



УДК 577.155.2

ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ АНТИ-ДНК sIgA-АНТИТІЛ МОЛОКА КЛІНІЧНО ЗДОРОВИХ ПОРОДІЛЬ

М. О. Старикович, Р. С. Стойка, Ю. Я. Кім

*Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна
e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua*

Раніше нами було показано, що препарати імуноглобулінів, ізольованих із молока клінічно здорових породіль осадженням 50% сульфатом амонію, є токсичними щодо деяких трансформованих і пухлинних клітин *in vitro* (Кіт Ю. та інші, Біотехнологія 2008). Ми припустили, що такий цитотоксичний ефект пов'язаний із наявністю в досліджуваних препаратах анти-ДНК sIgA-антитіл. Щоб перевірити цю гіпотезу, із молока клінічно здорових породіль за допомогою постадійних хроматографій на протеїн А-сефарозі, ДЕАЕ-сорбенті і ДНК-целюлозі було одержано електрофоретично гомогенні препарати анти-ДНК sIgA. Встановлено, що чутливість клітин до дії цих АТ змінюється у послідовності L929 > L1210 > Jurkat > Namalva. За допомогою тесту зв'язування клітин із анексином V і визначення інтенсивності фрагментації ДНК встановлено, що загибель клітин-мішеней за дії анти-ДНК sIgA відбувається шляхом апоптозу. Крім того, визначено антигенну реактивність анти-ДНК sIgA-антитіл щодо клітин лінії L929.

У результаті проведених досліджень показано, що препарати анти-ДНК sIgA антитіл викликають загибель пухлинних і трансформованих клітин *in vitro* шляхом апоптозу.

Ключові слова: молоко людини, молозиво породіль, аутоантитіла, анти-ДНК sIgA, пухлинні клітини, цитотоксичність.

ВСТУП

Імунна система ссавців не лише забезпечує захист організму від впливу шкідливих чинників довкілля, але також задіяна у регуляції біологічних функцій, які визначають його гомеостаз [1]. Важливу роль у підтриманні гомеостазу відіграють антитіла (АТ), спрямовані як до чужорідних антигенів, так і до антигенів власного організму (ауто-АТ) [1, 2]. Ауто-АТ виявлені не лише в організмі клінічно здорових людей, але й у хворих на аутоімунні та онкологічні захворювання [3]. У клінічно здорових людей ауто-АТ представлені головним чином низькоафінними поліспецифічними імуноглобулінами класу М або високоспецифічними низькоафінними імуноглобулінами класу G (антиідіотипові АТ), які залучені до регуляції імунної відповіді [3, 4]. У хворих на аутоімунні захворювання виявлено високоспецифічні

ауто-АТ класу IgG, які можуть безпосередньо брати участь у розвитку аутоімунних процесів [5]. Визначення вмісту цих ауто-АТ у сироватці крові людей знайшло широке використання у діагностиці різних аутоімунних захворювань, а також у прогнозуванні розвитку хвороби у пацієнтів [6].

У секреторних рідинах людини також виявлено ауто-АТ різної специфічності. Значний рівень секреторного імуноглобуліну А (slgA) зі спорідненістю до актину, міозину, тубуліну і спектрину людини виявлено у слині та молозиві клінічно здорових людей. Такі імуноглобуліни отримали назву поліспецифічних slgA-антитіл (полі-slгA). Вважається, що полі-slгA із широкою антигенною специфічністю продукуються В1-лімфоцитами і забезпечують захист слизових оболонок матері й дитини від дії патогенної мікрофлори [8].

Іншим типом ауто-АТ, виявлених у секреторних рідинах людини, є вузькоспецифічні анти-альфа-галактозильні АТ (анти-Gal АТ). Анти-Gal АТ здатні взаємодіяти із вуглеводними залишками Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GalNAc-R (альфа-галактозильними епітопами) [9, 10]. Вони синтезуються близько 1% В-лімфоцитів у відповідь на дію антигенів бактерій кишечника. Анти-Gal АТ було виявлено у людському молоці, слині, вагінальних змивах і жовчі. Вони здатні аглютинувати еритроцити кроля (ЕКА-АТ) і зв'язувалися з тироглобуліном бика, які містили альфа-галактозильні епітопи.

Іншими авторами було визначено рівень антифосфоліпідних АТ у слині клінічно здорових людей [11]. Специфічні антифосфоліпідні IgA було знайдено у слині 38% клінічно здорових людей. Ці ауто-АТ, головним чином, зв'язуються з аніонними фосфоліпідами (кардіоліпіном, фосфатидилсеринном, фосфорною кислотою), але не зв'язуються із фосфатидилхоліном і сфінгомієліном.

На відміну від секреторних рідин, де рівень slgA є високим (3–5 мг/мл), у сироватці крові клінічно здорових людей вміст slgA є низьким і становить у середньому 10–20 мг/л. Встановлено, що при деяких хронічних захворюваннях печінки і шлунково-кишкового тракту, аутоімунних, онкологічних і деяких інфекційних захворюваннях вірусного та бактерійного походження, а також у період вагітності, рівень slgA у сироватці крові людини значно зростає [12–19]. Функціональна активність секреторних імуноглобулінів у плазмі крові ще недостатньо вивчена, хоча є дані, що дія цих антитіл може бути пов'язана з їхнім впливом на клітини імунної системи [12].

У попередніх дослідженнях [20] нами було встановлено, що препарати антитіл, виділені із молозива породіль, суттєво відрізняються між собою за дією на лейкемічні Т-клітини лінії Jurkat. Вони здатні індукувати апоптоз Т-клітин лінії Jurkat або стимулювати проліферацію цих клітин *in vitro*. Отримані дані свідчать про те, що секреторні антитіла можуть також впливати на ріст і виживання лейкемічних клітин людини.

Встановлено, що до складу цих секреторних ауто-АТ молока входять slgA зі спорідненістю до прокаріотичної та еукаріотичної ДНК (анти-ДНК slgA) [21]. Показано, що анти-ДНК slgA мають протеїназну та нуклеазну активність (ДНК- та РНК-гідролізуюча активність) і належать до класу каталітично активних антитіл (абзимів) [22]. Анти-ДНК АТ класу IgG із подібною антигенною специфічністю і каталітичною активністю раніше було виявлено у сироватці крові хворих на системний червоний вовчак [23, 24]. Встановлено, що анти-ДНК IgG-антитіла індукують каспазозалежний апоптоз у клітин промієлоцитів людини лінії HL-60, Т-клітин лімфоми людини лінії Raji, трансформованих фібробластів миші лінії L929, клітин людської еритролейкемії лінії K562 *in vitro* [25, 26]. На основі цих даних ми припустили, що подібну цитотоксичну активність мають секреторні анти-ДНК slgA-антитіла.

Метою даної роботи було отримати препарати анти-ДНК sIgA з молока клінічно здорових породіль і дослідити їхній вплив на трансформовані та пухлинні клітини *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Молозиво породіль для проведення спільних досліджень було надано Л. Б. Янів (Львівський обласний перинатальний центр МОЗ України).

Виділення антитіл зі спорідненістю до ДНК (анти-ДНК АТ) із молока людини. Анти-ДНК АТ класу sIgA виділяли із молозива клінічно здорових породіль, як описано [27]. Аффінним сорбентом слугувала ДНК-целюлоза (НИКТИБАВ, Бербск, Російська Федерація). Фракції імуноглобулінів, очищені хроматографією на протейн А сефарозі та DEAE-фрактогелі, діалізували проти 20 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,5 протягом 18 год. Секреторні IgG і sIgA розділяли хроматографією на колонці об'ємом 2 мл зі сорбентом Fractogel TSK DEAE-650 (M) (Merck, Німеччина). sIgA-антитіла елюювали 140 мМ трис-НСІ буфером, рН 7,5. На колонку із ДНК-целюлозою (об'єм 3 мл), попередньо зрівноважену цим же буфером, наносили 3–5 мг очищених sIgA. Колонку промивали буфером для нанесення і анти-ДНК АТ елюювали 50 мМ NaOH. Елюат нейтралізували 0,1 М гліцин-НСІ, рН 2,6 і діалізували проти буфера А. Концентрацію білка у препаратах анти-ДНК АТ вимірювали при довжинах хвилі 280 нм на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, USA).

Вестерн-блот аналіз препаратів sIgA, виділених із молозива. Препарати анти-ДНК sIgA, виділених із молозива, проводили згідно з [29], були проаналізовані SDS-електрофорезом у 12–15% ПААГ (32). Білки в гелі фарбували Coomassie Brilliant Blue G-250. Для вестерн-блот аналізу білки переносили з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану (Hybond, США) дією електричного струму з подальшою обробкою одержаних блотів упродовж 1 год міченими пероксидазою антитілами, (anti-human IgA alpha-chain specific). Білкові зони, що взаємодіяли з антитілами виявляли за допомогою хемілюмінесценції. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували за кімнатної температури протягом 1 год за допомогою 5%-BSA у ФСБ з 0,05% Tween-20.

Клітини та їхнє культивування. У роботі використовували клітинні лінії, одержані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології НАН України: Jurkat – лейкоцитні Т-лімфоцити периферичної крові людини, MT-4 – лейкоцитні Т-лімфоцити периферичної крові людини, Namalwa – В-лімфоцити людини (лімфома Беркіта); L1210 – лейкоцитні В-лімфоцити миші, L929 – трансформовані фібробласти миші. Клітини культивували у середовищі RPMI-1640 або DMEM („Sigma”, США) за присутності 10% сироватки крові ембріонів ВРХ („Sigma”, США) і 50 мкг/мл гентаміцину („Sigma”, США).

Визначення індексу життєздатності клітин ссавців *in vitro* у присутності анти-ДНК sIgA молока людини. Клітини інкубували із препаратами АТ (кінцева концентрація 0,7 мг/мл) протягом 24, 48 або 72 год. Фарбування клітин здійснювали 0,1% водним розчином трипанового синього. Кількість незабарвлених живих і забарвлених мертвих клітин підраховували у гемоцитометричній камері під світловим мікроскопом Біолам Р (ЛОМО, Російська Федерація).

Індекс життєздатності (ІЖ) визначали за формулою:

$$ІЖ = O/C \times 100,$$

де O – кількість живих клітин у культурі під впливом АТ; C – кількість живих клітин у культурі за відсутності дії АТ.

Виявлення транслокації фосфатидилсерину на зовнішній бік плазматичної мембрани клітин. До клітин, культивованих у 96-лунковому планшеті, після видалення середовища й промивання ФСБ у 100 мкл буфера для зв'язування (10 мМ HEPES/NaOH, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂) додавали 5 мкл розчину кон'югованого з флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) анексину V, що зв'язується з фосфатидилсерином [2], і 0,1 мкг пропідію йодиду (Sigma), який проникає у клітини з пошкодженою мембраною та зв'язується з ядерною ДНК. Через 15 хв інкубації у темряві аналізували клітини за допомогою флуоресцентного мікроскопа (Carl Zeiss AxioImager A1), обладнаного камерою (Carl Zeiss AxioCam MRm). Використовуючи об'єктив 20×, підраховували кількість клітин щонайменше в 6-ти полях зору в 3-х паралельних зразках.

Аналіз фрагментації ДНК Т-клітин лінії Jurkat під впливом анти-ДНК sIgA молока людини. Клітини після культивування із препаратами АТ осаджували центрифугуванням при 2000 об·хв⁻¹ протягом 5 хв. До осаду клітин додавали 0,5 мл холодного ЗФР і фіксували, повільно додаючи до суспензії клітин 5 мл холодного розчину 70% етанолу. Клітини залишали на 12 год за -20°C (деякі зразки зберігали при даній температурі протягом 3–4 тижнів). Після цього клітини центрифугували при 2000 об·хв⁻¹ протягом 5 хв. Осад клітин (2–3 млн клітин) ресуспендували у 40 мкл фосфат-цитратного буфера рН 7,8 та залишали за кімнатної температури на 30 хв. Після центрифугування при 3000 об·хв⁻¹ протягом 5 хв надосадову рідину переносили у свіжу пробірку типу Еппендорф, додавали 3 мкл 0,25% водного розчину NP-40 („Sigma”, США) та 2 мкл 1% водного розчину РНК-ази А („Merck”, Німеччина). Після 1-годинної інкубації за 37°C до суспензії додавали 5 мкл протеїнази К („Merck”, Німеччина) (0,1% водний розчин) та інкубували 1 год за 37°C. Після інкубації до препарату ДНК додавали 12 мкл буферу, який містив 0,25% бромфенолового синього, 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 50% гліцерину і розділяли в 1% гелі агарози („Merck”, Німеччина) за присутності 0,005% етидію броміду за напруги 4 В·см⁻¹ протягом 2 год. Фрагменти ДНК виявляли при ультрафіолетовому освітленні та фотографували цифровою камерою Nikon Coolpix 4200.

Визначення антигенної реактивності анти-ДНК sIgA-антитіл. Клітини трансформованих фібробластів мишей L929 культивували за описаних вище умов. Клітини промивали ЗФР центрифугуванням при 1500 г впродовж 10 хв. Для лізування до осаду клітин додавали ізотонічний буфер (10 мМ трис-НСІ, рН 7,2) і заморожували впродовж 5 хв за температури рідкого азоту. До замороженого осаду клітин додавали 500 мкл ізотонічного буфера і суміш інгібіторів протеїназ („Sigma”, США) у співвідношенні 1:10. Клітини руйнували у скляному гомогенізаторі на льоду і субфракції клітин розділяли центрифугуванням при 3000 г упродовж 30 хв за 4°C. Мембранно-цитоплазматичну (надосад) і ядерну (осад) фракції розчиняли в 20 мМ трис-НСІ, рН 7,8 буфері в присутності 0,5% NP-40 і 1% дезоксихолату-Na. Розчини білків центрифугували при 10 000 г упродовж 10 хв, у надосаді вимірювали вміст білка і до аліквот (30 мкг білка) додавали буфер Леммлі. Білки розділяли SDS-електрофорезом у градієнті ПААГ (7–16,5%) і переносили на нітроцелюлозну мембрану, як описано вище [29]. Мембрану фарбували 1% розчином Ponso S в 10% оцтовій кислоті, відмивали від фарби у дистильованій воді і сканували. Після блокування (3% БСА в ЗФРТ) мембрану інкубували із анти-ДНК sIgA (10 мкг·мл⁻¹) упродовж 18 год за 4°C. Мембрану промивали у ЗФРТ й інкубували з антитілами кози моноспецифічними щодо важких ланцюгів IgA людини і кон'югованими із пероксидазою хрому (Sigma-Aldrich, США) у розведенні (1/1000). Імунореактивні білки виявляли за реакцією

посиленої хемілюмінесценції. Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1–15 хв.

Статистична обробка результатів досліджень. Усі досліди повторювали 3–5 разів. У роботі наведено середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Статистичний аналіз проводили за критерієм Стюдента (t). Вірогідними вважали дані у випадку, коли $p \leq 0,05$. Побудову графіків і статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Origin 4.0 та Excel 97.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Анти-ДНК sIgA виділяли із молока послідовними хроматографіями згідно зі схемою на рис. 1. Вона включає: 1) отримання „плазми” молозива центрифугуванням молока; 2) виділення із молозива (молока) сумарної фракції АТ хроматографією на колонці із протеїн А-сефарозою; 3) розділення IgG- і sIgA-антитіл іонообмінною хроматографією на колонці із DEAE-фрактогелем; 4) очищення анти-ДНК sIgA на колонці із ДНК-целюлозою. Електрофоретичний аналіз очищених на ДНК-целюлозі білків (рис. 2, А) показав, що вони складаються лише із білків (рис. 2, Б, доріжка 1), які за молекулярною масою відповідають секреторному компоненту (SC), а також важким (H) і легким (L) ланцюгам sIgA [30].

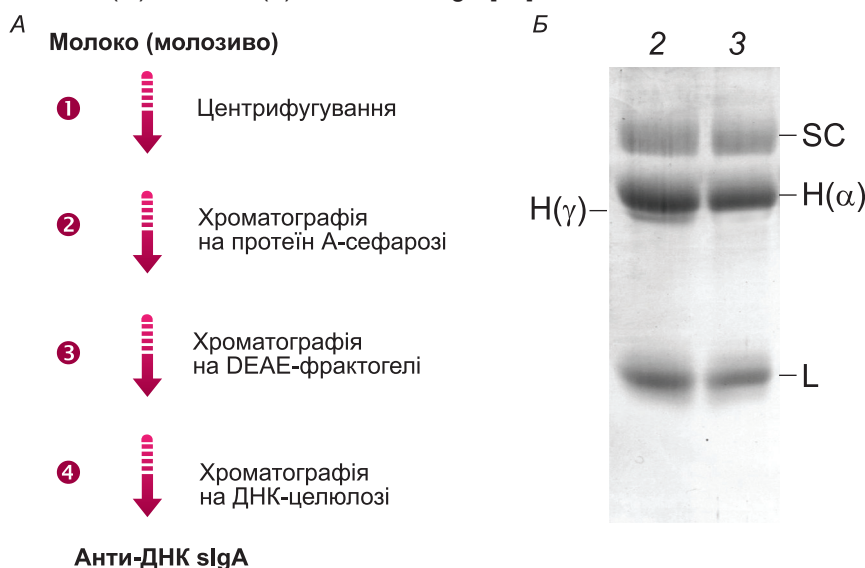


Рис. 1. Схема виділення sIgA із молозива породіль (А) й електрофореграма (Б) білків другої (доріжка 2) і третьої (доріжка 3) стадії очищення. SC – секреторний компонент молекули sIgA, H(γ) – важкі ланцюги IgG, H(α) – важкі ланцюги sIgA, L – легкі ланцюги sIgA

Fig. 1. The scheme of purification of anti-DNA sIgA-antibodies from the colostrum and milk of healthy women (A). Electrophoretic analysis (B) of the Abs of second (lane 2) and third (lane 3) stages of purification is presented. H(γ) – heavy chains of IgG, H(α) – heavy chains of sIgA and L – light chains of sIgA, respectively. SC – secretory component of sIgA

Для підтвердження того, що отримано саме препарат sIgA, було проведено імуноблот-аналіз одержаних зразків. Антитіла, одержані з колонки, що містила ДНК-целюлозу, 50 мМ NaOH і гомогенність препаратів sIgA аналізували електрофорезом у системі Леммлі (рис. 2, доріжка 2). Після переносу білків на нітроцелю-

лозну мембрану визначили їхню належність до імуноглобулінів класу А завдяки антитілам до IgA, специфічних до важких ланцюгів імуноглобуліну А людини, кон'югованих з пероксидазою хрому. Отже, із молока клінічно здорових жінок шляхом постадійних хроматографій вдалося отримати гомогенний sIgA зі спорідненістю до ДНК тимусу теляти (анти-ДНК sIgA).

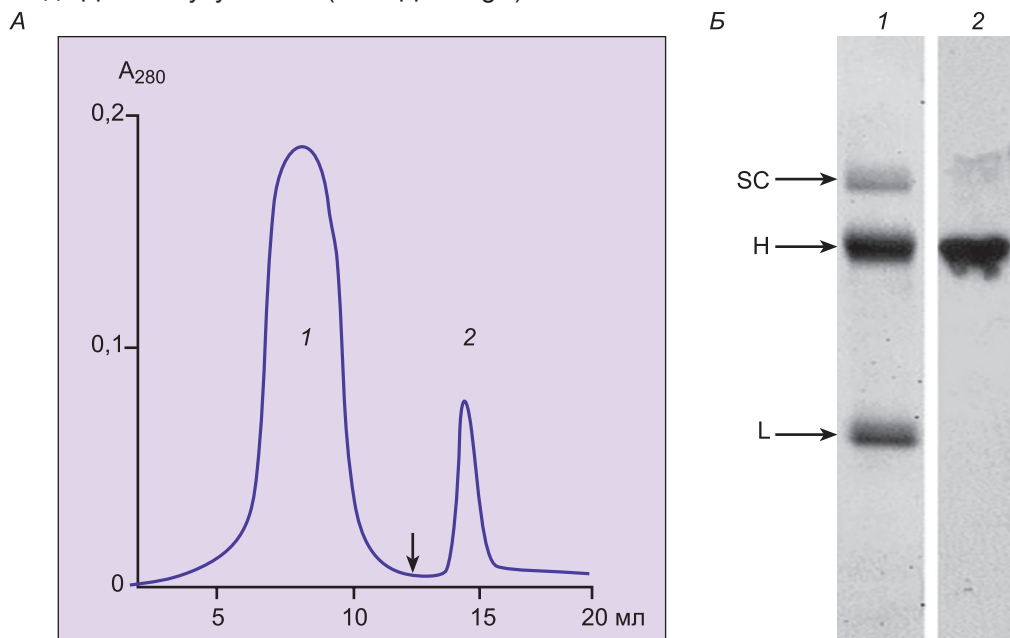


Рис. 2. Виділення анти-ДНК sIgA із молока людини: А – хроматографія sIgA на колонці із ДНК-целюлозою: 1 – білки, які не зв'язалися із ДНК; 2 – анти-ДНК sIgA. Стрілкою вказано початок елюції білків 50 мМ NaOH; Б – електрофоретичний аналіз гомогенності очищених білків. 1 – SDS-електрофорез у 12% ПААГ препарату анти-ДНК sIgA; 2 – імуноблот-аналіз білків із використанням кон'югованих із пероксидазою хрому кролячого IgG, специфічного до Н-ланцюга IgA людини. SC – секреторний компонент, Н – важкий ланцюг, L – легкий ланцюг молекули sIgA

Fig. 2. Isolation of anti-DNA sIgA from human milk: А – chromatography of sIgA on DNA-cellulose column: Peak 1 – unbound fraction of sIgA; peak 2 – anti-DNA sIgA eluted with 50 mM NaCl. Arrow indicated the beginning of elution of proteins 50 mM NaOH. Б – electrophoretic analysis of homogeneity of purified proteins. 1 – SDS-electrophoresis in 12% PAAG anti-DNA sIgA; 2 – immunoblotting of chromatographic fraction proteins with using the anti H-chain of human IgA antibodies. SC – secretory component, H – heavy chain, L – light chain of sIgA molecules

Як уже згадувалося вище, важливою властивістю анти-ДНК АТ, виділених із сироватки крові хворих на системний червоний вовчак, є їхня здатність індукувати загибель клітин шляхом апоптозу [25, 26]. Подібну цитотоксичну активність було показано і для анти-ДНК IgG, очищених із молока клінічно здорових жінок [31].

Ми дослідили вплив препаратів анти-ДНК sIgA молозива породіль на життєздатність деяких ліній трансформованих і лейкемічних клітин. Вплив АТ на ріст і виживання клітин *in vitro* визначали за індексом життєздатності (ІЖ). Аналіз одержаних даних, наведених на рис. 3, свідчить про те, що використані нами лінії клітин суттєво відрізняються між собою за чутливістю до препаратів анти-ДНК sIgA. Найбільш чутливими до дії АТ були трансформовані фібробласти миші лінії L929 (ІЖ \leq 20). Значно меншу активність ці імуноглобуліни мали щодо Т-клітин лінії Jurkat (ІЖ \geq 40) та В-клітин лінії L1210 (ІЖ \geq 30). Найменш чутливими до дії анти-ДНК sIgA були В-клітини

лейкемії людини лінії Namalwa ($IЖ \geq 60$). Ці результати свідчать про те, що анти-ДНК sIgA молока клінічно здорових породіль, подібно до анти-ДНК IgG сироватки крові хворих на системний червоний вовчак, здатні індукувати загибель пухлинних клітин *in vitro* [25, 26].

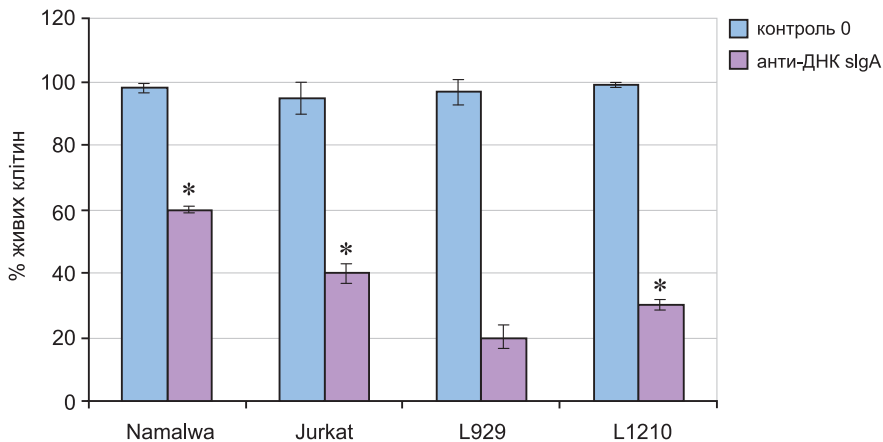


Рис. 3. Цитотоксична активність sIgA-антитіл щодо пухлинних і трансформованих клітин *in vitro*. Клітини інкубували із анти-ДНК sIgA (0,07 мг/мл) упродовж доби: (контроль) – середні значення кількості клітин за відсутності дії АТ; анти-ДНК sIgA – середні значення кількості клітин за присутності АТ. (*), $p \leq 0,05$

Fig. 3. Cytotoxic activity of sIgA-antibodies toward tumor and transformed cells *in vitro*. Cells were incubated for 24 h with anti-DNA sIgA (0,07 mg/ml). Control – number of cells in the absence AB, anti-DNA sIgA – amount of cells in the presence of AB. (*), $P \leq 0,05$

Відомо, що клітини, які зазнали впливу екстремальних чинників, можуть вступити на шлях апоптозу. Важливу роль у цьому процесі визначає фосfolіпід фосфатидилсерин плазматичної мембрани. Наприклад, дія активних форм кисню спричиняє окиснення фосфатидилсерину та його експонування на зовнішній шар плазматичної мембрани. За допомогою рецептора, який розпізнає цей фосфатидилсерин на зовнішньому ліпідному боці та зв'язується з ним, надходить сигнал про вступ клітини на шлях апоптозу [33]. Враховуючи сказане вище, ми вирішили перевірити, як діє на плазматичну мембрану анти-ДНК sIgA. Для цього було використано лінію L929 мишачих фібробластів, що є найбільш чутливою до дії досліджуваних препаратів. Для того щоб з'ясувати, який саме механізм загибелі клітин індукують використані в роботі препарати АТ (некроз, апоптоз і т.д.), було застосовано тест зв'язування клітинами флуоресцентно-міченого анексину V, що має здатність вибірково зв'язуватися із фосфатидилсерином [32].

Після 24-годинної інкубації трансформованих фібробластів із препаратами анти-ДНК sIgA або за їхньої відсутності (контроль) підраховували кількість клітин, зв'язаних з анексином V (рис. 4). Встановлено, що у контролі близько 5% клітин було анексин V-позитивними, тоді як за дії антитіл цей відсоток сягав 30%. Як у контролі, так і в досліді лише 2% клітин мало ушкоджену мембрану, про що свідчить проникнення у клітину барвника пропідій йодиду. Зв'язування з анексином без зміни проникності мембрани свідчить про екстерналізацію фосфатидилсерину, що є характерною ознакою апоптозу. Наведені дані можуть вказувати на апоптичні зміни в цих клітинах.

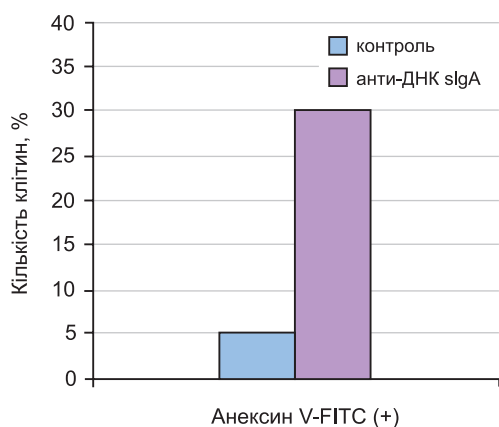
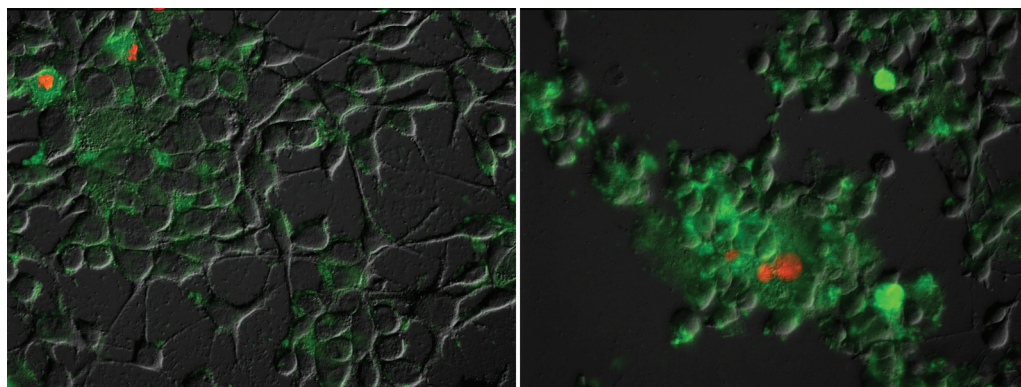


Рис. 4. Аналіз цитотоксичної активності анти-ДНК slgA молозива жінок-породіль щодо клітин лінії L929. (+) – клітини, забарвлені анексин V-FITC

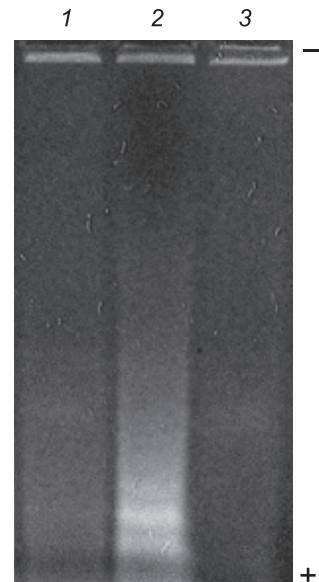
Fig. 4. Using of annexin V – test for analysis of cytotoxic activity of anti-DNA slgA toward L929 cells. Annexin V-FITC (+) – the cells stained with annexin V

Для підтвердження висловленої вище гіпотези і даних щодо зв'язування анексину V було використано альтернативну методику. Проаналізували стан ДНК клітин-мішеней, використавши для цього метод електрофорезу ДНК у гелі агарози. З даних, наведених на рис. 5 (доріжка 2), видно, що препарати анти-ДНК slgA, очищених хроматографією на ДНК-целюлозі, здійснюють свою цитотоксичну дію щодо Т-клітин лінії Jurkat шляхом апоптозу. Адже ДНК цих клітин є фрагментованою на моно- і олігонуклеосомні ділянки. У випадку використання фракції slgA, одержаних хроматографією на протеїн А – сефарозі (рис. 5, доріжка 1) та фракції slgA, що не зв'язалась із ДНК-целюлозою (рис. 5, доріжка 3), подібної дії не виявляли.

На сьогодні залишається нез'ясованим, за яким саме механізмом відбувається індукція апоптозу у клітин за дії анти-ДНК slgA. Можна припустити, що цитотоксична активність цих секреторних антитіл є подібною за механізмом дії на пухлинні і трансформовані клітини раніше описаних анти-ДНК IgG сироватки крові хворих на СЧВ [25, 26]. Однією із найбільш характерних ознак цих ауто-АТ є їхня здатність зв'язуватися з білковими антигенами клітин-мішеней [35, 36]. Для перевірки цього припущення клітини L929 лізували у гіпотонічному буфері й антигенну специфічність анти-ДНК slgA-антитіл щодо білків субклітинних фракцій, одержаних центрифугуванням, визначали за допомогою вестерн-блот аналізу. Встановлено, що секреторні анти-ДНК АТ мають спорідненість щодо різних білків трансформованих фібробластів миші лінії L929 (рис. 6). Серед цих білків антигенами можуть бути як

Рис. 5. Руйнування ДНК клітин лінії L929 під впливом АТ молока людини. Електрофорез ДНК клітин за дії: доріжка 1 – фракції sIgA, отриманих хроматографією на протеїн А – сефарозі (рис. 1, стадія 3); доріжка 2 – анти-ДНК sIgA, очищених хроматографією на ДНК-целюлозі (рис. 1, стадія 4); доріжка 3 – фракції sIgA, що не зв'язалась із ДНК-целюлозою

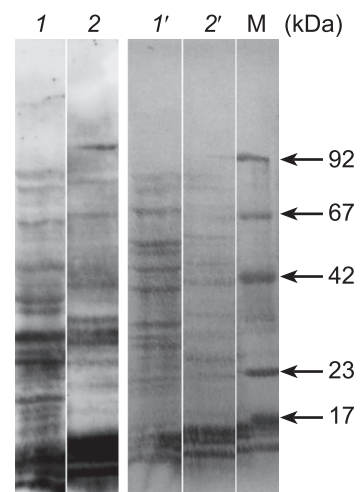
Fig. 5. Nuclear DNA fragmentation in L929 cells after their incubation with anti-DNA sIgAs. DNA-electrophoresis of cells after treatment: 1 – sIgAs, obtained by chromatography on protein A-sepharose (Fig. 1, stage 3); 2 – anti-DNA sIgA, purified by chromatography on DNA-cellulose. (Fig. 1, stage 4), 3 – fraction of sIgA unbound to DNA-cellulose



білки плазматичної мембрани та цитоплазми клітин (рис. 6, доріжки 1, 1'), так і білки клітинного ядра і цитоскелету (рис. 6, доріжки 2, 2'). Ці дані вказують на те, що індукція загибелі клітин за дії анти-ДНК sIgA-антитіл може відбуватися рецепторопосередкованим шляхом [36]. Іншою спільною ознакою анти-ДНК sIgA- і анти-ДНК IgG-антитіл є їхня здатність гідролізувати ДНК і РНК різного походження [23–26, 34]. Окрім цього, нами показано, що каталітично активні анти-ДНК sIgA гідролізують ядерну ДНК клітин ссавців, що може призводити до руйнування хроматину [27]. Індукція апоптозу трансформованих і пухлинних клітин через прояв нуклеазної активності є характерною властивістю анти-ДНК IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ [25, 26, 34]. Важливою умовою проапоптотичної дії цих каталітично активних IgG-антитіл (абзимів) є їхня здатність проникати у клітини-мішені ссавців

Рис. 6. Вестерн-блот аналіз антигенної специфічності анти-ДНК sIgA щодо субфракцій клітин трансформованих фібробластів миші, лінії L929. Доріжки 1, 1' – надосадова рідина лізатів клітин; доріжки 2, 2' – осад лізатів клітин. М – маркери молекулярної маси білків. Доріжки 1, 2 – мембрани, оброблені анти-ДНК sIgA-антитілами; доріжки 1', 2' – мембрани, зафарбовані Ponso S

Fig. 6. Western-blot analysis of the antigenic specificity of anti-DNA sIgA toward different subtracting of transformed mouse fibroblasts L929. Lanes 1, 1' – supernatant of cell lysates; lanes 2, 2' – pellet of cell lysates. M – molecular mass of protein markers. Lanes 1, 2 – the membranes were treated with anti-DNA sIgAs; lanes 1', 2' – the membranes were stained with Ponso S



[26, 34]. Залишається невідомим, чи можуть анти-ДНК sIgA молока людини інтерналізуватися в пухлинні клітини подібно до анти-ДНК IgG-антитіл сироватки крові хворих на СЧВ. Відповідь на це питання можуть прояснити деякі молекулярні механізми цитотоксичної активності анти-ДНК sIgA секреторних рідин людини.

ВИСНОВКИ

1. Молозиво клінічно здорових породіль містить анти-ДНК sIgA.
2. Ізольовані анти-ДНК sIgA молока є токсичними щодо трансформованих і пухлинних клітин ссавців *in vitro*. Чутливість клітин змінюється у послідовності L929 > L1210 > Jurkat > Namalva.
3. Під дією препарату анти-ДНК sIgA, очищених хроматографією на ДНК-целюлозі на клітини лінії L929, відбувається транслокація фосфатидилсерин на зовнішній бік плазматичної мембрани клітин, без зміни проникності плазматичної мембрани. Ці дані вказують на апоптичні зміни в досліджуваних клітинах.
4. Електрофорез у гелі агарози ДНК клітин-мішеней показав, що препарати анти-ДНК sIgA, очищених хроматографією на ДНК-целюлозі, проявляють свою цитотоксичну дію щодо Т-клітин лінії Jurkat шляхом апоптозу.
5. Секреторні анти-ДНК АТ мають спорідненість щодо широкого кола білків трансформованих мишачих фібробластів лінії L929.

Автори щиро вдячні головному лікарю Львівського перинатального центру Л. Б. Янів за надані зразки молока породіль.

1. *Полетаев А.Г.* Иммунологический гомункулус (иммункулус) в норме и при патологии. **Биохимия**, 2002; 67(5): 721–730.
2. *Maskay I.R.* Autoimmunity: Paradigms of Burnet and complexities of today. **Immun. Cell Biol**, 1992; 70(3): 159–171.
3. *Avrameas S.* Natural autoantibodies. From horror autotoxicus to gnathia seauton. **Immunol. Today**, 1991; 12(5): 154–159.
4. *Bouvet J.-P., Dighitro G.* From natural polyreactive autoantibodies to a la Carte monoreactive antibodies to infection agents: is it a small world after all? **Infection and Immunity**, 1998; 66(1): 1–4.
5. *Dawson K., Bell D.* Production and pathogenic effect of anti-DNA antibodies: relevance to antisense research. **Antisense Res. Devel**, 1991; 1(4): 351–360.
6. *Kurien B.T., Scofield R.H.* Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Scan. J. Immunol**, 2006; 64(3): 227–235.
7. *Bouvet J.-P., Pirès R., Iscaki S., Pillot J.* Nonimmune macromolecular complexes of Ig in human gut lumen: probable enhancement of antibody functions. **J. Immunol**, 1993; 151 (5): 2562–2571.
8. *Quan C.P., Berneman A., Pirès R., Bouvet J.P.* Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. **Infect. Immunol**, 1997; 65 (10): 3997–4004.
9. *Hamadeh R.M., Galili U., Zhou P., Griffiss J.M.* Anti-alpha-galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**, 1995; 2(2): 125–131.
10. *Davin J.C., Malaise M., Foidart J., Mahieu P.* Anti-alpha-galactosyl antibodies and immune complexes in children with Henoch-Schönlein purpura or IgA nephropathy. **Kidney Int**, 1987; 31(5): 1132–1139.

11. Cheng H.M., Sam C.K. Bacterial immunity and immunogenesis of normal human salivary IgA and serum IgG2 antiphospholipid autoantibody: a link? **Immunol. Lett**, 1990; 26(1): 7–10.
12. Hanson L. A., Adlerberth I., Carlsson B. et al. Antibody-mediated immunity in the neonate. **Pediatr. Padol**, 1990; 25(5): 371–376.
13. Jorgensen C., Bologna C., Gutierrez M. et al. Serum levels of secretory IgA and *in vitro* production of IgA in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol**, 1993; 11(5): 541–544.
14. Wilson T., Ganendren R. Serum concentration of secretory IgA in pregnancies delivering at term or preterm. **Prostaglandins**, 1992; 44(4): 373–378.
15. Vincent C., Cozon G., Zittoun V. et al. Secretory immunoglobulins in serum from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. **J. Clin. Immunol**, 1992; 12 (5): 381–388.
16. Кульга В.Н., Малов Ю.С., Дударенко С.В., Пасхина М.Н. Изменения уровня секреторного иммуноглобулина А в сыворотке крови больных язвой желудка. **Клин. мед**, 1999; 69(7): 60–61.
17. Collado A., Sanmarti R., Serra C. et al. Serum level of secretory IgA in ankylosing spondylitis. **Scan. J. Rheumatol**, 1999; 20(3): 153–158.
18. Fukuda Y., Imoto M., Hayakava T. Serum levels of secretory immunoglobulin A in liver disease. **Am. J. Gastroenterol**, 1985; 80(4): 237–241.
19. Kvale D., Rognum T.O., Drandtzaeg P. Elevated levels of secretory immunoglobulins A and M in serum of patient with large bowel carcinoma indicate liver metastasis. **Cancer**, 1985; 59(2): 203–207.
20. Kim Ю.Я., Старикович М.О., Білий Р.О. та ін. Імуноглобуліни молозива як молекулярні маркери доклінічної діагностики аутоімунних порушень у породіль. **Біотехнологія**, 2008; 1(3): 37–46.
21. Кит Ю.Я., Семенов Д.В., Канышкова Т.Г. и др. Секреторные иммуноглобулины А молока человека обладают сродством к олигонуклеотидам и нуклеиновым кислотам. **Биохимия**, 1999; 64(1): 52–59.
22. Кит Ю.Я., Стойка Р.С. Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини. **Укр. біохім. журн**, 2007; 79(2): 5–16.
23. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. **Биохимия**, 2002; 65(11): 1473–1487.
24. Gabibov A., Ponomarenko N., Tretyak E. et al. Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine. **Autoimm. Rev**, 2006; 5(5): 324–330.
25. Сучков С.В. Сравнительное исследование каталитических (ДНК-гидролизующих) и цитотоксических свойств анти-ДНК аутоантител. **Бюл. эксп. биол. мед**, 2001; 131(4): 420–423.
26. Kozyr A.V., Sashchenko L.P., Kolesnikov A.V. et al. Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines. **Immunol. Lett**, 2002; 80(1): 41–47.
27. Kit Yu. Ya., Kuligina E.V., Richter V.A. Secretory IgAs from human milk with affinity to mammalian DNA are capable of hydrolyzing ribosomal RNA. **Укр. біохім. журн**, 2007; 79(3): 8–13.
28. Laemmly U.K. A cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227(5259): 2244–2750.
29. Hawker R. The dot immunobinding assay. **Methods Enzymol**, 1986; 121: 484–491.
30. **Імуноглобуліни**. Под ред. Г. Лейтмена и Р. Гуда. Москва: Мир, 1981: 212–230.
31. Nevinky G.A., Buneva V.N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. **J. Immunol. Methods**, 2002; 269(1–3): 235–249.
32. Van Engeland M., Remaekers F.C., Schutte B., Reutelingsperger C.P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cyto-metry**, 1996; 24: 131–199.
33. Casciola-Rosen L., Rosen A., Petri M., Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implication for coagulation events and antigenic spread in system lupus erythematosus. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 1999; 93: 1624–1629.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ANTI-DNA sIgA-ANTIBODIES FROM MILK OF HEALTHY WOMEN

M. O. Starykovych, R. S. Stoika, Yu. Ya. Kit

Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

Earlier we have shown that immunoglobulin preparations derived from milk of healthy women by precipitation with 50% ammonium sulfate, possess toxic activity toward several transformed and tumor cells *in vitro* (Kit Y., and others, Biotechnology 2008). We hypothesized that cytotoxic effect was associated with the presence of cytotoxic anti-DNA sIgA-antibodies in the Ab preparations. To check this hypothesis, we have purified electrophoretic homogeneous anti-DNA sIgAs from human milk and studied their affect toward different tumor cells *in vitro*. Anti-DNA sIgAs were obtained by sequential chromatography on protein A-sepharose, DEAE-fractogel and DNA-cellulose columns. It was found that the sensitivity of studied cells to Ab changed in the order L929> L1210> Jurkat> Namalva. Annexin V – test, as well as DNA-fragmentation test showed that cell death under Abs action occurred by apoptosis.

Keywords: human milk, colostrum, autoantibodies, anti-DNA sIgA, tumor cells, cytotoxicity.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ-ДНК sIgA-АНТИТЕЛ КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ РОЖЕНЕЦ

М. О. Старикович, Р. С. Стойка, Ю. Я. Кит

Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

e-mail: kit@cellbiol.lviv.ua

Ранее нами было показано, что препараты иммуноглобулинов, полученные из молока клинически здоровых рожениц осаждением 50% сульфатом аммония, обладают цитотоксической активностью в отношении некоторых трансформированных и опухолевых клеток *in vitro* (Кит Ю. и другие, Биотехнология, 2008). Мы предположили, что этот цитотоксический эффект связан с наличием в препаратах анти-ДНК sIgA-антител. Для проверки этой гипотезы из молока клинически здоровых рожениц с помощью постадийных хроматографий на протеин А-сефарозе, DEAE-сорбенте и ДНК-целлюлозе были получены электрофоретически гомогенные препараты анти-ДНК sIgA. Было установлено, что чувствительность клеток к действию этих АТ меняется в соотношении L929> L1210> Jurkat> Namalva. С помощью теста связывания клеток с анексином V и теста по определению уровня фрагментации ДНК было установлено, что гибель клеток под действием анти-ДНК sIgA происходит путем апоптоза.

Ключевые слова: молоко человека, молозиво рожениц, аутоантитела, анти-ДНК sIgA, опухолевые клетки, цитотоксичность.

Одержано: 13.12.2011