

Клещевой энцефалит: иммунологические показатели возможного перехода острой стадии в хроническое течение болезни

Гусев Е.И.¹, Пархоменко Т.А.^{2,3}, Бунева В.Н.^{2,3}, Доронина О.Б.⁴, Доронин В.Б.⁵, Генералов И.И.⁶, Доронин Б.М.⁴, Невинский Г.А.^{2,3}

Tick-borne encephalitis: immunological indicators of possible transformation of acute process into chronic disease

Gusev Ye.I., Parkhomenko T.A., Buneva V.N., Doronina O.B., Doronin V.B., Generalov I.I., Doronin B.M., Nevinsky G.A.

¹ Российский государственный медицинский университет, г. Москва

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

³ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск

⁵ Институт терапии СО РАМН, г. Новосибирск

⁶ Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

© Гусев Е.И., Пархоменко Т.А., Бунева В.Н. и др.

Ряд аутоиммунных заболеваний с хроническим течением характеризуются обнаружением в крови больных ДНК-аутоантител, в то время как их не содержит кровь здоровых доноров или пациентов с острым течением заболеваний, незначительным нарушением иммунного статуса, без определенной склонности к переходу в хронический процесс. Клещевой энцефалит (КЭ) не рассматривался с этих позиций. Предварительно для данной работы проведен поиск достаточно точных критериев обнаружения ДНК-активности антител иммуноглобулина (Ig) G из сыворотки крови больных КЭ и здоровых доноров. Показано, что относительная активность антител IgG значительно варьирует у пациентов, но большинство образцов (91%) имели определяемый уровень ДНКазной активности. Поликлональные ДНКазные антитела IgG не активировались в присутствии ЭДТА или после диализа с ЭДТА, но могли активироваться некоторыми добавленными ионами металлов с уровнем активности, уменьшающимся в ряду $Mn^{2+} + Ca^{2+} \geq Mn^{2+} + Mg^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Mg^{2+} + Ca^{2+} \geq Co^{2+} \geq Mg^{2+} > Ca^{2+}$, в то время как K^+ , Na^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} не стимулировали гидролиз ДНК. Аффинная хроматография на ДНК-целлюлозе разделила ДНКазные антитела IgG на множество субфракций с различным сродством к ДНК и очень разными уровнями относительной активности. Возможные причины каталитического разнообразия поликлональных человеческих аутоантител обсуждаются.

Ключевые слова: вирусные инфекции, клещевой энцефалит, абзимы, гидролиз ДНК.

Several autoimmune diseases with chronic clinical course are characterized by detection of DNA autoantibodies in patients' serum, while there are no such IgGs in healthy donors' blood or in patients with acute clinical course with no evidence of chronization. Tick-borne encephalitis has not been considered this way. Several strict criteria have been applied to show that the DNase activity is an intrinsic property of IgGs from the sera of TBE patients but not from healthy donors. The relative activity of IgGs has been shown to vary extensively from patient to patient, but most of the preparations (91%) had detectable levels of the DNase activity. Polyclonal DNase IgGs were not active in the presence of EDTA or after a dialysis against EDTA, but could be activated by several externally added metal ions, with the level of activity decreasing in the order $Mn^{2+} + Ca^{2+} \geq Mn^{2+} + Mg^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Mg^{2+} + Ca^{2+} \geq Ca^{2+} \geq Mg^{2+} > Ca^{2+}$, while K^+ , Na^+ , Ni^{2+} , Zn^{2+} , and Cu^{2+} did not stimulate DNA hydrolysis. Affinity chromatography on DNA-cellulose separated the DNase IgGs into many subfractions with various affinities for DNA and very different levels of the relative activity. Possible reasons for catalytic diversity of polyclonal human Abzs are discussed.

Key words: viral infections, tick-borne encephalitis, abzymes, DNA hydrolysis.

УДК 616.988.25-002.954.2-097-036.11-06-002.2

Введение

Известно, что сыворотка крови при различных заболеваниях содержит ДНК и анти-ДНК-антитела [53], так же как и РНК и анти-РНК-антитела [11, 21, 22, 52]. Даже

в сыворотке крови здоровых млекопитающих можно определить анти-ДНК-антитела, но их титры значительно различаются [53]. В сравнении со здоровыми донорами концентрации анти-ДНК-антител выше у пациен-

тов

с системной красной волчанкой (СКВ; 36% больных), рассеянным склерозом (17—18%), первичным синдромом Шегрена (18%), тиреоидитом Хасимото (23%), миастенией (6%) и ревматоидным артритом (7%) [53]. Множество анти-ДНК-антител при СКВ направлено против нуклеосомальных комплексов гистоны-ДНК, появляющихся в кровеносном русле после апоптоза [17].

Иммунизация животных при помощи ДНК или РНК и в особенности их комплексов с белками ведет к продукции анти-ДНК- и анти-РНК-антител [19, 29, 34, 37]. Во время множества заболеваний, вызванных бактериальной или вирусной инфекцией, человеческий организм встречается с различными бактериальными компонентами, включая белки, ДНК, РНК, липиды и полисахариды. Сыворотка крови животных, инфицированная различными бактериями [20, 35, 36, 60, 61] или бактериальными патогенами [12, 62], содержит множество антител к микробным антигенам и липидам хозяина, белкам и компонентам ядра, включающим анти-ДНК-антитела. Происхождение анти-ДНК-антител связано с инфекциями, которые остаются незаметными; некоторые из них могут случайно проявляться во время нормального иммунного ответа в результате индукции антителами, которые имеют структуры, имитирующие ДНК, белки и др. [62]. Похожая ситуация может происходить с вирусной инфекцией.

Искусственные абзимы (каталитические антитела против аналогов переходного состояния химических реакций) и природные абзимы являются новыми биологическими катализаторами, которые привлекают внимание исследователей в последние годы [23, 38—41]. Предполагалось, что абзимы играют важную роль при формировании специфических патогенетических паттернов и клинических установок в различных аутоиммунных состояниях через свои расширенные аутоантительные свойства [23]. Природные абзимы, гидролизующие ДНК, РНК, полисахариды, олигопептиды и белки, представлены в сыворотке крови больных различными аутоиммунными и вирусными заболеваниями [38—41]. Здоровые люди не вырабатывают абзимы с ДНКазной и РНКазной активностью, которую можно обнаружить, их уровни обычно находятся на границе чувствительности тех методов, с помощью которых их определяют [7, 8, 54].

Антитела, гидролизующие вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) у больных астмой, могут оказывать важное влияние на патогенез, уменьшая концентрацию ВИП, который, в свою очередь, играет большую роль в патофизиологии астмы [47]. Аналогичные сериновым протеазам металлзависимые протеолитические антитела типов IgG, IgM и IgA от больных рассеянным склерозом гидролизуют основной белок миелина, который в избытке содержится в миелин-протеолипидной аксональной оболочке, и поэтому может иметь значение в патогенезе этой аутоиммунной патологии [48—50]. ДНКазные абзимы у больных СКВ, лимфопролиферативными заболеваниями [24], рассеянным склерозом [38] и гидролизующий ДНК белок Бенс-Джонса у больных множественной миеломой [24] являются цитотоксическими, вызывают ядерную фрагментацию ДНК и индуцируют клеточную смерть путем апоптоза. Поэтому не исключено, что ДНКазные абзимы также играют немалую роль в патогенезе не только различных аутоиммунных заболеваний, но еще и различных вирусных инфекций [38—41]. Из-за их способности связывать различные чужеродные антигены, принадлежащие как бактериям, так и вирусам, природные абзимы могут быть главными в первой линии защиты против инфекций. Было показано, что присутствие антител IgG с активностью, аналогичной сериновым протеазам, которые гидролизуют мелкие пептиды в сыворотке, четко коррелирует с выживаемостью после сепсиса [32]. Обнаружено, что сыворотка ВИЧ-инфицированных пациентов содержит фракции IgG, специфически гидролизующие только вирусные интегразы [5] или обратные транскриптазы [46], но не влияющие на многие другие проверенные белки. В то же время сыворотка этих больных содержит IgG, расщепляющие ДНК и специфически гидролизующие человеческий казеин и альбумин [46]. Поэтому вирусы могут стимулировать иммунную систему человека на продукцию абзимов не только к вирусным белкам, но и к некоторым антигенам белков хозяина, преимущественно при условиях, когда возможен переход в хроническую стадию течения болезни.

Инфицирование вирусом КЭ центральной нервной системы проявляется широким спектром клинических признаков, в некоторых случаях заболевание становится хроническим [30]. Антитела, продуцируемые при КЭ, направлены не только на вирусные компонен-

ты, но также и на орган-неспецифические аутоантигены, при этом наблюдается развитие аутоиммунного процесса. В данной работе предлагается анализ возможных корреляций между относительными титрами анти-ДНК-антител и ДНК-гидролазной активностью IgG у больных КЭ и сравнение активности ДНКазы при этой вирусной инфекции и при различных аутоиммунных заболеваниях.

Материал и методы

Большинство химических веществ, белков, белок A-Sepharose и колонка Superdex 200 HR 10/30 были произведены компаниями Sigma (США) или GE Healthcare, ДНК-целлюлоза с глютаратом — компанией «НИКТИ БАВ» (Россия). Практически гомогенная ДНКазы I (около 1 500 Kunitz ед./мг) была получена из человеческой мочи в соответствии с Н. Такака и соавт. [58] с некоторыми модификациями.

Протокол забора крови был согласован с локальным этическим комитетом больницы. Сыворотка крови 10 здоровых доноров и 38 больных КЭ была использована для поиска ДНКазных абзимов. Клинический диагноз у больных был подтвержден полным набором физикальных и лабораторных данных. В случае укуса большого клещом диагноз КЭ подтверждался с помощью определения вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментным анализом (ИФА) для IgM и IgG к вирусу КЭ и наблюдением клинических проявлений заболевания. Пациенты также обследовались на клещевой боррелиоз и другие острые инфекционные заболевания. В дополнение к этому были проведены общий анализ крови, мочи, офтальмоскопия, рентгенография легких и спиральная компьютерная томография головного мозга. Кровь забиралась в течение 1—3 сут после поступления в больницу. Затем больные получали стандартное лечение в соответствии с современными требованиями по терапии КЭ.

Титры анти-ДНК-антител определялись с помощью стандартной матрицы с фиксированной двухспиральной ДНК, связанными с пероксидазой хрена мышинными антителами к человеческому IgG и тетраэтилбензидином в качестве субстрата в соответствии с D.I. Polosukhina и соавт. [48]. Реакция была остановлена с помощью серной кислоты, оптическая плотность (A_{450}) раствора определялась с использованием аппарата Uniskan II (MTX Lab Systems, США). Относительные концентрации анти-ДНК-антител в образцах крови вы-

ражались как разница относительной спектральной поглощательной способности при 450 нм (среднее из трех измерений) между тестируемым и контрольным образцами; контроли, использующие ДНК без антител и с антителами, не взаимодействовавшими с ДНК, от здоровых людей давали одинаковые результаты.

Электрофоретически и иммунологически гомогенные IgG были получены с помощью последовательной аффинной хроматографии сывороточных протеинов на белке G-Sepharose и гельфильтрации (FPLC), как описано в источнике, с некоторыми изменениями [7, 8, 48, 49]. Сыворотка крови была помещена на колонку белка G-Sepharose (5 мл), сбалансированного в буфере А (150 ммоль NaCl, 50 ммоль трис-HCl, pH 7,5). Колонка была промыта буфером А до нулевой оптической плотности (A_{280}). Неспецифически связанные белки были элюированы тем же самым буфером (25 мл), но содержащим 1%-й Triton X-100 и NaCl (0,3 моль), и затем колонка была отмыта буфером А до нулевой оптической плотности. IgG были элюированы буфером глицин-HCl с концентрацией 0,1 моль (pH 2,6), фракции были помещены в охлажденные пробирки, содержащие 50 мкл трис-HCl с концентрацией 0,5 моль (pH 9,0), затем каждая фракция была дополнительно нейтрализована этим буфером и проведен диализ с трис-HCl концентрацией 50 моль буфером (pH 7,5), содержащим KCl (0,1 моль). Чтобы защитить приготовленные антитела от контаминации бактериями, они были стерилизованы фильтрацией через фильтр Миллекс (размер пор 0,2 мкм). Белок, соответствующий центральной части IgG, был собран и использован для дальнейшей очистки.

Имуноглобулины класса G выдерживались в буфере глицин-HCl с концентрацией 50 ммоль (pH 2,6), содержащем NaCl с концентрацией 0,2 моль, в течение 20 мин при температуре 25 °С. Разделение IgG под воздействием «кислотного шока» было проведено методом гельфильтрации (FPLC) с использованием колонки Superdex 200 HR 10/30, уравновешенной буфером глицин-HCl с концентрацией 50 ммоль (pH 2,6), содержащим раствор NaCl концентрацией 0,1 моль, как было описано ранее [48, 49]. Далее фракции собирали, нейтрализовали и стерилизовали, как описано выше. Через 1—2 нед хранения при температуре 4 °С для разворачивания после «кислотного шока» антитела использовались в тестах на активность, описанных ниже.

В некоторых случаях электрофоретически гомогенные IgG подвергались хроматографии на сефарозе с фиксированными поликлональными мышинными IgG к человеческим IgG. Белок наносился на колонку (1 мл), уравновешенную трис-НСl в концентрации 20 ммоль (рН 7,5), содержащим NaCl (0,1 моль), и затем колонка отмывалась тем же буфером, содержащим раствор NaCl концентрацией 0,3 моль. Антитела были элюированы в глицин-НСl концентрацией 0,1 моль (рН 2,6), нейтрализованы, подвергнуты диализу и стерилизованы, как описано выше.

ДНК-гидролазная активность изучалась с использованием сверхспиральной ДНК, как описано ранее для анализа ДНКазы I, ДНКазы II [9, 33, 57] и каталитических антител человеческой сыворотки [26—27, 40—46]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 18 мкг/мл сверхспиральной ДНК pBluescript, 3—5 ммоль MgCl₂, 1 ммоль ЭДТА, 20 ммоль трис-НСl (рН 7,5) и 0,005—0,2 мг/мл антител и была выдержана в течение 0,5—40 ч (стандартное время 2 ч) при температуре 37 °С. Зависимость относительной ДНКазной активности от концентрации ионов Me²⁺ исследовалась с помощью различных солей: KCl, NaCl, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, CuCl₂, CoCl₂, NiCl₂ или ZnCl₂ (каждая по 0,005—20 ммоль).

Продукты расщепления определялись с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле. Изображения окрашенного бромидом этидия геля были получены с помощью камеры Sony DSC-F717 (Япония), относительное количество ДНК подсчитывалось с помощью программы ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). Все количественные измерения относительной активности антител выполнены в соответствии с общими способами определения специфической активности ферментов [16]. Активность препаратов IgG определялась как убывание части ДНК, переведенной из первичной сверхспиральной формы в релаксированную форму (и иногда дополнительно в линейную форму), с поправкой на распределение ДНК между этими группами в контроле (инкубация pBluescript в отсутствие антител). Все измерения (начальные скорости) сделаны в линейный промежуток периода действия (15—40% гидролиза ДНК), и полный переход сверхспиральной плазмидной ДНК в разрезанную форму (18 мкг/мл соответствуют 6,0 нмоль) через 1 ч был принят за 100%-ю активность. Если он был низким (менее 5—10% исчезновения сверхспиральной ДНК), то инкубация удлинялась на 3—40 ч в зависимости от образца. Если деградация

сверхспиральной ДНК через 2 ч инкубации превышала 50%, то концентрация антител снижалась в зависимости от образца. Этот подход позволил стандартизировать относительную активность как в случае определения специфической активности ферментов [16], так и при любом стандартном состоянии, например, 1 мг/мл ($6,7 \cdot 10^{-6}$ моль) IgG и 1 ч инкубации. В этом случае 100%-я ДНКазная активность соответствует специфической активности антител (1 нмоль гидролизованной ДНК в час на 1 мг антител), и несомненное значение k_{cat} этой реакции при фиксированных концентрациях IgG и ДНК равно приблизительно $2,5 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹.

В некоторых экспериментах иммуноглобулины класса G были экстенсивно подвергнуты диализу в буфере трис-НСl с концентрацией 50 ммоль (рН 7,5), содержащем 0,1 моль ЭДТА и 0,1 моль ЭГТА, и потом 3 раза в буфере трис-НСl с концентрацией 50 ммоль (рН 7,5); до эксперимента ионы металлов удалялись из всех растворов с помощью колонки Челекс на 5 мл. Относительная активность этих препаратов определялась, как описано выше, с использованием стандартной реакционной смеси. Зависимость относительной активности от концентраций ионов Me²⁺ исследовалась с помощью различных солей MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, CuCl₂, CoCl₂, NiCl₂ или ZnCl₂ (каждая по 0,005—20 ммоль).

Анализ антител на гомогенность SDS-PAGE был выполнен в неразделяющем 5—16%-м градиентном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), а для полипептидного спектра в разделяющем 12%-м геле, содержащем 0,1% SDS и 50 ммоль дитиотреитола (система Лэммли), как описано в источниках [1—3, 6]. Полипептиды визуализировались серебряным окрашиванием и Вестерн-блоттингом на нитроцеллюлозной мембране [1—3, 6].

ДНКазная активность IgG после анализа SDS-PAGE исследовалась в геле, содержащем ДНК из тимуса телят (5 мкг/мл), как описано в источнике [1—3, 6]. До электрофореза образцы IgG инкубировались при температуре 22 °С в течение 10—20 мин в буфере трис-НСl концентрацией 20 ммоль (рН 7,5), содержащем 0,1% SDS. Чтобы восстановить ферментную активность после SDS-PAGE, SDS удалялся путем инкубации геля в течение 1 ч при температуре 22 °С в буфере трис-НСl с концентрацией 20 ммоль (рН 7,5) и пятикратного промывания в том же буфере. Чтобы развер-

нуть белок после воздействия SDS и протестировать на ДНКазную активность, продольные срезы геля инкубировались при 25 °С в течение 15—48 ч в буфере, содержащем 20 ммоль трис-НСl (рН 7,5), 4 ммоль MgCl₂ и 0,2 ммоль CaCl₂. Чтобы визуализировать продукты ДНК-гидролиза, гель окрашивали бромидом этидия. Те же окрашенные бромидом этидия или параллельные продольные срезы использовались, чтобы определить позицию IgG в геле с помощью окрашивания Coomassie Blue.

Электрофоретически гомогенные IgG помещались на колонку ДНК-целлюлозы (3—5 мл) уравновешенной трис-НСl с концентрацией 20 ммоль (рН 7,5), затем колонка отмывалась тем же буфером до нулевой оптической плотности. Белки элюировались тем же буфером, содержащим другую концентрацию NaCl (0,05—3 моль), 2 моль MgCl₂ и 50 ммоль глицин-НСl (рН 2,6), как в источнике [44—46]. Иммуноглобулины класса G были собраны, подвергнуты диализу в буфере трис-НСl концентрацией 10 ммоль (рН 7,5), содержащем 0,1 моль NaCl, сконцентрированы, и каждая фракция была использована в тесте на ДНКазную активность.

Реакционные смеси содержали стандартные компоненты и 4—200 нмоль свёрнутого рBluescript. Относительное количество ДНК (%) в группах, соответствующее свёрнутой (субстрат) и релаксированной (продукт реакции) ДНК, оценивалось, как описано выше, и затем релевантное количество (нмоль) релаксированной ДНК вычислялось, используя концентрацию ДНК в каждой реакционной смеси. Значения K_M и V_{max} (k_{cat}) вычислялись исходя из зависимостей V в сравнении с [ДНК] с помощью метода наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Microcal Origin 5.0 и представлены в виде линейных преобразований с помощью графика Lineweaver—Burk [16]. Ошибки в значениях были в пределах 10—30%.

Результаты представлены как среднее значение M и стандартное отклонение SD как минимум трех независимых экспериментов для каждого образца IgG. Отличия между образцами IgG были проанализированы с помощью t -критерия Стьюдента, уровень $p < 0,05$ принимался как статистически достоверный.

Результаты

Титры анти-ДНК антител у здоровых доноров определялись и варьировали от 0,03 до 0,13 A₄₅₀ единиц

(0,11 ± 0,05). Среди 38 больных КЭ уровень анти-ДНК-антител варьировал в более широком диапазоне: A₄₅₀ = 0,09—0,95 (0,4 ± 0,07). У 31% больных КЭ уровень анти-ДНК-антител превышал самый высокий уровень, обнаруженный в группе доноров. Этот результат согласуется с литературными данными, в которых говорится, что сыворотка здоровых людей обычно содержит различные аутоантитела, включая антитела, взаимодействующие с ДНК [10, 42]. Титры анти-ДНК-антител у здоровых людей, определенные в этой работе, могут быть завышены, так как фиксированная ДНК может взаимодействовать не только с антителами к ДНК, но также и с антителами к фосфолипидам, полисахаридам, белками клеточной стенки и др. [10, 14, 51]. В то же время, несмотря на предположение, что антитела к двухспиральной (нативной) ДНК являются серологическим признаком СКВ, показано, что концентрация анти-ДНК-антител выше только у 36% больных СКВ в сравнении со здоровыми донорами, и это число значительно ниже (7—17%) при других заболеваниях [53] (см. выше).

Фракции иммуноглобулинов класса G были по отдельности выделены из сыворотки крови 10 здоровых доноров и 38 больных КЭ. Гомогенность типичного IgG с молекулярной массой 150 кДа подтверждалась с помощью SDS-PAGE с окрашиванием серебром, которое показало единичную группу в концентрирующем геле и две группы, соответствующие H- и L-цепям после разделения (рис. 1,а).

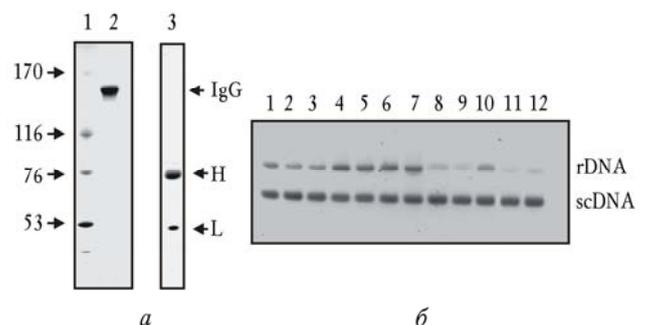


Рис. 1. SDS-PAGE анализ IgG из сыворотки крови больного КЭ

Сначала использовали 10 препаратов IgG, полученных от здоровых доноров, и подтвердили уже опубликованные данные [38—41], что иммуноглобулины класса G от здоровых людей не имеют определяемой ДНКазной активности. Хотя сыворотка здоровых доноров содержит аутоантитела, взаимодействующие с ДНК, они инактивируются даже после 24-

часовой инкубации сверхспиральной ДНК в присутствии 1 мг/мл IgG (рис. 1,б). Относительная активность IgG из сыворотки больных КЭ значительно варьирует от пациента к пациенту, но от 35 до 38 (92%) образцов имеют определяемую ДНКазную активность (например, рис. 1,б, дорожки 1—10). Было подтверждено, что ДНКазная активность является важным свойством иммуноглобулинов класса G от больных КЭ (см. ниже) и что антитела, полученные с помощью хроматографии на белке G-Sepharose и затем с помощью гель-фильтрации (FPLC), могут быть использованы для определения их относительной активности без дополнительной очистки.

На рис. 1,б показано расщепление плазмидной ДНК после 2-часовой инкубации с IgG (0,2 мг/мл), полученными от 10 больных КЭ в присутствии 5 ммоль $MgCl_2$. Интересно, что при этих условиях у больных не были найдены IgG для расщепления сверхспиральной ДНК на фрагменты. Получена только релаксированная плазмидная ДНК.

Чтобы количественно оценить ДНК-активность, определяли концентрацию каждого препарата IgG в соответствии с линейной частью уровня зависимости концентрации антител (условия реакции псевдопервого порядка) и время инкубации, достаточное, чтобы преобразовать сверхспиральную ДНК в релаксированную форму без фрагментации через 1—20 ч инкубации и последующего гидролиза ДНК в линейном промежутке периода действия (несколько дорожек на рис. 1,б). Так как все измерения (начальные скорости) были сделаны в линейный промежуток периода действия и кривых концентраций антител измеренные относительные активности для иммуноглобулинов класса G были приведены к стандартным условиям (0,1 мг/мл антител, 1 ч) и полное преобразование сверхспиральной ДНК в ее релаксированную форму было принято за 100%-ю ДНК-активность. Несмотря на то что три препарата иммуноглобулинов класса G против КЭ были абсолютно неактивны, остальные 35 образцов IgG показали относительную активность от 3 до 54% гидролиза сверхспиральной ДНК за 1 ч в присутствии 0,1 мг/мл антител; средняя относительная активность для всех 35 пациентов была $(21,6 \pm 17,8)\%$, или $(1,3 \pm 1,1) \cdot 10^{-2}$ нмоль расщепленной ДНК в час на 1 мг антител.

Из-за каталитического ускорения, которое позволяет увеличить количество циклов с более длитель-

ным временем реакции, обнаружение абзимной активности гораздо более чувствительно, чем определение концентрации анти-ДНК-антител с помощью ИФА [38—41]. До этого было показано, что возникновение абзимов, которые специфически гидролизуют ДНК, является одним из наиболее ранних и четких признаков аутоиммунной реакции при различных аутоиммунных заболеваниях, когда титры антител к ДНК или другим аутоантигенам еще значительно не увеличились и соответствуют уровням для здоровых доноров [3, 38—41]. Похожие результаты получены и для больных КЭ; только у 31% больных повысился уровень анти-ДНК-антител в сравнении со здоровыми донорами, в то время как ДНК-антитела были обнаружены у 92% больных.

Коэффициент корреляции между титрами анти-ДНК-антител (A_{450}) и относительной активностью антител равен 0,73 ($p < 0,05$).

Для доказательства того, что ДНК-активность IgG из сыворотки больных КЭ принадлежит антителам и не является следствием примеси других ферментов, применили несколько ранее разработанных критериев строгости [38—41, 47]. Они могут быть коротко изложены следующим образом: а) IgG были электрофоретически гомогенны (рис. 1,а); б) гель-фильтрация IgG в условиях диссоциирования прочных нековалентных комплексов в кислотном буфере (рН 2,6, рис. 2,а) не устраняет ДНКазную активность, и пики активности четко отслеживаются с помощью интактных IgG; в) фиксированные мышинные поликлональные IgG к легким цепям человеческих IgG полностью абсорбируют ДНК-активность, и эта активность соответствует только пикам IgG, элюированным кислотным буфером (рис. 2,б).

Чтобы исключить возможные артефакты из-за гипотетических признаков контаминированных ферментов, pIgG были подвергнуты SDS-PAGE в геле, сополимеризованном с ДНК из тимуса телят, и их ДНКазная активность определялась путем инкубирования геля в стандартном буфере (рис. 3). Окрашивание геля бромидом этидия после электрофореза и разворачивание IgG выявило четкие темные группы на флуоресцирующем фоне ДНК. На рис. 3 показаны пять типичных примеров IgG от больных КЭ (дорожки 5—9); гидролиза ДНК контрольными антителами от здоровых доноров не было (дорожки 3—4). Контрольная человеческая ДНКазы I также расщепила ДНК (рис. 3, дорожка 2), но создала

группу четко ниже расположенных (35—40 кДа) интактных pIgG (150 кДа). Так как SDS расщепляет все белковые комплексы, определение активности области геля, соответствующей только интактным IgG, вместе с отсутствием какой-либо другой активной группы или белковой группы (рис. 3) дает четкое доказательство, что pIgG КЭ гидролизуют ДНК и не контаминируются канонической ДНКазой. Также были применены некоторые другие критерии строгости (см. ниже).

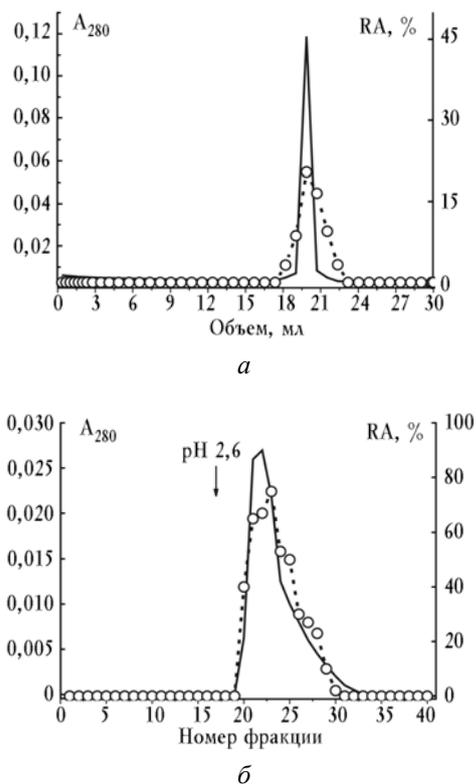


Рис. 2. ДНКазная активность антител к КЭ — свойство IgG

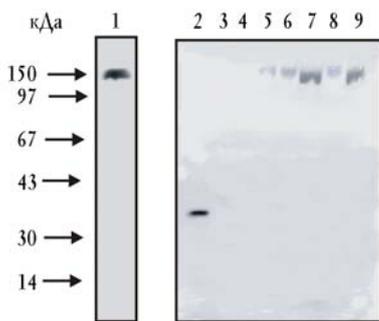


Рис. 3. ДНКазная активность pIgG больных КЭ, здоровых доноров и ДНКазы I

Множество про- и эукариотических ДНКаз, включая и человеческую ДНКазу I, являются Me^{2+} -зависимыми энзимами, хотя другие ДНКазы, включая ДНКазу II [33, 57] и некоторые субфракции ДНКазных sIgA из человеческого молока [38—42], являются Me^{2+} -независимыми. Как показано ранее, используя ядерную эмиссионную спектроскопию с помощью двухструйного дугового плазматрона [49], электрофоретически гомогенные IgG из сыворотки человека после всех стадий стандартной очистки содержат небольшие количества связанных ионов металлов, их относительное содержание уменьшается в ряду $Cu > Fe > Ni > Co > Mn > Ca > Zn > Mg$. Даже если процедура очистки антител стандартизована, соответствующие количества этих ионов значительно отличаются между отдельными индивидуумами [49]. Учитывая это, в первую очередь проанализировали относительную активность препаратов IgG КЭ в присутствии и отсутствие ЭДТА и после экстенсивного диализа антител с ЭДТА и ЭГТА. При отсутствии добавленных ионов Me^{2+} существенный гидролиз сверхспиральной ДНК 20 препаратами IgG в их повышенных концентрациях 0,4 мг/мл происходит только через 20 ч инкубации, но после добавления ЭДТА или диализа с ЭДТА и ЭГТА антитела окончательно теряют свою активность (рис. 4,а).

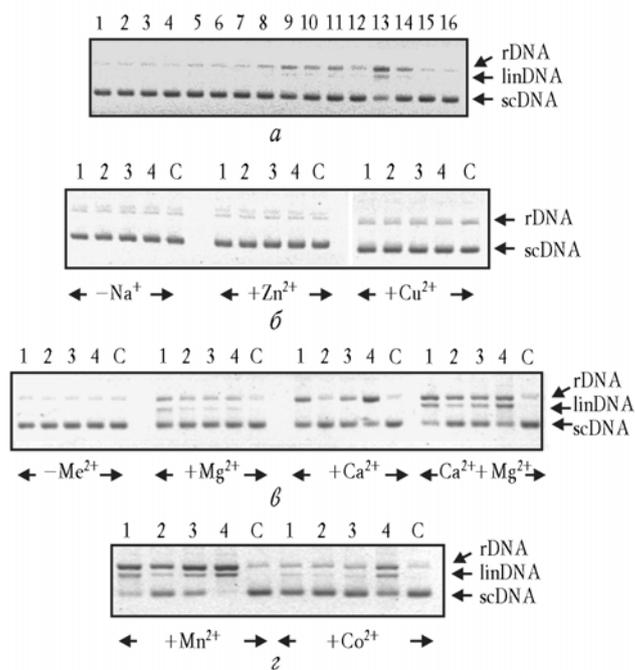


Рис. 4. ДНКазная активность pIgG больных КЭ в отсутствие ионов металлов (а) и с ионами металлов (б—з)

Используя различное время инкубации и концентрации антител, семь rIgG КЭ с сопоставимыми уровнями относительной активности были протестированы более детально (табл. 1). При отсутствии добавленных ионов Me^{2+} относительные активности не подвергнутых диализу IgG варьировали от 0,05 до 3,7% ($(1,1 \pm 1,2)\%$), и после добавления $MgCl_2$ (5 ммоль) они увеличились в зависимости от анализируемых IgG (средний фактор увеличения активности $97,2 \pm 172,7$) до уровня относительной активности 11,8—26,5% (в среднем $(19,5 \pm 6,9)\%$; табл. 1). Удаление связанных ионов металлов с помощью диализа семи IgG с ЭДТА и ЭГТА приводило к полной потере их активности, а добавление 5 ммоль $MgCl_2$ к антителам восстанавливало их ДНКазную активность. В табл. 1 показано, что не только добавление Mg^{2+} ивне, но также и различные связанные ионы металлов могут оказывать влияние на относительную активность ДНКазных IgG КЭ, включая активацию или ингибирование Mg^{2+} -стимулированной активности в зависимости от образца IgG.

Относительные активности, соответствующие пяти диализованным образцам антител (IgG8—IgG12), были измерены после добавления различных ионов металлов. На рис. 5 показан типичный пример зависимости начального уровня концентрации Mg^{2+} , Ca^{2+} и Mn^{2+} для IgG8; в присутствии тех же ионов Me^{2+} IgG9—IgG12 демонстрируют те же зависимости. Относительные активности подвергнутых диализу препаратов IgG сравнивались с фиксированной концентрацией (3 ммоль) различных добавленных Me^{2+} -ионов (табл. 2).

Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Ni^{2+} существенно не активировали антителозависимый гидролиз сверхспиральной ДНК (рис. 4,б и табл. 2). Относительная активность в присутствии Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} значительно варьирует между IgG; средние значения относительной активности увеличиваются в ряду $Co^{2+} < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Mn^{2+}$ (табл. 2). Интересно, что повышение концентрации Ca^{2+} при фиксированной концентрации Mg^{2+} на уровне 3 ммоль значительно усиливает гидролиз ДНК, эта зависимость достигает максимума при 1 ммоль $CaCl_2$.

Таблица 1

Относительная активность IgG, очищенных из сыворотки крови различных больных КЭ и затем диализованных с ЭДТА*, %

Номер IgG	Относительная активность IgG, не подвергнутых диализу с ЭДТА			Относительная активность IgG, диализованных с ЭДТА		
	В отсутствие Mg^{2+} (I)	Добавлено 5 ммоль Mg^{2+} (II)	Отношение (II) к (I)	В отсутствие Mg^{2+} (III)	Добавлено 5 ммоль Mg^{2+} (IV)	Отношение (II) к (IV)
1	0,12*	12,50*	103,60	0	17,40*	0,72
2	0,48	11,80	24,60	0	4,00	2,90
3	1,10	26,60	25,10	0	13,30	2,00
4	1,10	25,60	23,40	0	23,30	1,10
5	0,05	24,10	482,00	0	24,20	1,00
6	3,70	23,60	6,40	0	18,20	1,30
7	0,78	12,10	15,50	0	6,10	1,98
$M \pm SD$	$1,10 \pm 1,20$	$19,50 \pm 6,90$	$97,20 \pm 172,70$	0	$15,20 \pm 7,90$	$1,57 \pm 0,76$

Примечание. Реакционные смеси инкубировались в течение 1—40 ч в присутствии 0,05—0,8 мг/мл IgG; относительные активности были пересчитаны для стандартных условий, и полный гидролиз 17 мкг/мл сверхспиральной ДНК через 1 ч после инкубации в присутствии 0,1 мг/мл IgG был принят за 100%.

* Для каждого значения представлено среднее из трех измерений; ошибка не превышает 10%.

Таблица 2

Относительные активности индивидуальных IgG, выделенных из сыворотки крови различных больных КЭ, диализованных с ЭДТА и затем тестированных в присутствии различных ионов металлов*, %

Ионы металлов	Относительная активность						$M \pm SD$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
K^+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Na^+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zn^{2+}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ni^{2+}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cu^{2+}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Co^{2+}	24,7	16,6	22,6	55,0	н/о	29,7 ± 12,6	
Mg^{2+}	30,5	19,0	5,7	30,2	8,9	18,9 ± 9,2	

Ca ²⁺	11,0	1,9	6,6	11,3	3,5	6,9 ± 3,4
Mn ²⁺	47,0	47,8	33,6	52,0	53,3	46,7 ± 5,3
Mg ²⁺ + Ca ²⁺	46,1	38,2	21,5	54,0	35,3	39,0 ± 8,8
Mg ²⁺ + Mn ²⁺	46,1	n/o	33,2	57,5	53,5	47,6 ± 7,9
Mn ²⁺ + Ca ²⁺	59,7	n/o	35,2	62,6	58,4	54,0 ± 9,4

Примечание. Относительные активности, определявшиеся в присутствии каждого металла (3 ммоль), были пересчитаны для стандартных условий, и полный гидролиз 18 мкг/мл сверхспиральной ДНК через 1 ч инкубации в присутствии 0,1 мг/мл IgG был принят за 100%; n/o — не определялось.

* Для каждого значения представлено среднее по трем измерениям; ошибка не превышала 7—10%.

тогда как Mg²⁺ и Ca²⁺ по отдельности доводят активность IgG до максимума только при 5 ммоль (рис. 5). В то время как 3 ммоль Ca²⁺ активируют гидролиз сверхспиральной ДНК в присутствии 3 ммоль Mg²⁺ в зависимости от образца IgG, Mg²⁺ и Ca²⁺ не оказывают значительного влияния на Mn²⁺-зависимый ДНК-гидролиз (табл. 2).

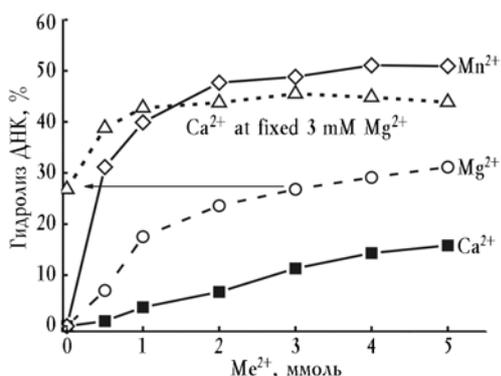


Рис. 5. Зависимости относительной активности IgG8 от концентрации различных ионов металлов

В противоположность к не подвергнутым диализу IgG, содержащим связанные ионы металлов, все диализированные антитела в присутствии Mg²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ показывают накопление не только релаксированной, но также и линейной плазмидной ДНК, когда Ca²⁺ стимулирует только образование релаксированной ДНК (см. рис. 4). Mg²⁺ вместе с Ca²⁺ активирует гидролиз ДНК значительно сильнее, чем самостоятельно, и формирование линейной плазмидной ДНК более явное.

ДНКазные и РНКазные pIgG из сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями, мышей с СКВ и кроликов, иммунизированных ДНК, обычно высокогетерогенны в способности связываться с ДНК и могут быть разделены на множество субфракций с помощью хроматографии на ДНК-целлюлозе [1, 2, 6, 31, 38].

В то же время ДНК и ДНК-целлюлоза могут взаимодействовать не только с антителами к ДНК, но еще и с антителами к фосфолипидам, полисахаридам, белкам

клеточной стенки, различным ДНК- и РНК-зависимым ферментам и др. [4, 10, 14, 25—28, 31, 40, 51].

Прежде всего было установлено, что pIgG от двух разных больных КЭ являются высокогетерогенными по своей способности связываться с ДНК-целлюлозой. Для определения средней каталитической гетерогенности ДНК-pIgG КЭ приготовили из сыворотки семи пациентов смесь равных количеств электрофоретически гомогенных IgG (pIgG(1)_{mix}) с различной относительно высокой активностью. Проанализировали при помощи хроматографии на ДНК-целлюлозе (рис. 6,а) способность pIgG(1)_{mix} КЭ связываться с ДНК. pIgGs первого пика, имеющие низкое сродство, обладали определяемой ДНКазной активностью только в заключительной части пика. Весь связанный с ДНК-целлюлозой IgG(1)_{mix} был распределен между девятью пиками, элюированными во время хроматографии.

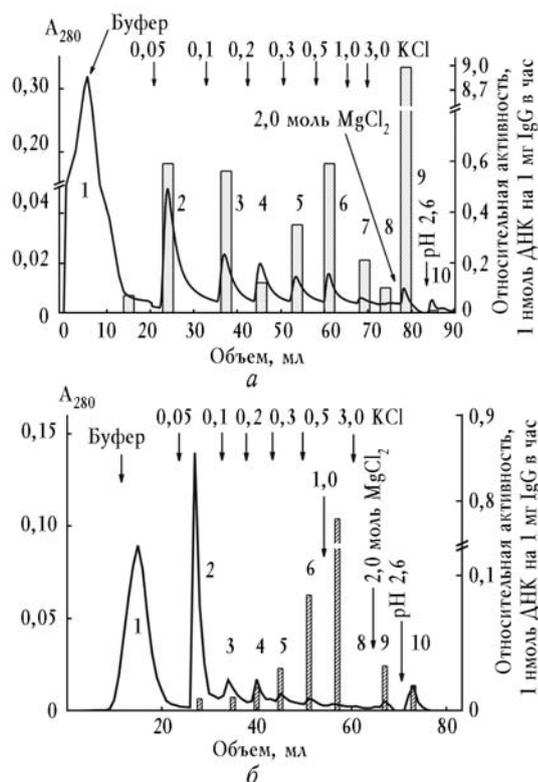


Рис. 6. Аффинная хроматография препаратов pIgG(1)_{mix} (а) и pIgG(2)_{mix} (б) к КЭ на ДНК-целлюлозе

Относительная ДНКазная активность этих пиков была оценена (1 нмоль ДНК на 1 мг IgG в час): завершение пика 1 (0,07), пик 2 (0,59), пик 3 (0,56), пик 4 (0,12), пик 5 (0,35), пик 6 (0,59), пик 7 (0,21), пик 8 (0,1), пик 9 (9,0) и пик 10 (0,01). Очень небольшая фракция pIgG(1)_{mix}, соответствующая пику 9, элюированному 2,0 моль MgCl₂, была более активна, чем другие фракции антител.

Была приготовлена смесь равных количеств семи других электрофоретически гомогенных IgG (pIgG(2)_{mix}), обладающих значительно меньшей активностью, и проанализирована способность pIgG(2)_{mix} связываться с ДНК с помощью хроматографии на ДНК-целлюлозе. В результате получены похожие значения, но pIgG(2)_{mix} в первом пике был совершенно неактивен и относительные активности в девяти пиках, элюированных из ДНК-целлюлозы, отличались в сравнении с pIgG(1)_{mix} (рис. 6,а,б). Субфракция семи IgG(2)_{mix} продемонстрировала более высокую относительную активность, чем фракции других пиков (рис. 6,б). В противоположность pIgG(1)_{mix}, когда фракция 9, элюированная 2,0 моль MgCl₂, показала

максимальную активность (около 9,0 нмоль ДНК на 1 мг IgG в час), максимальная относительная активность pIgG(2)_{mix} наблюдалась для IgG фракции 7, элюированной 1 моль KCl (0,78 нмоль ДНК на 1 мг IgG в час). Интересно, что, когда отдельные IgG КЭ или их смеси были элюированы из ДНК-целлюлозы с помощью градиента концентрации KCl (0—3 моль), белковая и ДНКазная активность распределилась на весь хроматографический профиль (данные не показаны). Эта информация говорит о том, что IgG от различных больших КЭ могут отличаться по относительному содержанию pIgG в каждой фракции и что все фракции антител с различными способностями связывать ДНК могут иметь разные относительные активности.

Оценку значений K_M и k_{cat} для гидролиза сверхспиральной ДНК проводили, используя несколько фракций pIgG(1)_{mix} и pIgG(2)_{mix} после их хроматографии на ДНК-целлюлозе. На рис. 7 представлены два типичных примера измерения K_M и k_{cat} . Первичные данные, полученные путем увеличения концентрации сверхспиральной ДНК для pIgG в соответствии с разными пиками pIgG_{mix} (рис. 7), согласовывались с кинетикой Михаэлиса—Ментен.

K_M для pIgG(1)_{mix} ((70 ± 18) нмоль; $k_{cat} = (9,8 ± 2,0) × 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) и pIgG(2)_{mix} ((76 ± 16) нмоль; $k_{cat} = (1,5 ± 0,4) · 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$) для препаратов (см. рис. 6), элюированных в 50 ммоль KCl (пики 2), были сопоставимы, в то время как k_{cat} для pIgG(1)_{mix} был значительно выше. Способность связываться с фракциями pIgG для сверхспиральных ДНК (в терминах значений K_M) увеличивалась последовательно с увеличением элюированной KCl (или MgCl₂) концентрации. Для фракции pIgG(2)_{mix}, элюированной 1 моль KCl (рис. 6,б, пик 7), значение K_M ((20,0 ± 5,0) нмоль; $k_{cat} = (4,0 ± 0,8) · 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) было меньше, чем для фракции, соответствующей пику 2. Фракция, соответствующая пику 9 pIgG(1)_{mix}, элюированная 2 моль MgCl₂ (рис. 6,б), показала большую способность связываться ((6,1 ± 1,5) нмоль; $k_{cat} = (0,14 ± ± 0,05) \text{ мин}^{-1}$), чем фракция пика 2.

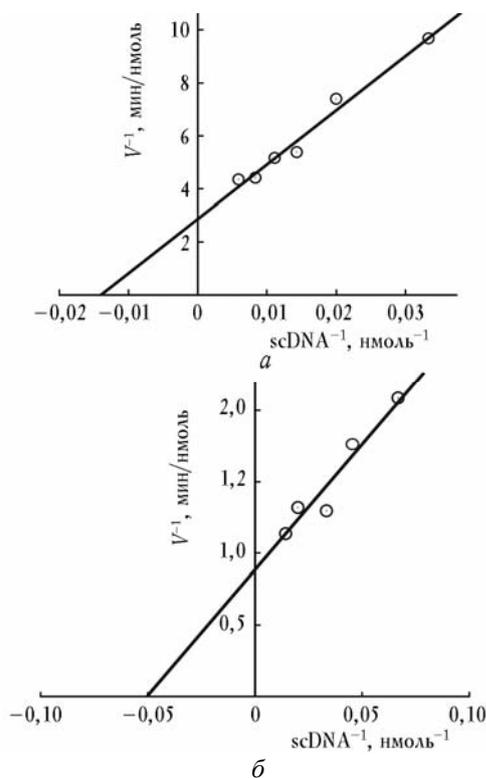


Рис. 7. Определение значений K_M и V_{max} для гидролиза сверхспиральной ДНК с помощью графика Lineweaver—Burk

Так как количество pIgG на пиках 9 (см. рис. 6,а) и 7 (см. рис. 6,б) в обоих pIgG_{mix} было очень небольшим, то их вклад в общую активность нефракционированного препарата pIgG_{mix} был незначителен, несмотря на высокую относительную активность.

Обсуждение

Полученные данные четко свидетельствуют, что ДНКазная активность является неотъемлемым свойством IgG, присутствующих в сыворотке крови больных КЭ. Такая активность не связана контаминацией образцов другими ферментами. IgG обладают ферментными свойствами, субстратной специфичностью, хроматографическими и электрофоретическими характеристиками, полностью отличающимися их от известных канонических ДНКаз. Фракционирование pIgG КЭ на ДНК-целлюлозе показало, что ДНКазные IgG могут распределяться по всему профилю хроматографии, в то время как ДНКазы I и II млекопитающих обычно элюируются из ДНК-сорбентов в виде одного пика белка и активности [58, 63].

ДНКазы I гидролизует сверхспиральную ДНК в присутствии 10 ммоль Mg^{2+} , в результате чего получается

не только релаксированная плазмидная ДНК, но также и важная фракция линейных продуктов ДНК [57]. Гидролизующие ДНК иммуноглобулины класса G, полученные из сыворотки больных аутоиммунными заболеваниями (СКВ, рассеянный склероз, тиреоидит Хасимото, полиартрит и др.), также катализируют образование обеих (релаксированной и линейной) ДНК, соотношение которых зависит от пациента и его заболевания [1, 2, 6, 42]. С другой стороны, иммунизация здоровых кроликов с помощью ДНК, РНК, ДНКаз I, II и РНКазы ведет к продукции абзимов, гидролизующих сверхспиральную ДНК, которые продуцируют только релаксированную ДНК, но не могут образовывать линейную ДНК [4, 25—28]. Интересно, что основная часть (около 90%) не подвергнутых диализу IgG КЭ, содержащих связанные металлы, также гидролизуют сверхспиральную ДНК в присутствии ионов Mg^{2+} с образованием только релаксированной ДНК (см. рис. 1,б). Однако после диализа ДНКазные IgG КЭ приобретают способность продуцировать линейную ДНК в присутствии Co^{2+} , Mg^{2+} и особенно Mn^{2+} и комбинации $Mg^{2+} + Ca^{2+}$ (см. рис. 4). Возможно, что сайты ДНКазных IgG, которые связываются с Ca^{2+} , до диализа с ЭДТА в сочетании с ЭГТА заняты ионами металлов, которые в отличие от ионов Ca^{2+} могут ингибировать образование линейной ДНК. Добавление 1 ммоль $CaCl_2$ в реакционную смесь, содержащую 10 ммоль $MgCl_2$, ведет к усилению относительной активности ДНКазы I. В тех же условиях увеличение скорости реакции, катализируемой pIgG_{mix} КЭ в присутствии $Mg^{2+} + Ca^{2+}$, было значительно меньше (см. табл. 2). В противоположность ДНКазе I, для которой Mg^{2+} является значительно лучшим активатором, чем Mn^{2+} [13], ДНКазные IgG КЭ лучше активируются Mn^{2+} . Co^{2+} также является очень хорошим кофактором для абзимов у тех же пациентов (см. табл. 2).

Различные анти-ДНК-абзимы при аутоиммунных и вирусных заболеваниях могут формировать различные пути иммунного ответа. Прежде всего иммунизация мышей с аутоиммунным заболеванием приводила к значительно большему проценту абзимов с большей активностью и сильно отличающимися свойствами от условно используемой породы нормальных мышей [18—59]. Было показано, что специфическая реорганизация иммунной системы во время спонтанного развития тяжелой СКВ-подобной патологии у мышей проявляется изменениями в профиле дифференцировки и уровне пролиферации гематопозитических стволовых клеток

костного мозга и продукцией ДНКазы, аденозинтрифосфатазы и амилазных абзимов [3]. Иммунизация здоровых мышей с помощью ДНК также приводила к продукции абзимов. Однако она сопровождалась увеличением пролиферации лимфоцитов и супрессией апоптоза лимфоцитов в различных органах (особенно в селезенке), но изменений в дифференцировке клеток костного мозга не было [3]. Предполагается, что иммунные процессы в начале иммунизации млекопитающих вирусными и бактериальными нуклеиновыми кислотами во время инфекционного заболевания совпадают с тем, что происходит после иммунизации здоровых мышей с помощью ДНК и их комплексов с белками.

Иммунизация кроликов с помощью ДНК, РНК, ДНКазы I, ДНКазы II и РНКазы запускает продукцию не только ДНК-связывающих антител, но также и иммуноглобулинов класса G с ДНКазной активностью [4, 25—28]. Интересно, что различные субфракции ДНКазных абзимов, повышающиеся в ответ на ДНК или РНК, демонстрируют относительно низкое сродство с ДНК-целлюлозой и могли быть полностью элюированы из этого сорбента при помощи 0,1—0,5 моль NaCl, хотя некоторые субфракции антиидиотипических IgG к ДНКазе I, ДНКазе II или РНКазе элюируются только 3 моль NaCl, 2 моль MgCl₂ или кислотным буфером (рН 2,6). Как можно увидеть на рис. 6, ДНКазные IgG КЭ распределены по всему профилю и были субфракции, элюируемые с помощью 3 моль NaCl, 2 моль MgCl₂ или кислотным буфером при условиях, нарушающих взаимодействие между антигеном и антителом. Поэтому логично предположить, что вирусные инфекции человека могут запускать продукцию не только антител и абзимов, повышающихся в ответ на нуклеиновые кислоты и их комплексы с белками, имеющими низкое сродство с ДНК-целлюлозой [25, 28], но также и антиидиотипические антитела и абзимы, которые повышаются в ответ на активные центры ДНК- и РНК-разрушающих ферментов и характеризуются высоким сродством с этим сорбентом [4, 26, 27].

Сродство сверхспиральной ДНК с IgG КЭ варьирует (в пределах значений K_M) в диапазоне 6,1—76 нмоль, что соответствует типичному значению K_d для взаимодействий антиген — антитело и на 3—4 порядка выше, чем сродство сверхспиральной ДНК с ДНКазой I ($K_M = 46—58$ мкмоль) [18]. Эти значения K_M для сверхспиральной ДНК сравнимы с K_M для плазмидной ДНК (43 нмоль), полученной ранее для

IgG больных СКВ [18], но они выше, чем в случае ДНКазных IgG (0,34 нмоль) из сыворотки больных рассеянным склерозом [6].

Катализ, опосредованный искусственными абзимами, обычно характеризуется более низкими значениями k_{cat} , чем в случае канонических ферментов [38—41]. Важно, что значительно более высокое сродство субстратов с абзимами в сравнении с каноническими ферментами с теми же функциями должно приводить к снижению значений k_{cat} , так как более высокое сродство удлинит время существования комплекса антигено — субстрат и, как следствие, уменьшает производительность катализатора. Известные значения k_{cat} для природных абзимов от больных аутоиммунными заболеваниями варьируют в пределах 0,001—15,6 мин⁻¹ [1, 2, 18, 40, 42, 44]. Интересно, что некоторые ДНК-зависимые ферменты показывают значения k_{cat} , сравнимые с этими, или даже ниже. Например, известное значение k_{cat} для эндонуклеазы EcoRI составляет 2,6—6,5 мин⁻¹ [18].

Самое высокое значение k_{cat} (0,14 мин⁻¹) и значения k_{cat} для вторых фракций двух препаратов IgG_{mix} (см. рис. 6), определенные в данных экспериментах (1,5—140) · 10⁻³ мин⁻¹, были ниже, чем значение k_{cat} для гидролиза сверхспиральной ДНК теми IgG СКВ, которые имеют наибольшую активность (14 мин⁻¹) и, кроме того, ниже, чем k_{cat} для ДНКазы I ((1,0—3,2) · 10⁵ мин⁻¹ [18]), но было сравнимо по величине с этими значениями для ДНКазных IgG от больных вирусным гепатитом [8] и выше, чем значение k_{cat} для абзимов, полученных при иммунизации кроликов с помощью ДНК, РНК, ДНКазы I, ДНКазы II или РНКазы [4, 25, 27, 28]. Таким образом, относительная активность ДНКазных антител от больных различными заболеваниями изменяется приблизительно в такой последовательности: диабет < вирусный гепатит ≈ КЭ < < полиартрит ≤ тиреоидит Хасимото < СПИД ≤ рассеянный склероз < СКВ [38—41]. Присутствие IgG, обладающих гидролитической активностью, аналогичной сериновым протеазам, в сыворотке больных сепсисом четко коррелирует с их выживаемостью [60]. В отличие от ДНКазных абзимов полисахаридгидролизующие антитела обычно представлены даже в сыворотке здоровых людей, и их активность значительно возрастает в сыворотке пациентов и животных с различными аутоиммунными заболеваниями [3, 20] и особенно с инфекционными болезнями (В.Н. Бунева, собственные данные). Так как ДНКазные абзимы могут гидролизировать

вирусные нуклеиновые кислоты, то можно предположить, что совместное действие абзимов с белковой, полисахаридной и нуклеазной активностью способно усилить протективный эффект антител против заболеваний, вызванных вирусными инфекциями. Учитывая значительную близость в данном ряду иммунологических показателей при КЭ известным аутоиммунным заболеваниям, нельзя пройти мимо опасности перехода острых форм КЭ в хронические.

Заключение

На основании предварительно проведенного поиска достаточно точных критериев обнаружения ДНК-активности антител IgG из сыворотки больных КЭ и здоровых доноров выявлены не только значительная вариативность активности антител IgG от пациента к пациенту, но и определяемый уровень ДНКазной активности в большинстве образцов.

Ранее подобные изменения были обнаружены при ряде аутоиммунных заболеваний, для которых характерно хроническое течение болезни.

В связи с этим существует реальная опасность развития хронического течения у больных с острыми формами клещевого энцефалита при неблагоприятных условиях состояния их иммунной системы, что требует продолжения исследований с целью выявления необходимых для этого патогенетических механизмов.

Исследование осуществлено при поддержке гранта аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (№ 2.1.1/5580); гранта Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология», № 22.7, «Фундаментальные науки — медицине», № 21.16), грантов РФФИ (07-04-00387) и РФФИ-БФФИ (08-04-90014) и при финансовой поддержке СО РАН.

Литература

1. *Andrievskaya O.A., Buneva V.N., Naumov V.A., Nevinsky G.A.* Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus // *Med. Sci. Monit.* 2000. № 6. P. 460—470.
2. *Andrievskaya O.A., Buneva V.N., Baranovsky A.G. et al.* Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with lupus erythematosus // *Immunol. Lett.* 2002. № 81. P. 191—198.
3. *Andryushkova A.A., Kuznetsova I.A., Buneva V.N. et al.* Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. № 11. P. 531—551.
4. *Anti-RNase* Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA // *Int. Immunol.* 2008. № 20. P. 1031—1040.
5. *Baranova S.V., Buneva V.N., Kharitonova M.A. et al.* HIV-1 integrase hydrolyzing antibodies from the sera of HIV-infected patients // *Biochimie.* 2009. № 9. P. 1081—1086.
6. *Baranovsky A.G., Ershova N.A., Buneva V.N. et al.* Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunol. Lett.* 2001. № 76. P. 163—167.
7. *Baranovsky A.G., Kanyshkova T.G., Mogelnitskii A.S. et al.* Polyclonal antibodies from blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis effectively hydrolyze DNA and RNA // *Biochemistry.* 1998. № 63. P. 1239—1248.
8. *Baranovsky A.G., Matushin V.G., Vlassov A.V. et al.* DNA- and RNA-hydrolyzing antibodies from the blood of patients with various forms of viral hepatitis // *Biochemistry.* 1997. № 62. P. 1358—1366.
9. *Bernardi G.* / Ed. P.D. Boyer. *The enzymes.* N.Y.: Academic Press, 1971.
10. *Berneman A., Cuilbert B., Enschrich S., Avrames S.* IgG auto- and polyreactivities of normal human sera // *Mol. Immunol.* 1993. № 30. P. 1499—1510.
11. *Blanco F., Kalsi J., Isenberg D.A.* Analysis of antibodies to RNA in patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases // *Clin. Exp. Immunol.* 1991. № 86. P. 66—70.
12. *Boekel E.T., Siegert C.E., Vrieling G.J. et al.* Analyses of CD27(++) plasma cells in peripheral blood from patients with bacterial infections and patients with serum antinuclear antibodies // *J. Clin. Immunol.* 2007. № 27. P. 467—476.
13. *Campbell V.W., Jackson D.A.* The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA // *J. Biol. Chem.* 1980. № 255. P. 3726—3735.
14. *Coutinho A., Kazatchkine M.D., Avrameas S.* Natural autoantibodies // *Curr. Opin. Immunol.* 1995. № 7. P. 812—818.
15. *Fauci A.S., Braunwald E., Kasper D.L. et al.* *Harrison's Principles of Internal Medicine: 17th ed.* McGraw-Hill Professional, 2008.
16. *Fersht A.* *Enzyme Structure and Mechanism: 2nd ed.* N.Y.: W.H. Freeman Co., 1985.
17. *Founel S., Muller S.* Antinucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus // *Ann. Med. Interne.* 2002. № 153. P. 513—519.
18. *Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V. et al.* Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. № 92. P. 254—257.
19. *Gottlieb A.A., Shwartz R.H.* Antigen-RNA interactions // *Cell. Immunol.* 1972. № 5. P. 341—362.
20. *Hentati B., Sato M.N., Payelle B. et al.* Beneficial effect of polyclonal immunoglobulins from malaria-infected BALB/c mice on the lupus-like syndrome of (NZB x NZW)F1 mice // *Eur. J. Immunol.* 1994. № 24. P. 8—15.
21. *Hirokawa K., Takasaki Y., Takeuchi K. et al.* Anti-TS1-RNA: characterization of novel antibodies against sequence-specific RNA by random RNA selection in patients with

- Sjogren's syndrome // *J. Rheumatol.* 2002. № 29. P. 931—937.
22. Ikeda R., Takasaki Y., Hirokawa K. et al. Clinical significance of antibodies to TS1-RNA in patients with mixed connective tissue disease // *J. Rheumatol.* 2003. № 30. P. 998—1005.
23. Keinan E. (Ed.). Catalytic antibodies. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, 2005. P. 1—586.
24. Kozyr A.V., Kolesnikov A., Aleksandrova E.S. et al. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998. № 75. P. 45—61.
25. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Antibodies against DNA hydrolyze RNA and DNA // *Biochemistry.* 2008. № 73. P. 1547—1560.
26. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *J. Mol. Recognit.* 2008. № 21. P. 233—242.
27. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Immunization of rabbits with DNase II leads to formation of polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *Int. Immunol.* 2009. № 21. P. 349—360.
28. Krasnorutskii M.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A., Krasnorutskii M.A. Antibodies against RNA hydrolyze RNA and DNA // *J. Mol. Recognit.* 2008. № 21. P. 338—347.
29. Kubota T. Lessons from a monoclonal antibody to double-stranded DNA // *J. Med. Dent. Sci.* 1977. № 44. P. 37—44.
30. Kunze U. Conference report of the 10th meeting of the international scientific working group on tick-borne encephalitis (ISW-TBE): combating tick-borne encephalitis: vaccination rates on the rise // *Vaccine.* 2008. № 26. P. 6738—6740.
31. Kuznetsova I.A., Orlovskaya I.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Activation of DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice by different metal ions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. № 1774. P. 884—896.
32. Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri S.V. et al. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. № 102. P. 4109—4113.
33. Love J.D., Hewitt R.R. The relationship between human serum and human pancreatic DNase I // *J. Biol. Chem.* 1979. № 254. P. 12588—12594.
34. Marion T.N., Krishan M.R., Desai D.D. et al. Monoclonal anti-DNA antibodies: structure, specificity, and biology // *J. Immunol. Methods.* 1997. № 11. P. 3—113.
35. Matsiota-Bernard P., Hentati B., Pie S. et al. Beneficial effect of *Salmonella typhimurium* infection and of immunoglobulins from *S. typhimurium*-infected mice on the autoimmune disease of (NZB x NZW) F1 mice // *Clin. Exp. Immunol.* 1996. № 104. P. 228—235.
36. Matsiota-Bernard P., Mahana W., Avrameas S., Nauciel C. Specific and natural antibody production during *Salmonella typhimurium* infection in genetically susceptible and resistant mice // *Immunology.* 1993. № 79. P. 375—380.
37. Mitsuhashi S., Saito R., Kurashige S., Yamashugi N. Ribonucleic acid in the immune response // *Moll. Cell. Biochem.* 1978. № 20. P. 131—147.
38. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // *J. Cel. Mol. Med.* 2003. № 7. P. 265—276.
39. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies // *J. Immunol. Methods.* 2002. № 269. P. 235—249.
40. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Natural catalytic antibodies — abzymes / Ed. E. Keinan. Catalytic antibodies. VCH-Wiley press, 2005. P. 503—567.
41. Nevinsky G.A., Favorova O.O., Buneva V.N. Catalytic antibodies: new characters in the protein repertoire / Ed. E. Golemis. Protein-protein interactions. A molecular cloning manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, 2002.
42. Nevinsky G.A., Kanyshkova T.G., Semenov D.V. et al. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. № 83. P. 115—129.
43. Nishi Y. Evolution of catalytic antibody repertoire in autoimmune mice // *J. Immunol. Methods.* 2002. № 269. P. 213—233.
44. Odintsova E.S., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // *J. Mol. Recognit.* 2005. № 18. P. 413—421.
45. Odintsova E.S., Kharitonova M.A., Baranovskii A.G. et al. DNA-hydrolyzing IgG antibodies from the blood of patients with acquired immune deficiency syndrome // *Mol. Biol.* 2006. № 40. P. 857—864.
46. Odintsova E.S., Kharitonova M.A., Baranovskii A.G. et al. Proteolytic activity of IgG antibodies from blood of acquired immunodeficiency syndrome patients // *Biochemistry.* 2006. № 71. P. 251—261.
47. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998. № 75. P. 13—23.
48. Polosukhina D.I., Kanyshkova T.G., Doronin B.M. et al. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2004. № 8. P. 359—368.
49. Polosukhina D.I., Kanyshkova T.G., Doronin B.M. et al. Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunol. Lett.* 2006. № 103. P. 75—81.
50. Ponamorenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I. et al. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. № 103. P. 281—286.
51. Raz E., Ben-Bassat H., Davidi T. et al. Cross-reactions of anti-DNA autoantibodies with cell surface proteins // *Eur. J. Immunol.* 1993. № 23. P. 383—390.
52. Sato T., Uvhiumi T., Arakawa M., Kominami R. Serological association of lupus autoantibodies to a limited functional domain of 28S ribosomal RNA and to the ribosomal proteins bound to the domain // *Clin. Exp. Immunol.* 1994. № 98. P. 35—39.
53. Shoenfeld Y., Ben-Yehuda O., Messinger Y. et al. Autoimmune diseases other than lupus share common anti-DNA idiotypes // *Immunol. Lett.* 1988. № 17. P. 285—291.
54. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A. et al. DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science.* 1992. № 256. P. 665—667.
55. Sinohara H., Matsuura K. Does catalytic activity of Bence-Jones proteins contribute to the pathogenesis of multiple myeloma? // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. № 83. P. 85—94.
56. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease // *Nat. Immunol.* 2001. V. 2. P. 762—764.
57. Suck D. DNA recognition by DNase I // *J. Mol. Recognit.* 1994. № 7. P. 65—70.

58. *Tanaka H., Sasaki I., Yamashita K. et al.* Affinity chromatography of porcine pancreas deoxyribonuclease I on DNA-binding sepharose under non-digestive conditions, using its substrate-binding site // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1980. № 88. P. 797—806.
59. *Tawfik D.S., Chap R., Green B.S. et al.* Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. № 92. 2145—2149.
60. *Ternynck T., Falanga P.B., Unterkircher C. et al.* Induction of high levels of IgG autoantibodies in mice infected with *Plasmodium chabaudi* // *Int. Immunol.* 1991. № 3. P. 29—37.
61. *Unterkircher C., Avrameas S., Ternynck T.* Autoantibodies in the sera of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with or without clinical Chagas disease // *J. Clin. Lab. Anal.* 1993. № 7. P. 60—69.
62. *Wun H.L., Leung D.T., Wong K.C. et al.* Molecular mimicry: anti-DNA antibodies may arise inadvertently as a response to antibodies generated to microorganisms // *Int. Immunol.* 2001. № 13. P. 1099—1107.
63. *Yasuda T., Takeshita H., Nakajita H. et al.* Rabbit DNase I: purification from urine, immunological and proteochemical characterization, nucleotide sequence, expression in tissues, relationships with other mammalian DNases I and phylogenetic analysis // *Biochem. J.* 1997. № 325. P. 465—473.

Поступила в редакцию 06.04.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2010 г.

Сведения об авторах

Е.И. Гусев — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии РГМУ (г. Москва).

Т.А. Пархоменко — аспирант Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

В.Н. Бунева — д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

О.Б. Доронина — канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии НГМУ (г. Новосибирск).

В.Б. Доронин — клинический ординатор Института терапии СО РАМН (г. Новосибирск).

И.И. Генералов — д-р мед. наук, профессор, научный сотрудник Витебского государственного медицинского университета (г. Витебск, Республика Беларусь).

Б.М. Доронин — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии НГМУ (г. Новосибирск).

Г.А. Невинский — д-р хим. наук, профессор, зав. лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Для корреспонденции

Невинский Георгий Александрович, 8 (383) 363-51-26, факс: 8 (383) 333-36-77, e-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru