Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 617-621.

УДК 612.017.1:616.5-008.9; 606:577.151.5; 577.083.3
©Коллектив авторов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ КАТАБОЛИЗМА НУКЛЕОПРОТЕИНОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

А.С. Трофименко[1]*, И.П. Гонтарь[1], О.В. Парамонова[2], Е.С. Симакова[1], И.А. Зборовская[1]

[1]НИИ клинической и экспериментальной ревматологии РАМН,
400138, Волгоград, ул. Землячки, 76; тел.: (8442)78-90-92; эл. почта: a.s.trofimenko@mail.ru
[2]Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Цель исследования – адаптация экспериментальной модели, воспроизводящей основные нарушения катаболизма ДНК при СКВ, для последующего изучения экстракорпоральных методов их коррекции, а также оценка валидности данной модели в остром эксперименте. Двадцати двум крысам вводили внутрибрюшинно содержащий хроматин экстракт из бычьей печени, а затем внутривенно – антитела к ДНК, выделенные из крови больных СКВ. После выполнения моделирования резко увеличились концентрации сывороточных антител к ДНК, циркулирующих иммунных комплексов и ДНК плазмы, статистически значимо увеличилось содержание лейкоцитов крови. Уровни эритроцитов, тромбоцитов, общего белка и креатинина крови, активность АсАТ и АлАТ, а также время свертывания крови существенно не изменились. В результате моделирования продемонстрировано отложение человеческих IgG *in vivo*, выявленное методом прямой иммунофлуоресценции на криосрезах почек крыс. В целом, данная модель воспроизводит основные нарушения катаболизма ДНК при СКВ не вызывает ни гибели животных, ни угрожающих жизни изменений, оцениваемых по уровню маркеров в ходе острого эксперимента.

Ключевые слова: системная красная волчанка, индуцированная модель, антитела к ДНК, хроматин, ДНКаза I

DOI: 10.18097/PBMC20156105617

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на более чем полувековое изучение, ключевые звенья этиопатогенеза системной красной волчанки (СКВ) всё еще остаются во многом нераскрытыми. К настоящему времени сравнительно изученной, хотя и не лишенной определенных концептуальных противоречий, представляется лишь конечная часть патогенеза СКВ, которая связывает поражение органов с синтезом широкого спектра патогенных аутоантител, чаще всего направленных против ДНК, нуклеопротеинов и фосфолипидов [1, 2]. Причины активации аутореактивных В-лимфоцитов, отвечающих за выработку таких антител, окончательно не установлены. Согласно наиболее распространенной на данный момент гипотезе, нарушение процессов апоптоза и/или элиминации продуктов распада клеток приводит к значительному повышению содержания дезоксирибонуклеопротеинов и других внутриклеточных молекул во внеклеточном пространстве, что инициирует выработку патогенных аутоантител [3]. Известные факторы риска данного заболевания (генетические, средовые и гормональные) не всегда “вписываются” в существующие концепции патогенеза СКВ [4, 5].

Одной из причин малой изученности патогенеза, а также сравнительно медленной разработки новых методов лечения СКВ, является проблема экспериментального моделирования данной болезни. До настоящего времени не создано полноценной индуцированной, трансгенной или нокаутной модели СКВ. Наиболее валидной из существующих принято считать спонтанную модель люпус-нефрита на мышах NZB/NZW F_1, и её модифицированные варианты, NZB/SWR F_1, NZM2328 и NZM2410. Однако у всех этих моделей как экстраренальные проявления, так и вариабельность клинико-иммунологических признаков значительно отличаются от таковых при СКВ [4, 6]. Кроме того, мыши непригодны для изучения экстракорпоральных методов лечения ввиду малой массы тела.

* - адресат для переписки

Предшествующие попытки использования более крупных животных – собак, крыс, кроликов, кошек, морских свинок и др. – не привели к созданию модели патогенеза СКВ, превосходящей или, как минимум, равноценной NZB/NZW F_1 [4].

Целью нашего исследования являлась адаптация экспериментальной модели, воспроизводящей основные нарушения катаболизма ДНК при СКВ: значительное увеличение общего количества внеклеточной ДНК, функциональную недостаточность системы мононуклеарных фагоцитов и наличие высокоавидных аутоантител к ДНК. Важным условием была пригодность модели для изучения экстракорпоральных методов коррекции вышеупомянутых нарушений.

МЕТОДИКА

За основу индуцированной модели нами был взят метод хроматиновой нагрузки Jiang с соавт. [7], который был дополнен внутривенным введением антител к ДНК (анти-ДНК). Использование крыс для этого протокола позволяло осуществлять экстракорпоральную перфузию с использованием мини-колонок, не создавая опасных для жизни расстройств кровообращения.

До и после моделирующих процедур регистрировали комплекс биомаркеров, разделённых нами на 2 группы: показатели эффективности и показатели безопасности. Первая из них включала уровень фиксации IgG в почках ($IgG_Ф$), измеренный методом прямой иммунофлуоресценции на криосрезах ткани почек крыс толщиной 5 мкм [8]. $IgG_Ф$ выражали как максимальный титр конъюгата, при котором флуоресценция в опытном образце визуально превышала таковую в нейтрализованном контроле. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом преципитации в полиэтиленгликоле и выражали в относительных единицах поглощения (Ед) [9], верхней границей нормы считали 4 Ед. Концентрацию антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК) класса IgG в сыворотке крови оценивали методом ИФА, используя коммерческий диагностикум (“Orgentec Diagnostika GmbH”, Германия). Границей между положительными и отрицательными результатами являлось значение 20 международных единиц (МЕ)/мл. Концентрацию ДНК в плазме крови исследовали флюориметрическим методом [10], применяя флуорофор PicoGreen (“Invitrogen”, США). Показателями безопасности являлись концентрации эритроцитов (Э), лейкоцитов (Л), тромбоцитов (Т), общего белка (ОБ), креатинина крови (Кр), активность аспартат- и аланинаминотрансферазы (АсАТ, АлАТ), а также время свёртывания крови (ВСК), которые измеряли унифицированными методами.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 8.0 (“StatSoft Inc.”, США). При нормальном распределении признака его центральную тенденцию и вариабельность характеризовали как “среднее арифметическое (95% доверительный интервал)” (М (95%ДИ)). Титры преобразовывали в десятичные дроби. Абсолютные показатели динамики оцениваемых факторов вычисляли как разность между конечным и исходным значениями; полученные таким образом новые переменные обозначали буквой Δ перед наименованием соответствующего маркера. Темп прироста (ТП) рассчитывали как отношение абсолютной динамики к исходному уровню и выражали в процентах; 95%ДИ для ТП оценивали по методу Клоппера-Пирсона. Выбор критерия для сравнения центральных тенденций осуществляли в соответствии с параметрами распределения признака, количеством и связанностью сравниваемых средних. Различия считали достоверными при $p<0,05$. Корреляцию анализировали, используя коэффициент Пирсона (r). Границы нормы показателя рассчитывали как среднее арифметическое ± 3 стандартных отклонения исходной выборочной совокупности.

Эксперименты проведены на 22 самках крыс линии Вистар (возраст 52,3 (51,0-53,6) недели, масса – 681 (609-753) г). Условия содержания, ухода и питания соответствовали общепринятым требованиям, регламентирующим использование лабораторных животных в биомедицинских исследованиях (ГОСТ Р 50258-92, приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г., приказ МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г). При планировании и проведении экспериментов соблюдали принципы гуманного обращения с животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986 г), что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета.

Эффективность моделирования $IgG_Ф$ проверяли при помощи животных, не входивших в основную часть исследования. Для этого использовали 4 крысы-самки аналогичного возраста. У 2 из них декапитация и забор почек были произведены после предварительного выполнения моделирующих процедур в соответствии со стандартным протоколом, 2 других животных до декапитации оставались интактными.

Использованные нами анти-ДНК были предварительно выделены методом аффинной хроматографии из постаферезной плазмы крови 5 больных верифицированной СКВ [11], которым был проведен плазмаферез в специализированном отделении по медицинским показаниям [12]. В качестве лиганда для связывания антител использовали нативную высокомолекулярную ДНК тимуса телёнка (“Sigma-Aldrich”, США). Обязательным условием получения образцов, в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации (1996 г), было наличие информированного согласия всех пациентов. Содержащий хроматин экстракт получали из бычьей печени [13]. Размороженный экстракт нагревали до 37°С и вводили крысам интраперитонеально в дозе 10 мл/кг массы тела [7]. Через 4 ч в латеральную хвостовую вену вводили

Таблица 1. Значения показателей до и после выполнения моделирующего протокола.

Показатель	Исходно, M (95%ДИ)	После моделирования, M (95%ДИ)	p*
Показатели эффективности			
ЦИК, Ед	2,65 (2,25 – 3,05)	7,03 (6,40 – 7,66)	<0,001
ДНК, нг/мл	54,80 (52,94 – 56,66)	123,62 (117,30 – 129,94)	<0,001
Анти-дсДНК, МЕ/мл	9,64 (8,39 – 10,89)	55,46 (48,20 – 62,72)	<0,001
Показатели безопасности			
Эритроциты, $\cdot 10^{12}$ л$^{-1}$	7,32 (6,86 – 7,78)	7,14 (6,55 – 7,72)	0,842
Лейкоциты, $\cdot 10^{9}$ л$^{-1}$	10,24 (9,58 – 10,90)	13,02 (12,36 – 13,68)	<0,001
Тромбоциты, $\cdot 10^{9}$ л$^{-1}$	568,42 (538,96 – 597,88)	572,83 (531,67 – 613,99)	0,996
Общий белок, г/л	79,08 (75,31 – 82,86)	77,59 (73,83 – 81,35)	0,815
Креатинин, мкмоль/л	28,96 (22,63 – 35,29)	30,72 (26,04 – 35,40)	0,424
АлАТ, мкмоль/(ч·мл)	0,42 (0,39 – 0,45)	0,42 (0,38 – 0,46)	0,902
АсАТ, мкмоль/(ч·мл)	1,18 (1,14 – 1,22)	1,19 (1,16 – 1,22)	0,874
ВСК, с	283,89 (254,20 – 313,58)	266,09 (238,68 – 293,50)	0,627

Примечание: * - парный критерий Стьюдента.

выделенные на первом этапе анти-ДНК в дозе 1 мг/кг массы тела в стерильном 0,9% растворе NaCl с температурой 37°С. Для проверки адекватности моделирования вышеперечисленные лабораторные показатели оценивали в динамике в крови, которую отбирали из латеральной хвостовой вены непосредственно перед введением экстракта и через 5 мин после инъекции антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выполнении моделирующего протокола не отмечалось ни гибели крыс, ни существенного ухудшения их общего состояния (нарушений жизненно важных функций, пирогенных реакций).

Показатели эффективности

Границы нормы по результатам анализа проб, полученным до начала моделирования, составляли: для ЦИК 0,0-5,42 Ед, для ДНК 42,31-67,79 нг/мл, для анти-дсДНК 0,0-17,84 МЕ/мл. Вне этих границ оказались только 2 (9,09%) значения исходной концентрации ДНК (81,16 нг/мл и 100,94 нг/мл). В последующем все данные животных, у которых были отмечены “выбросы”, для статистической обработки использованы не были.

В результате проведения моделирующих процедур в крови крыс значительно увеличивалось содержание ЦИК, ДНК и анти-дсДНК, при этом различия между исходным и конечным значениями всех трёх показателей были статистически достоверными (табл. 1). Среди показателей эффективности анти-дсДНК демонстрировали наибольший – почти шестикратный – прирост; концентрации ЦИК и ДНК увеличивались в 2-2,5 раза (табл. 2).

При поиске взаимосвязей между показателями эффективности, зафиксированными после моделирования, выявлены статистически значимые сильные обратные корреляции между ЦИК и анти-дсДНК (r=-0,702; p<0,001) и между ДНК и анти-дсДНК (r=-0,528; p=0,017). Кроме того, имели место умеренно выраженная достоверная обратная корреляция между ΔЦИК и Δанти-дсДНК (r=-0,407; p=0,041), а также обратная корреляция между ΔДНК и Δанти-дсДНК (r=-0,525; p=0,010).

У обеих интактных крыс $IgG_{Ф}$ в почках выявлен не был; напротив, у двух особей, подвергавшихся введению анти-ДНК и хроматина, титры $IgG_{Ф}$ составляли 0,063 и 0,031; среднее геометрическое 0,044.

Таким образом, после выполнения моделирующего протокола в крови крыс создавалось значительное повышение концентраций ЦИК, внеклеточной ДНК и анти-дсДНК. Кроме того, в почках крыс отмечено появление депозитов человеческого IgG, связанное с фиксацией введенных анти-дсДНК, вероятно, в составе иммунных комплексов *in situ*. Отчётливые обратные корреляции анти-дсДНК как с ЦИК, так и с ДНК, при отсутствии статистически значимой взаимосвязи между двумя последними показателями, можно объяснить наличием в кровотоке избытка анти-дсДНК по отношению к антигену при формировании ЦИК, что согласуется с наибольшим темпом прироста этого показателя после завершения моделирования.

Таблица 2. Динамика показателей в результате моделирования.

Показатель	Абсолютная динамика (Δ), M (95%ДИ)	Темп прироста, % (95%ДИ)
Показатели эффективности		
ЦИК, Ед	4,38 (3,76 – 5,00)	165,28 (145,75 – 184,81)
ДНК, нг/мл	68,82 (66,05 – 80,59)	125,58 (98,59 – 152,57)
Анти-дсДНК, МЕ/мл	45,82 (39,65 – 51,99)	475,31 (440,69 – 509,93)
Показатели безопасности		
Эритроциты, $\cdot 10^{12}$ л$^{-1}$	-0,18 (-0,84 – 0,48)	-2,46 (-5,21 – 0,29)
Лейкоциты, $\cdot 10^{9}$ л$^{-1}$	2,78 (2,01 – 3,55)	27,15 (16,28 – 38,02)
Тромбоциты, $\cdot 10^{9}$ л$^{-1}$	4,41 (-14,10 – 22,92)	0,78 (-1,92 – 3,48)
Общий белок, г/л	-1,49 (-3,10 – 0,12)	-1,88 (-6,55 – 2,79)
Креатинин, мкмоль/л	1,76 (-0,15 – 3,67)	6,08 (-2,18 – 14,34)
АлАТ, мкмоль/(ч·мл)	0,00 (-0,02 – 0,02)	0,00 (-4,56 – 4,56)
АсАТ, мкмоль/(ч·мл)	0,01 (0,0 – 0,02)	0,85 (-2,38 – 4,08)
ВСК, с	-17,80 (-37,46 – 1,86)	-6,27 (-13,71 – 1,17)

Показатели безопасности

Все значения показателей безопасности, за исключением концентрации лейкоцитов, находились внутри границ нормальных диапазонов [14, 15] как до проведения моделирующих манипуляций, так и после них. При анализе концентраций лейкоцитов 8 (40,0%) значений, зарегистрированных после проведения моделирующих процедур, превышали верхнюю границу референтного интервала. Статистически значимое нарастание среднего уровня показателя после моделирования также отмечено только для средней концентрации лейкоцитов крови, для прочих маркеров безопасности достоверных изменений в результате моделирования зарегистрировано не было (табл. 1).

Средние значения абсолютных показателей динамики приведены в таблице 2. ТП концентрации лейкоцитов крови отличался максимальным значением среди всех показателей безопасности и был единственным, достоверно отличающимся от нуля. Некоторый прирост уровня креатинина не был статистически значимым.

Отчётливых корреляций между абсолютными показателями динамики маркеров безопасности после выполнения моделирующего протокола обнаружить не удалось. Также были выявлены статистически значимые прямые корреляции между ΔЛ и ΔДНК (r=0,545; p=0,013), между ΔЛ и ΔЦИК (r=0,503; p=0,024), а также обратная корреляция между ΔЛ и Δанти-дсДНК, близкая к достоверному уровню (r=-0,335; p=0,060).

Таким образом, изучение безопасности моделирующего протокола показало отсутствие гибели животных и острых расстройств жизненно важных функций в процессе его выполнения. Кроме того, было продемонстрировано отсутствие отчётливых изменений для подавляющего большинства контролируемых нами маркеров острой токсичности. Концентрация лейкоцитов крови была единственным показателем безопасности с существенным темпом прироста – 27,15% – и значимыми прямыми корреляциями ΔЛ как с ΔДНК, так и с ΔЦИК. В целом, краткосрочная переносимость моделирующего протокола была вполне удовлетворительной, позволяя проводить следующий этап исследования. В дальнейшем все крысы, которым был выполнен описанный в данной статье моделирующий протокол (кроме двух животных, исключённых по причине статистических “выбросов”), были использованы для изучения метода экстракорпоральной коррекции нарушений катаболизма нуклеопротеинов [16].

Обнаруженный при моделировании лейкоцитоз, как и корреляционные взаимосвязи ΔЛ, по нашему мнению, можно связать с неспецифической реакцией на внутрибрюшинное введение хроматинсодержащего экстракта. Незначительная динамика концентрации Кр после введения анти-ДНК объяснялась, по-видимому, недостаточным для отчетливой реакции временем экспозиции антител перед промежуточным отбором крови. Аналогичный латентный период после введения животным патогенных анти-дсДНК был также описан другими авторами [17, 18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставив результаты моделирования с имеющимися в настоящее время данными литературы о нарушении катаболизма ДНК при СКВ, можно сделать вывод о том, что индуцированные у крыс изменения концентраций анти-дсДНК, ЦИК, ДНК, равно как и появление депозитов IgG в почках, соотносились с исходными уровнями этих показателей аналогично тому, как уровни данных маркеров при СКВ у человека соотносятся с нормой. В частности, валидность внешних проявлений (face validity) заключалась в сходстве полученных нами изменений показателей катаболизма ДНК у крыс с проявлениями СКВ у человека [19], а структурная валидность (construct validity) – в появлении у крыс одного из главных гистологических маркеров СКВ – депозитов иммунных комплексов в почках. Следовательно, валидность данной модели следует признать вполне достаточной для доклинического испытания методов экстракорпоральной коррекции катаболизма нуклеопротеидов. Данная модель не воспроизводит всего спектра проявлений СКВ; так, лейкоцитоз у крыс не соответствует преобладающей у больных СКВ лейкопении. Тем не менее, в отсутствие иных способов, равно как и адекватных лабораторных моделей этого заболевания на крупных животных, избранный нами метод моделирования представляется вполне целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Choi J., Kim S.T., Craft J.* (2012) Curr. Opin. Immunol., **24**, 651-657.
2. *Frieri M.* (2013) Ann. Allergy Asthma Immunol., **110**(4), 228-232.
3. *Seredkina N., Van Der Vlag J., Berden J., Mortensen E., Rekvig O.P.* (2013) Mol. Med., **19**, 161-169.
4. *Wallace D.J., Hahn B.H.* (2013) Dubois' Lupus erythematosus and related syndromes, Elsevier Saunders, Philadelphia.
5. *Rullo O.J., Tsao B.P.* (2013) Ann. Rheum. Dis., **72**(s2), 56-61.
6. *Perry D., Sang A., Yin Y., Zheng Y.-Y., Morel L.* (2011) J. Biomed. Biotechnol., Article ID 271694, 19 pages.
7. *Jiang N., Reich III C.F., Pisetsky D.S.* (2003) Blood, **102**(6), 2243-2250.
8. *Javois L.C.* (1999) Immunocytochemical methods and protocols, Humana Press, Totowa NJ.
9. *Лемперт Б.А.* (1988) Лаб. дело, №1, 28-29.
10. *Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T., Haugland R.P.* (1997) Anal. Biochem., **249**(2), 228-238.
11. *Hochberg M.C.* (1997) Arthritis Rheum., **40**, 1725.
12. *Соловьев С.К., Асеева Е.А.* (2007) Науч.-практ. ревматол., №4, 47-54.
13. *Прусов А.Н., Зацепина О.В.* (2002) Биохимия, **67**(4), 508-517.
14. *Sharp P.E., La Regina M.C.* (1998) The laboratory rat, CRC Press, Boca Raton.
15. *Fox J.G., Anderson L.C., Loew F.M., Quimby F.W.* (2002) Laboratory animal medicine, Elsevier Academic Press, Amsterdam.
16. *Трофименко А.С., Гонтарь И.П., Парамонова О.В., Симакова Е.С., Зборовская И.А.* (2015) Биомед. химия, **61**, 622-627.
17. *Tincani A., Balestrieri G., Allegri F., Cattaneo R., Fornasieri A., Li M., Sinico A., D'Amico G.* (1993) Clin. Exp. Rheumatol., **11**, 129-134.
18. *Stoll M.L., Gavalchin J.* (2000) Rheumatology, **39**(1), 18-27.
19. *Зборовская И.А., Трофименко А.С., Гонтарь И.П., Романов А.И., Симакова Е.С., Парамонова О.В.* (2013) Кремлевская медицина. Клинический вестник, №3, 85-89.

Поступила: 05. 05. 2014.

EXPERIMENTAL MODELING OF NUCLEOPROTEIN DISPOSAL DISORDERS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

A.S. Trofimenko[1], I.P. Gontar[1], O.V. Paramonova[2], E.S. Simakova[1], I.A. Zborovskaya[1]

[1]Research Institute for Clinical and Experimental Rheumatology RAMS,
76 Zemlyachki str., Volgograd, 400138 Russia; e-mail: a.s.trofimenko@mail.ru
[2]Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

The objective of this research was to adapt the experimental model simulating the nucleoprotein disposal disorders in systemic lupus erythematosus (SLE) for further study of its extracorporeal correction, as well as to assess validity of the model by short-term experiment. Twenty to female Wistar rats were intraperitoneally injected with the chromatin-containing extract from bovine liver followed by intravenous administration of anti-DNA antibodies derived from SLE patients. After these procedures plasma concentrations of anti-dsDNA, circulating immune complexes and DNA became sharply increased, together with distinct elevation of leukocytes. On the contrary, changes in erythrocytes, platelets, total protein concentration, creatinine, asparagine and alanine aminotransferase activities, as well as blood coagulation time were changed insignificantly. Using direct immunofluorescence of cryosections, we detected human IgG deposition in rat kidneys treated in accordance with the simulation protocol. Thus, our model reproduces essential DNA disposal disorders in SLE without any animal death or the life-threatening changes in examined markers during short-term experiment.

Key words: systemic lupus erythematosus, biosimulation, anti-DNA antibodies, chromatin, DNase I