способности IgG гидролизовать ДНК *Chlamydia trachomatis* также принимали во внимание свойство молекулы ДНК изменять подвижность в агарозном геле в результате случайных одно- и двухцепочечных разрывов.

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ДНКазной АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgG

TABLE 1. DNase ACTIVITY LEVELS OF POLYCLONAL IgGs

Группы обследованных лиц Groups of involved patients	Уровни ДНКазной активности поликлональных IgG, баллы DNase activity of polyclonal IgG, units		
	Количество пациентов Patient number	Me (95% ДИ) Me (95% CI)	Range (Min-Max)
РА RA	64	4,00 (3,50;4,50)	3,00-5,00
РеА ReA	55	2,50 (2,00;3,00)	0,50-4,50
Здоровые лица Healthy controls	40	0,00 (0,00;0,50)	0,00-2,00

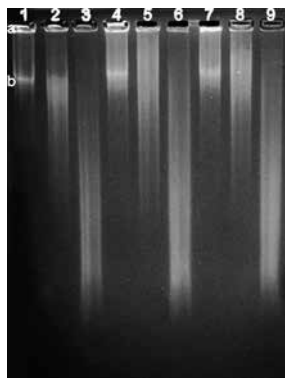


Рисунок 1. Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов реакции гидролиза ДНК тимуса теленка под действием поликлональных IgG

Примечание. 1 – субстратно-буферная смесь № 1 без инкубации (контроль), 2 – продукты реакции гидролиза ДНК № 1 через 5 часов инкубации, 3 – продукты реакции № 1 через 20 часов инкубации, 4 – субстратно-буферная смесь № 2 без инкубации (контроль), 5 – продукты реакции гидролиза ДНК № 2 через 5 часов инкубации, 6 – продукты реакции № 2 через 20 часов инкубации, 7 – субстратно-буферная смесь № 3 без инкубации (контроль), 8 – продукты реакции гидролиза ДНК № 2 через 5 часов инкубации, 9 – продукты реакции № 3 через 20 часов инкубации, а – высокополимерная фракция ДНК, б – низкополимерная фракция ДНК.

Figure 1. 1.5% Agarose gel electrophoresis of calf thymus DNA hydrolysis products induced by polyclonal IgG

Note. 1, substrate-buffer mixture No. 1 without incubation (control); 2, products of DNA sample No. 1 hydrolysis after 5 hours of incubation; 3, reaction products of sample No. 1 after 20 hours of incubation; 4, substrate-buffer mixture No. 2 without incubation (control); 5, products of the DNA hydrolysis reaction No. 2 after 5 hours of incubation; 6, reaction products of sample No. 2 after 20 hours of incubation; 7, substrate-buffer mixture No. 3 without incubation (control); 8, products of DNA hydrolysis reaction No. 2 after 5 hours of incubation; 9, reaction products of the sample No. 3 after 20 hours of incubation; a, high-molecular DNA fraction; b, low-molecular polymer fraction of DNA.

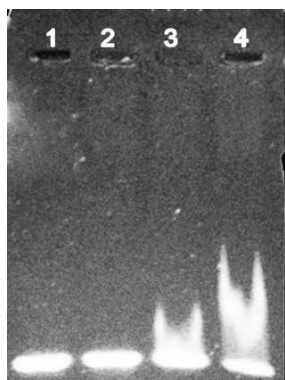


Рисунок 3. Результаты электрофореза продуктов распада ДНК *Chlamydia trachomatis* под действием IgG

Примечание. 1 – контрольный образец, 2 – продукты реакции IgG донора с ДНК *Chlamydia trachomatis*, 3, 4 – продукты реакции IgG пациентов с ревматоидным артритом с ДНК *Chlamydia trachomatis*.

Figure 3. Results of *Chlamydia trachomatis* DNA electrophoresis after hydrolysis by IgG

Note. 1, control sample; 2, donor IgG incubated with *Chlamydia trachomatis* DNA reaction products; 3, 4, DNA hydrolysis products obtained with IgG of patients with rheumatoid arthritis.

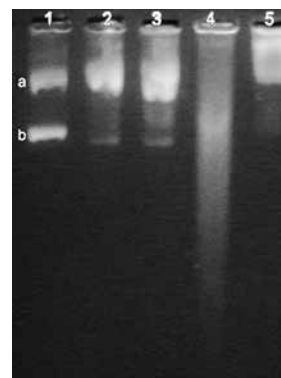


Рисунок 2. Результаты электрофореза продуктов распада плазмидной ДНК *E. coli* под действием IgG

Примечание. 1 – контрольный образец, 2, 3, 4, 5 – продукты реакции IgG с плазмидной ДНК, а – релаксированная фракция ДНК, б – суперскрученная фракция ДНК.

Figure 2. Results of *E. coli* plasmid DNA electrophoresis after hydrolysis by IgG

Note. 1, control sample; 2, 3, 4, 5, IgG reaction products with plasmid DNA; a, relaxed DNA fraction; b, supercoiled DNA fraction.

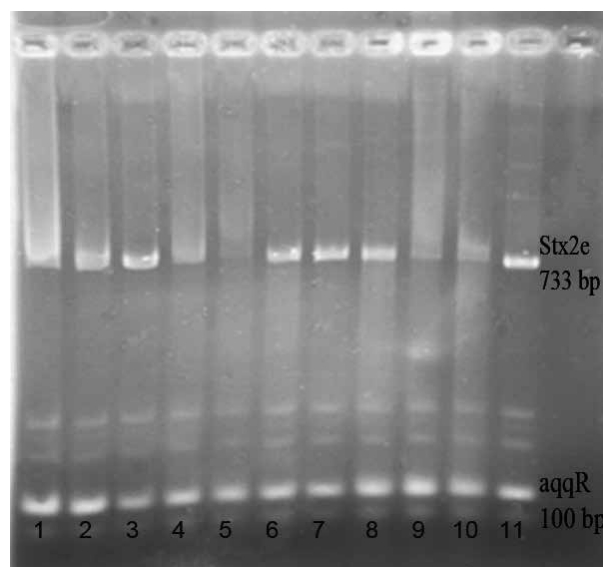


Рисунок 4. Результаты электрофореза продуктов распада ДНК ПЦР-продуктов под действием IgG

Примечание. 1-5 – продукты реакции IgG пациентов с ревматоидным артритом со смесью ПЦР-продуктов, 6-10 – продукты реакции IgG пациентов с реактивным артритом со смесью ПЦР-продуктов, 11 – отрицательный контроль.

Figure 4. Results of the of PCR- products electrophoresis after DNA hydrolysis induced by IgG

Note. 1 to 5, Results of IgG treatment (rheumatoid arthritis patients) upon a mixture of PCR products; 6 to 10, Results of IgG treatment from patients with reactive arthritis upon a mixture of PCR products; 11, negative control.

В опытных образцах наблюдали изменение подвижности амплифицированной ДНК *Chlamydia trachomatis* вследствие конформационных изменений (рис. 3 – 3, 4), в то время как в образце донора и контрольном образце ДНК мигрировала одной полосой (рис. 3 – 1, 2).

При исследовании способности иммуноглобулинов G гидролизовать ПЦР-продукты наблюдались неоднородные результаты реакции (рис. 4). Во-первых, разные препараты иммуноглобулинов демонстрировали различную степень гидролиза ДНК. Препараты 1, 4, 5 и 9 (рис. 4) полностью гидролизовали stx2e продукт с образованием «шмера». Препараты 2 и 10 гидролизовали данный ПЦР-продукт в меньшей степени. Гидролиз stx2e препаратами 3, 6, 7, 8 (рис. 4) был сопоставим с отрицательным контролем (рис. 4 – 11). Во-вторых, препараты иммуноглобулинов в меньшей степени гидролизовали короткий, длиной в 100 пар оснований aggR-продукт. Вероятно, это обусловлено избирательной способностью иммуноглобулинов гидролизовать ДНК-последовательности не короче определенной длины.

Обсуждение

Появление антител, обладающих ДНКазной активностью при аутоиммунных заболеваниях полностью не изучено. Феномен появления дезоксирибонуклеазной активности иммуноглобулинов при ревматических заболеваниях открывает новые иммуно-патогенетические механизмы, лежащие в основе хронического иммуноопосредованного воспаления. В данной работе мы продемонстрировали наличие неоднородной ДНКазной активности иммуноглобулинов по отношению к разным субстратам. Помимо ДНК тимуса телят, мы использовали бактериальную плазмидную ДНК и ПЦР продукты, синтезированные на основе бактериальных генов.

Учитывая значимое, но не прямое влияние инфекционных антигенов на развитие аутоиммунного процесса, следует предположить, что появление ДНКазных антител может быть спровоцировано повышением концентрации бактериальной ДНК в плазме крови. Известно, что бактериальная ДНК отличается от эукариотической большим содержанием гипометилированных CpG последовательностей. Установлено, что пациенты с СКВ имеют повышенные уровни циркулирующей ДНК, содержащей гипометилированные CpG-мотивы [8].

В свою очередь гипометилированные CpG последовательности ДНК активируют В-клетки через Toll-like рецептор 9. При этом запускается каскад реакций, который включает не только по-

ликлональную активацию В-клеток, но и секрецию провоспалительных цитокинов и устойчивость к апоптозу, что обуславливает выживание аутореактивных клеток при ревматоидном артрите и СКВ [13]. Недавно было установлено, что интерферон- γ играет важную роль в запуске синтеза антител В-клетками после активации CpG ДНК [12]. В то же время оказалось, что по содержанию неметилированных CpG транскрибируемый участок рибосомальной ДНК идентичен бактериальной ДНК и может подобным образом взаимодействовать с Toll-like рецептором 9 [17]. Это взаимодействие по принципу молекулярной мимикрии может лежать в основе выработки аутоантител к собственным рибонуклеопротеинам, а также провоцировать появление ДНКазных абзимов.

Оказалось, что CpG инициируют транскрипцию генов зародышевой линии C(gamma)1, C(gamma)2, и C(gamma)3 в активированных В-клетках через TLR9-опосредованный NF- κ B-зависимый путь, взаимосвязанный с IL-10 через STAT-белки и IFN-запускаемые факторы. Транскрипция C(gamma) гена вызывает повышение активности цитидин-деиминазы, ключевого элемента в механизме переключения классов иммуноглобулинов в В-клетках [14]. Таким образом, CpG ДНК, высвобождаемая при инфекционном процессе, может стимулировать аутоиммунные сдвиги путем переключения аутореактивных В-клеток с IgM на IgG изотип [7]. Кроме того, установлено, что этот каскад ингибируется хлорохином – препаратом, который снижает выраженность клинических проявлений IgG-опосредованных аутоиммунных заболеваний и в настоящее время используется в лечении СКВ и РА.

Учитывая эти сложные взаимосвязанные патогенетические пути, обнаружение дополнительных свойств иммуноглобулинов существенно расширяет представление о механизмах аутоиммунного воспаления. Нами обнаружена способность иммуноглобулинов гидролизовать различные ДНК-субстраты у пациентов с ревматоидным и реактивным артритом. Полученные данные о неоднородной способности ДНКазных абзимов гидролизовать разные ДНК-субстраты указывают на их определенную специфичность, особенно в отношении бактериальной ДНК. Для более детального изучения феномена ДНКазной активности необходимо исследовать профили специфичности к разным ДНК-субстратам для каждой нозологической формы, разработать методы количественного определения степени гидролиза. Это в дальнейшем позволит более детально изучить влияние определенных микроорганизмов в патогенезе аутоиммунных заболе-

ваний. Кроме этого, оптимизация определения ДНКазной активности позволит усовершенствовать имеющиеся и разработать новые диагностические методы.

Выводы

1. В сыворотке пациентов с ревматоидным артритом, реактивным артритом присутствуют

антитела, обладающие дезоксирибонуклеазной активностью.

2. ДНКазные абзимы проявляют гетерогенную способность гидролизовать различные ДНК-субстраты.

3. Абзимный гидролиз ДНК-субстратов длиной более 700 пар оснований более выражен по сравнению с ДНК-субстратами короткой (100 пар оснований) длины.

Список литературы / References

1. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И. Ферментативная активность антител при ранних артритах: патогенетическая роль и диагностические перспективы // Лечебное дело, 2014. Т. 40, № 6. С. 31-40. [Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov I.I. Enzymatic activity of antibodies in early arthritis: pathogenetic role and diagnostic perspectives. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2014, Vol. 40, no. 6, pp. 31-40. (In Russ.)]
2. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И. Нуклеазная активность поликлональных иммуноглобулинов класса G у пациентов с ранним ревматоидным артритом // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2012. № 1. С. 12-18. [Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov I.I. Nuclease polyclonal IgG activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Immunopatologiya. Immunologiya. Allergologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2012, no. 1, pp. 12-18. (In Russ.)]
3. Конорев М.Р., Генералов И.И., Жильцов И.В., Генералова А.Г. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии: пат. 3205 Респ. Беларусь, МПК 6G 01 N 33/48; заявитель Витебск. гос. мед. инст-т. – заявл. 05.02.96; опубл. 30.12.99 // Официальный бюллетень Национального центра интеллектуальной собственности, 1999. № 3. С. 121. [Konorev M.R., Generalov I.I., Zhiltsov I.V., Generalova A.G. A method for purifying class G polyclonal immunoglobulins from blood serum and an affinity chromatography device. Patent. 3205 Belarus, 6G 01 N 33/48. Official Bulletin of National center of intellectual property, 1999, no. 3, p. 121. (In Russ.)]
4. Кундер Е.В., Волкова М.В., Генералов И.И., Невинский Г.А. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость дезоксирибонуклеазной активности поликлональных IgG и сыворотки крови при спондилоартритах // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 337-346. [Kunder E.V., Volkova M.V., Generalov I.I., Nevinsky G.A. Clinical and diagnostic significance of deoxyribonuclease activity of polyclonal IgG and blood sera in patients with spondyloarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no 4-5, pp. 337-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-337-346.
5. Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии // Биомедицинская химия, 2007. Т. 53, № 5. С. 488-496. [Cherepanova A.V., Tamkovich S.N., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Blood deoxyribonuclease activity in health and diseases. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2007, Vol. 53, no. 5, pp. 488-496. (In Russ.)]
6. Beutin L., Kruger U., Krause G., Miko A., Martin A., Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2E-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl. and Environment. Microbiol.*, 2008, Vol. 74, no. 15, pp. 4806-4816.
7. He B., Qiao X., Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 7, pp. 4479-4491.
8. Krieg A.M. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J. Clin. Immunol.*, 1995, Vol. 5, no. 6, pp. 284-292.
9. Kundzer A.V., Volkava M.V., Bogdanos P., Rodiger S., Schierack P., Generalov I., Nevinsky G.A., Roggenbuck D. DNase activity of polyclonal IgG – a putative serological marker in patients with spondyloarthritides. *Immunol. Res.*, 2013, Vol. 56, no. 2-3, pp. 457-464.
10. Martinez-Valle F., Balada E., Ordi-Ros J., Bujan-Rivas S., Sellas-Fernandez A., Vilardell-Tarres M. DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutic features. *Lupus*, 2009, Vol. 18, pp. 418-442.
11. Morin N., Araceli E. Santiago, Robert K. Ernst, Stacey J. Guillot, Nataro J. Characterization of the AggR Regulon in Enterococcal *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2013, Vol. 81, no. 1, pp. 122-132.
12. Oganessian G., Saha S.K., Pietras E.M., Guo B., Miyahira A.K., Zarnegar B., Cheng G. IRF3-dependent type I interferon response in B cells regulates CpG-mediated antibody production. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 2, pp. 802-808.
13. Rudnicka W., Burakowski T., Warnawin E., Jastrzebska M., Bik M., Kontny E., Chorazy-Massalska M., Radzikowska A., Buler M., Maldyk P., Maslinski W. Functional TLR9 modulates bone marrow B cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 5, pp. 1211-1220.

14. Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, no. 9, pp. 2541-2550.
15. Schourov D.V., Gololobov G.V., Makarevich O.I., Yadav R.P., Chernova E.A., Nevinsky G.A., Prokaeva T.B., Alekberova Z.S., Gabibov A.G. DNA-hydrolyzing autoantibodies in autoimmune pathologies. *Ann. of the New York Academy of Sciences*, 2005, Vol. 750, pp. 255-264.
16. Tsukumo S., Yasutomo K. DNase I in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, pp. 14-18.
17. Veiko N.N., Shubaeva N.O., Ivanova S.M., Speranskii A.I., Lyapunova N.A., Spitkovskii D.M. Blood serum DNA in patients with rheumatoid arthritis is considerably enriched with fragments of ribosomal repeats containing immunostimulatory CpG-motifs. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2006, Vol. 142, no. 3, pp. 313-316.
18. Volkava M.V., Kundzer E.V., Generalov I.I. Enzymatic DNase and hyaluronidase serum activity in patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, Suppl. 3, p. 376.

Авторы:

Волкова М.В. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Кундер Е.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры кардиологии и ревматологии ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Генералов И.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Петрович Д.М. — соискатель кафедры кардиологии и ревматологии ГУО «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Volkova M.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, The Research Laboratory, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Kunder A.V., PhD (Medicine), Professor, Professor, Department of Cardiology and Rheumatology, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Generalov I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Microbiology, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Petrovich D.M., Postgraduate Student, Department of Cardiology and Rheumatology, Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 09.02.2017
Отправлена на доработку 22.02.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 09.02.2017
Revision received 22.02.2017
Accepted 02.05.2017