

На правах рукописи

МЕЛАМУД МАРК МАРКОВИЧ

**АЛАРМИНЫ И АНТИТЕЛА К НИМ В ПАТОГЕНЕЗЕ
СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ**

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН.

Научные руководители:

Бунева Валентина Николаевна, д.б.н., профессор

Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН, г.н.с. лаборатории ферментов репарации

Ермаков Евгений Александрович, к.б.н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН, с.н.с. лаборатории ферментов репарации

Официальные оппоненты:

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН, зав. лабораторией молекулярной микробиологии

Аутеншлюс Александр Исаевич, д.б.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией патологической физиологии иммунной системы ЦНИЛ.

Королёв Максим Александрович, д.м.н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани.

Защита состоится « » 2026 г. в часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Системная красная волчанка (СКВ) – это тяжёлая мультисистемная аутоиммунная патология, характеризующаяся генерализованным нарушением иммунной толерантности и снижением качества жизни пациентов. Аутоиммунная природа СКВ подразумевает масштабные патологические изменения в иммунной системе. Среди молекул, связанных с патогенезом СКВ, наиболее изучены цитокины и различные аутоантитела [Chen Z. Et al., 2025; Pagkopoulou et al., 2025]. Однако за последние десять лет все больше исследований посвящены изучению роли молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs, от англ. damage-associated molecular patterns) или аларминов в патогенезе СКВ [Danieli M. G., et al., 2022]. К аларминам относят разнообразные молекулы (например, внеклеточная ДНК (вкДНК), гистоны, негистоновый белок HMGB1 и др.), высвобождающиеся из повреждённых клеток и стимулирующие провоспалительный иммунный ответ [Roh J. S., et al., 2018]. По современным представлениям, участие аларминов характерно для патогенеза многих аутоиммунных ревматических заболеваний, включая СКВ [Danieli M. G., et al., 2022]. Тем не менее, вклад аларминов в активацию провоспалительных процессов при СКВ и других ревматических заболеваниях еще недостаточно исследован, а данные о концентрации циркулирующих аларминов при таких патологиях зачастую фрагментарны.

Патогенез СКВ неразрывно связан с образованием аутоантител – главным образом, анти-ДНК антител, считающихся высокоспецифичным маркером этого заболевания [Pisetsky D. S., et al., 2016]. Однако механизмы образования таких антител до конца не установлены. Считается, что клеточные компоненты, высвобождаемые при их гибели, в том числе путем некроза, могут быть источником аутоантигенов, способствующих нарушению ауто толерантности и образованию антител [Salemme R., et al., 2019]. Одним из таких антигенов может выступать вкДНК, в том числе в составе ДНК-белковых комплексов [Magna M., et al., 2016; Mondelo-Macia P., et al., 2021]. Другие алармины, например, гистоны и негистоновый белок HMGB1, также могут выступать в качестве антигенов [Magna M., et al., 2016]. Тем не менее, связь концентрации циркулирующих аларминов с уровнем антител к ним недостаточно изучена при СКВ. Изучение роли антител при СКВ чаще всего сфокусировано на их канонических функциях (агглютинация, нейтрализация и выведение антигенов). Однако антитела обладают большим набором неканонических функций, одной из которых является способность выступать в роли ферментов, то есть катализировать химические реакции [Ermakov E. A., et al., 2020]. Наличие таких антител в крови пациентов с СКВ показано уже достаточно давно [Shuster A. M., et al., 1992], однако данных об их роли в патогенезе заболевания немного. В

настоящее время нет однозначного ответа на вопрос о том, какую роль играют эти антитела. Немногие существующие исследования, в которых предпринимались попытки изучить связь каталитических антител с патогенезом СКВ, сконцентрированы вокруг их ДНК-гидролизующей активности [Suchkov S. V., et al., 2001]. Однако, существует большое количество потенциально значимых для патогенеза СКВ аларминов, на которые также вырабатываются аутоантитела (например, гистоны, HMGB1 и др.), но способность гидролизовать такие алармины не изучена. Поэтому исследование связи каталитической активности антител при СКВ с патогенезом заболевания остаётся актуальной задачей.

Цель настоящей работы заключалась в изучении роли аларминов и аутоантител к ним в патогенезе системной красной волчанки. В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1. Определить и сравнить концентрации аларминов (общая, ядерная, митохондриальная внеклеточная ДНК и негистоновый белок HMGB1) и маркеров нетоза (цитруллинированный гистон H3, миелопероксидаза) в плазме пациентов с СКВ, здоровых доноров и пациентов с рядом других ревматических патологий, таких как ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит; а также оценить их связь с клиническими параметрами болезни.
2. Оценить концентрацию аутоантител к следующим аларминам: ДНК, гистоны и HMGB1 в плазме пациентов с системной красной волчанкой и здоровых доноров; оценить их взаимосвязь с клиническими признаками болезни.
3. Изучить уровень гидролиза антителами пациентов с СКВ и здоровых доноров следующих субстратов: ДНК, гистоны, белок HMGB1, TNF- α ; оценить связь каталитических активностей антител с клиническими характеристиками заболевания.
4. Исследовать концентрацию цитокинов у пациентов с СКВ и здоровых доноров. Оценить взаимосвязь концентрации цитокинов с концентрацией аутоантител и уровнем каталитических активностей.
5. На пристан-индуцированной мышинной модели СКВ изучить изменения концентрации внеклеточной ДНК и антител к двуцепочечной ДНК с развитием заболевания.

Научная новизна работы. Впервые проведён обширный анализ аларминов и аутоантител к ним у пациентов с СКВ и на пристан-индуцированной модели СКВ мышей. Одновременно исследованы алармины, маркёры нетоза, цитокины, аутоантитела к аларминам, в том числе антитела с каталитическими активностями. Использование пристан-индуцированной модели СКВ мышей позволило впервые обнаружить динамическую связь между концентрацией внеклеточной ДНК и антителами к двуцепочечной ДНК (дцДНК). Впервые показано, что у

пациентов с СКВ повышение концентрации аларминов намного сильнее ассоциировано с процессом нетоза, по сравнению с другими ревматическими заболеваниями. Впервые показано, что пациенты с СКВ разделяются на две группы с низким и высоким уровнем ДНК-гидролизующей активности IgG. Продemonстрировано, что эти группы пациентов достаточно сильно отличаются между собой по ряду клинических параметров. Впервые показано, что ДНК-гидролизующая активность IgG у пациентов с СКВ может выполнять положительную роль, так как обнаружена обратная зависимость между уровнем этой активности и тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI. Показано, что IgG пациентов с СКВ обладают протеолитической активностью в отношении гистонов (H1, H2A, H2B и H4), а также впервые в отношении HMGB1. Кроме того, дополнительно показано, что IgG гидролизуют HMGB1 в сайте, расположенном в В-боксе-доме белка, проявляющем провоспалительные свойства. Впервые продемонстрирована обратная динамика между концентрацией антител к дцДНК и внеклеточной ДНК на пристани-индуцированной мышинной модели СКВ. При исследовании взаимосвязи между антителами к ДНК и вкДНК важно учитывать временной фактор. Это может объяснять неоднородность результатов поперечных исследований корреляции между этими маркерами у пациентов с СКВ.

Практическая значимость работы. Показано, что повышенная ДНК-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ ассоциирована со снижением индекса SELENA-SLEDAI, отражающей тяжесть заболевания. Таким образом, ДНК-гидролизующая активность антител является потенциально эффективным диагностическим маркером при СКВ.

Установлено, что IgG гидролизуют HMGB1 в его специфической области, В-боксе, ответственном за провоспалительные свойства этого белка, что снижает его аларминные свойства. На базе этих данных могут быть созданы терапевтические моноклональные антитела со схожей активностью.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изучаемые алармины (общая, ядерная, митохондриальная внеклеточная ДНК и негистоновый белок HMGB1) и маркеры нетоза (цитруллинированный гистон H3, миелопероксидаза) в плазме пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) статистически достоверно повышены по сравнению со здоровыми донорами.

2. Комбинированный профиль аларминов и маркеров нетоза пациентов с СКВ, в отличие от пациентов с ревматическими заболеваниями (ревматоидным артритом, анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом), статистически значимо отличается от профиля здоровых доноров.

3. Увеличение концентрации специфических маркёров нетоза (миелопероксидаза, цитруллинированный гистон H3) связано с поражением почек и заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

4. Уровень аутоантител ко всем исследуемым аларминам статистически достоверно повышен в плазме пациентов с СКВ, однако их прямую корреляцию с тяжестью заболевания демонстрировали только высокоспецифичные анти-ДНК антитела.

5. IgG пациентов с СКВ гидролизovali такие алармины, как ДНК, гистоны и HMGB1. Выявлена статистически достоверная обратная зависимость уровня ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ с тяжестью заболевания, выраженного в баллах по SELENA-SLEDAI, что может указывать на положительную роль каталитических антител в патогенезе СКВ.

6. Концентрация канонических высокоспецифичных анти-ДНК антител коррелировала с такими важными провоспалительными цитокинами, как TNF α и IFN α 2, при этом ДНК-гидролизующая активность IgG не коррелировала с цитокинами у пациентов с СКВ, что может свидетельствовать об их неучастии в провоспалительных процессах.

7. Увеличение уровня антител к ДНК вызывало снижение концентрации внеклеточной ДНК в плазме мышей с СКВ-подобным состоянием. Таким образом, эти показатели изменяются динамически в процессе развития заболевания, что необходимо учитывать при анализе связи этих показателей.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 5 публикаций, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Основные результаты работы представлены на 6 российских и международных конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (Саранск, 2021); научная конференция «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины» (Новосибирск, 2021); Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology (Новосибирск, 2022); Международная научно-практическая конференция «OPENBIO» (Кольцово, 2021, 2022, 2025).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, списка литературы. Работа изложена на 137 страницах, включает 32 рисунка, 15 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 333 источника.

Вклад автора. Основная часть результатов, представленных в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Планирование экспериментов и обсуждение результатов проведено под руководством д.б.н. Буневой В. Н. и к.б.н. Ермаковым Е. А.

Работа по сбору биологического материала и анамнеза пациентов с СКВ и другими ревматическими заболеваниями организована к.м.н. Сизиковым А. Э. в отделении ревматологии клиники иммунопатологии НИИФКИ. Работы по определению концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа выполнены совместно с НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Работы по определению концентрации ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК методом цифровой ПЦР выполнены совместно с к.х.н. Степановым Г. А. и Журавлевым Е. С. в лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Клинико-анамнестические данные пациентов и здоровых доноров

Работа выполнена с использованием двух отдельных выборок пациентов с СКВ и здоровых доноров. Использование двух групп связано с тем, что для выделения антител требуется большое количество плазмы крови. Кроме того, из-за большого количества анализируемых аларминов методом ИФА и ПЦР трудно спрогнозировать необходимый объём плазмы для этих исследований с учётом возможных повторов. Первую выборку, которая состояла из 24 пациентов с СКВ и 73 здоровых доноров, использовали для исследования концентраций аларминов и их возможной связи с клиническими признаками заболевания. В данной выборке в качестве групп сравнения отобраны не только здоровые доноры, но и пациенты с ревматоидным артритом (РА) (n=60), анкилозирующим спондилитом/болезнью Бехтерева (АС) (n=60) и псориатическим артритом (ПсА) (n=30). Вторая выборка состояла из 56 пациентов с СКВ и 35 здоровых доноров. Данную выборку использовали для выделения антител из плазмы крови и анализа их каталитической активности.

2. Алармины и маркёры нетоза

Считается, что вкДНК играет важную роль в патогенезе СКВ. Несмотря на то, что изучению концентрации общей вкДНК при СКВ посвящено достаточное количество исследований, отдельным типам вкДНК, таким как ядерная (я-вкДНК) и митохондриальная (мт-вкДНК), внимания уделяется намного меньше. Помимо вкДНК интерес представляют так же белки, образующие с ней комплексы, и обладающие провоспалительными свойствами, такие как, например, белок группы высокой подвижности В1 (HMGВ1) или гистоны. Несмотря на то, что алармины могут выделяться в кровотоки при множестве различных процессов, отдельный интерес представляет нетоз, который является специфичной для нейтрофилов активностью. В ходе нетоза образуется большое количество внеклеточных ловушек, которые представляют собой нити ДНК, в данном случае уже внеклеточной, декорированные различными белками. В настоящее время нетозу уделяется большое внимание при исследовании патогенеза СКВ.

Поэтому в данной работе исследовали наиболее высокоспецифичные маркёры нетоза: цитруллинированный гистон НЗ (цит-НЗ) и миелопероксидаза (МПО), результат представлен на Рисунке 1.

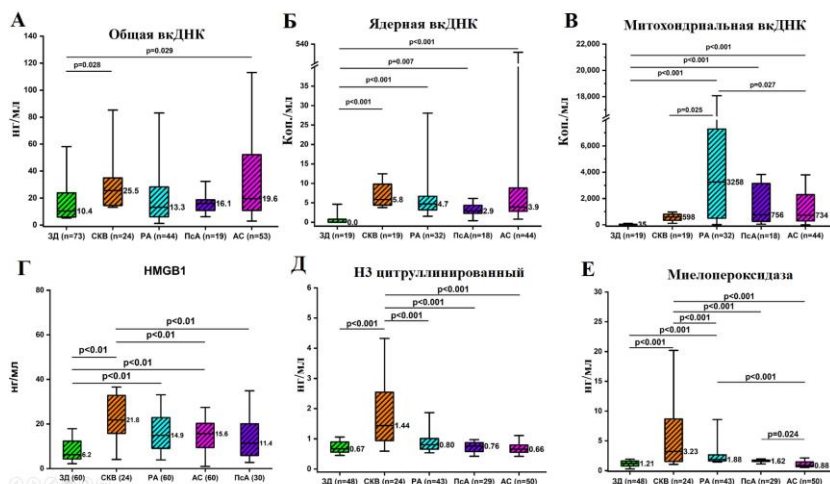


Рис. 1. Концентрация общей внеклеточной ДНК (общая вкДНК) (А), ядерной вкДНК (Б), митохондриальной вкДНК (В), белка группы высокой подвижности В1 (HMGB1) (Г), цитруллинированного гистона НЗ (Д) и миелопероксидазы (Е) у здоровых доноров (ЗД) и пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориатическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха.

Несмотря на то, что все перечисленные выше маркёры, общая, я- и мт-вкДНК, HMGB1, цит-НЗ и МПО по отдельности исследовались ранее у пациентов с СКВ, настоящая работа является первой, где это было проведено в рамках одной группы пациентов. Установлено, что у пациентов с СКВ повышается концентрация всех изучаемых маркёров, кроме мт-вкДНК, по сравнению со здоровыми донорами. Также показано, что у пациентов с СКВ высокоспецифичные маркёры нетоза, цит-НЗ и МПО, вдобавок повышаются по сравнению с другими ревматологическими заболеваниями: РА, АС, ПсА. Таким образом была ещё раз продемонстрирована «нуклеоцентричность» СКВ. Кроме того, настолько выраженное увеличение концентрации высокоспецифичных маркёров нетоза, даже по сравнению с другими ревматическими заболеваниями, может указывать на явную вовлечённость этого процесса в патогенез СКВ.

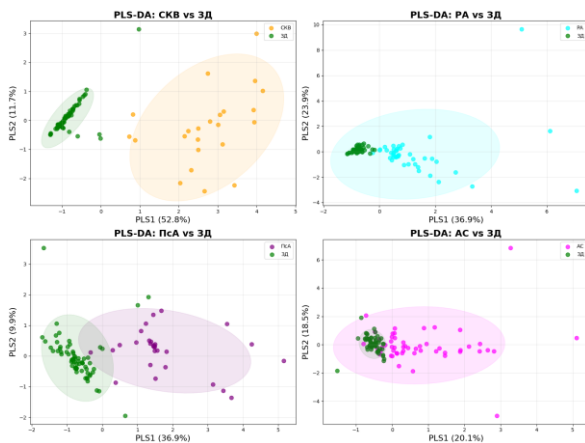


Рис. 2. График частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов (PLS-DA), отражающий комбинированные профили биомаркеров, ассоциированных с нетозом. Представлено попарное сравнение профилей для всех анализируемых групп. Каждая точка соответствует отдельному участнику исследования. На рисунках показаны эллипсы 95% доверительного интервала. Отсутствие перекрытия эллипсов указывает на хорошее разделение между образцами. И напротив, перекрывающиеся эллипсы свидетельствуют о сходстве между группами по уровням маркеров нетоза.

Хотя алармины и маркёры, ассоциируемые с нетозом, возрастали и при других патологиях, дискриминативный анализ методом наименьших квадратов (PLS-DA) примененный для представления комбинированных профилей общей, я- и мт- вкДНК, HMGB1 и цитруллинированного гистона H3 позволил продемонстрировать их согласованный рост по сравнению со здоровыми донорами только при СКВ, результаты представлены на Рисунке 2. В литературе не удалось найти работ с использованием подобного подхода, поэтому данная работа позволила наглядно продемонстрировать наиболее яркие изменения маркеров нетоза при СКВ в отличие от других ревматических заболеваний. С другой стороны, повышение уровня маркеров нетоза может быть связано не с усилением нетотической активности при СКВ, а с ухудшением клиренса нетотического материала.

Общая, я- и мт- вкДНК, а также HMGB1 не показали ассоциаций с клиническими проявлениями заболевания, чего нельзя сказать про МПО и цит-НЗ. Установлено, что существует статистически значимая обратная корреляция между концентрацией МПО и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ). Результаты представлены на Рисунке 3. Почки являются одним из самых главных целевых органов при СКВ.

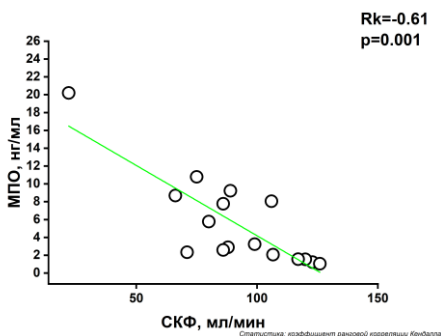


Рис. 3. График корреляции между концентрацией миелопероксидазы (МПО) и скоростью клубочковой фильтрации (СКФ) у пациентов с СКВ. Кругами обозначены отдельные пациенты. Rk – коэффициент корреляции Кендалла.

связан с осложнениями сердечно-сосудистой системы при СКВ.

Таким образом было показано, что нетоз является важным модулятором осложнений при СКВ. Кроме того, отдельно показано, что у пациентов с СКВ с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) концентрация цит-НЗ ($p=0.02$) и МПО ($p=0.0008$) статистически значимо выше, чем у пациентов с СКВ без ССЗ. Это может указывать на то, что нетоз

3. Антитела к аларминам

Далее проводили исследование концентрации антител к аларминам у пациентов с СКВ и здоровых доноров. Показано, что у пациентов с СКВ статистически значимо повышаются концентрации антител к дцДНК, гистонам и НМGB1 ($p<0.0001$ для всех случаев), результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Концентрация антител (АТ) к двуцепочечной (дц) ДНК, гистонам и белку группы высокой подвижности В1 (НМGB1) у пациентов с СКВ и здоровых доноров.				
Маркёр	Единица измерения	СКВ (медиана)	ЗД (медиана)	P-value
АТ к дцДНК		N=29	N=26	
	МЕ/мл	21.4	0.4	<0.0001
АТ к гистонам		N=31	N=28	
	ОЕ	0.095	0.065	<0.0001
АТ к НМGB1		N=26	N=37	
	Нг/мл	1121	457	<0.0001

Повышение антител к дцДНК является закономерным и полностью согласуется с литературными данными. Повышение концентрации антител к гистонам также согласуется с литературными данными, однако эти антитела представляют интерес только в контексте лекарственной волчанки. Антитела же к НМGB1 при СКВ изучаются достаточно редко, а результаты являются противоречивыми. Однако повышение этих антител, зафиксированное в настоящей работе, согласуется с некоторыми исследованиями. Повышение антител к классическим ядерным аларминам может указывать на то, что эти алармины, скорее всего, находятся во

внеклеточном пространстве в виде комплексов, что повышает их иммуногенность. Установлено, что концентрация антител к гистонам и HMGB1 никак не связана с клиническими признаками заболевания, что согласуется с литературными данными. Однако показано, что антитела к дцДНК имеют статистически значимую прямую корреляцию с активностью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI (коэффициент корреляции Кендалла = 0.24, $p=0.037$). Так как антитела к дцДНК являются высокоспецифичным признаком СКВ, данный результат не является удивительным и полностью согласуется с литературными данными, однако он будет крайне важен при последующем обсуждении антител с ДНК-гидролизующей активностью.

4. ДНК-гидролизующая активность IgG

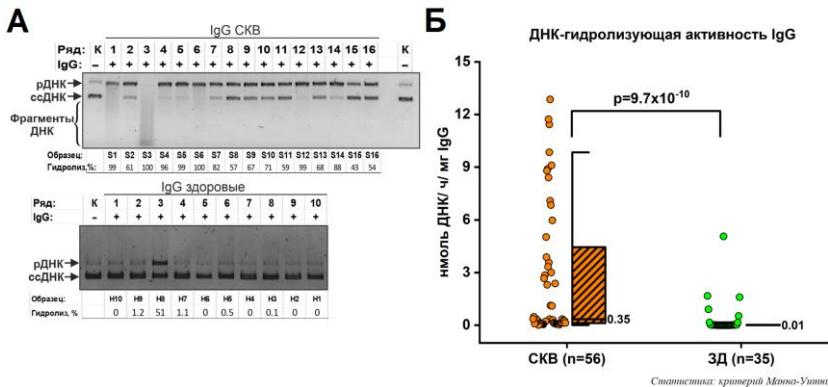


Рис. 4. А – анализ продуктов гидролиза ДНК плазмиды pBluescript в течение 1 ч антителами IgG пациентов с СКВ (верхняя панель) и здоровых дноров (нижняя панель) в 1% агарозном геле. Гидролиз плазмидной ДНК (%) оценивался денситометрически по переходу из суперскрученной (сс) в релаксированную (р) форму и более короткие фрагменты. Полная конверсия ДНК из ссДНК в рДНК принята за 100%. К – контрольные реакции без IgG. Линии, отмеченные номерами, соответствуют реакциям с образцами IgG.

Б – уровень ДНК-гидролизующей активности IgG у пациентов с системной красной волчанкой и здоровых дноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня ДНК-гидролизующей активности IgG для соответствующих выборок. Точки на графике обозначают индивидуальные значения для отдельных препаратов.

IgG пациентов с СКВ обладали выраженной ДНК-гидролизующей активностью по сравнению с IgG здоровых дноров. Пример агарозного гель-электрофореза с продуктами реакции представлен на Рисунке 4А. Как видно на рисунке, у пациентов с СКВ (верхний форез) наблюдали более выраженные полосы релаксированной ДНК (рДНК), что указывает на разрушении суперскрученной ДНК (ссДНК) антителами. У здоровых же, за исключением одного днора, полосы рДНК примерно соответствовали контрольным дорожкам (К) (без воздействия IgG). Полученные результаты

о повышении ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами соответствовали литературным данным. Анализ уровня удельной ДНКазной активности в выделенных образцах (Рисунок 4Б) показал, что образцы IgG пациентов с СКВ обладают значительно более высокой активностью, чем образцы здоровых лиц ($p=9.7 \times 10^{-10}$). Полученный результат соответствует опубликованным ранее данным о повышении уровня ДНК-гидролизующей активности антител при СКВ по сравнению со здоровыми донорами.

Далее была предпринята попытка оценить связь между уровнем ДНК-гидролизующей активности IgG и клиническими признаками заболевания. Наиболее значимым является результат для активности заболевания, выраженного в индексе SELENA-SLEDAI. Методом линейной регрессии показано, что между этими двумя параметрами существует статистически значимая ($p=0.031$) обратная связь ($t=-2.232$), результат представлен на Таблице 2. Установлено, что увеличение уровня ДНК-гидролизующей активности на одну единицу измерения связано с уменьшением SELENA-SLEDAI на 20.6%. Что интересно, SELENA-SLEDAI имеет положительную связь с концентрацией анти-ДНК антител ($t=1.556$), однако статистической значимости эта связь не достигает ($p=0.128$). Это подчёркивает, что ДНК-гидролизующие IgG, по-видимому, участвуют в клиренсе иммуногенного материала, в частности вкДНК, что снижает активность заболевания.

Табл. 2. Предикторы SELENA-SLEDAI на основании анализа методом множественной регрессии.				
Переменная	β	Стандартная ошибка β	t-статистика	p-значение
ДНК-гидролизующая активность IgG	-0.1004	0.045	-2.232	0.031
Анти-дцДНК АТ	0.1803	0.116	1.556	0.128

Далее проведено исследование корреляционных взаимоотношений между уровнем ДНК-гидролизующей активности IgG и концентрацией цитокинов. Цитокины являются одними из основных медиаторов воспалительного процесса, и поиск таких корреляций может помочь с определением места ДНК-гидролизующих антител в патогенезе СКВ. Показано, что уровень ДНК-гидролизующей активности IgG не имеет корреляций ни прямых, ни обратных, ни с одним из цитокинов, которые можно назвать важными в патогенезе СКВ. При этом концентрация анти-дцДНК антител прямо коррелировала с такими наиважнейшими цитокинами для СКВ, как $TNF\alpha$ и $IFN\alpha 2$, который является частным представителем $IFN1$, ключевого цитокина в патогенезе СКВ. Результаты представлены на Таблице 3. Полученные результаты демонстрируют, что антитела, обладающие ДНК-гидролизующей активностью, по-видимому не участвуют в активных воспалительных патогенетических процессах при

СКВ, что также косвенно подтверждается данными из Таблицы 2, где продемонстрирована их обратная ассоциация с активностью заболевания.

Табл. 3. Корреляции между концентрацией антител к дцДНК, а так же уровнем ДНК-гидролизующей активности антител и цитокинами TNF α и IFN α 2. Rs – коэффициент корреляции Спирмена.		
	TNF α	IFN α 2
Анти-дцДНК ат	Rs=0.44; p=0.015	RS=0.45; p=0.03
ДНКазная акт.	Rs=-0.06; p=0.66	Rs=-0.1; p=0.57

Несмотря на то, что повышение уровня ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ было известно ранее, в настоящей работе впервые удалось показать, что пациенты разделяются на две группы по этому признаку. На Рисунке 4Б видно, что пациенты с СКВ разделяются на две группы: скопление точек в основании, являющееся группой пациентов с низким уровнем ДНК-гидролизующей активности (группа низкой активности – ГНА), и «вереница» точек, растянутая по вертикали, представляющая пациентов с высоким уровнем ДНК-гидролизующей активности (группа высокой активности – ГВА). Это разделение определяется не только визуально. С помощью алгоритма кластеризации на основе пространственной плотности наличия шума (DBSCAN) идентифицированы две отдельные группы пациентов, как показано на Рисунке 5.

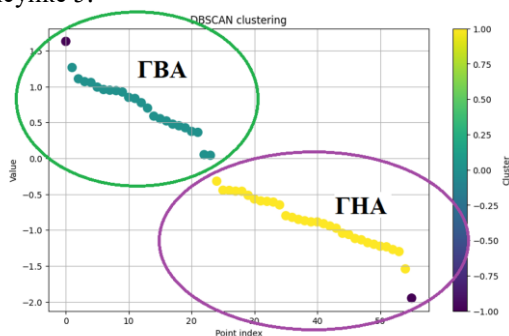
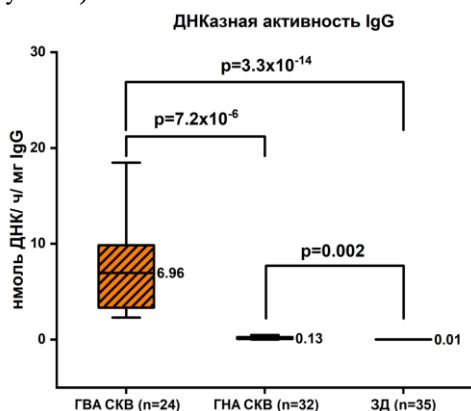


Рис. 5. Кластеризация пациентов с СКВ на основании уровня ДНК-гидролизующей активности IgG с использованием алгоритма DBSCAN. ГВА – группа высокой активности, обведён зелёным овалом; ГНА – группа низкой активности, обведён фиолетовым овалом.

С помощью алгоритма DBSCAN рассчитано пороговое значение ($\log_{10}(y) = 0.04$, следовательно, $y = 10^{0.04} = 1,1$ нМ ДНК/ч/мг IgG), на основе которого выборку разделили на две группы: ГВА и ГНА. Стоит отметить, что в литературе не удалось найти работ, в которых разделяли пациентов по уровню каталитической активности антител, хотя в работе Pradhan et al. наблюдается схожий разброс значений уровня ДНКазной активности антител (выделяются две группы), что подтверждает воспроизводимость феномена. В данной работе впервые проведено сравнение уровня каталитической активности IgG и клинических характеристик пациентов из этих двух подгрупп. Сравнение подгрупп ГВА и ГНА пациентов показало,

что у пациентов из подгруппы ГВА медианный уровень ДНК-гидролизующей активности IgG примерно в 53.5 раза выше, чем у пациентов из ГНА подгруппы, и в 696 раз выше, чем у здоровых доноров (Рисунок 6).



Статистика: критерий Краскела-Уоллиса + post-hoc тест Данна

Рис. 6. Уровень ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов из группы высокой активности системной красной волчанки (ГВА СКВ), группы низкой активности системной красной волчанки (ГНА СКВ) и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня ДНК-гидролизующей активности IgG для соответствующих выборок.

У пациентов из ГНА медианный уровень ДНК-гидролизующей активности IgG в 13 раз выше, чем у здоровых доноров. Большая разница в ДНК-гидролизующей активности антител между ГВА и ГНА может отражаться и на клинических проявлениях заболевания у этих пациентов, о чём будет сказано далее. Наличие такой активности у здоровых доноров, хоть и на небольшом уровне, потенциально указывает на то, что ДНК-гидролизующие антитела могут являться одним из базовых механизмов клиренса клеточного материала.

ГВА и ГНА различались так же по ряду клинических признаков, что представлено в Таблице 4. Установлено, что в ГВА концентрация анти-дцДНК выше, однако, при этом активность заболевания, хоть и статистически незначимо, но ниже. Кроме того, в ГВА реже встречается острое течение заболевания. Это ещё раз подтверждает, результаты, обозначенные в Таблице 2. Отрицательная связь между активностью заболевания и ДНКазной активностью антител более значима, чем положительная связь между активностью заболевания и конвенциональным высокоспецифичным маркёром СКВ, антителами к дцДНК. В совокупности все эти данные могут указывать на то, что ДНК-гидролизующие антитела могут играть положительную компенсаторную роль скорее всего за счёт клиренса иммуногенного материала.

Табл. 4. Сравнение клинико-anamnestических данных пациентов с СКВ из группы высокой (ГВА) и низкой (ГНА) ДНК-гидролизующей активности IgG. Результаты представлены в виде медиана (1-й квартиль, 3-й квартиль) или в виде процентов.			
Параметр	ГВА СКВ (n=24)	ГНА СКВ (n=32)	P-значение
Возраст (лет)	48 (41, 58)	53 (41, 61)	0.62
SELENA-SLEDAI	6 (4, 8)	8 (5, 10)	0.33
Анти-дцДНК ат, нг/мл	77 (38, 175)	29 (14, 136)	0.04
Течение (острое/подострое, %)	17%/83%	42%/58%	0.048

5. HMGB1-гидролизующая активность IgG

Далее изучена способность IgG пациентов с СКВ гидролизовать такой важный алармин, как HMGB1. В отличие от гидролиза ДНК, эта активность показана впервые. На Рисунке 7А видно, что гидролиз белка антителами пациентов с СКВ происходит визуально активнее, чем у здоровых доноров. Разница между уровнями активности у пациентов и здоровых доноров оказалась статистически значимой, что показано на Рисунке 7Б. На Рисунке 7А можно наблюдать, что основной продукт гидролиза находится на отметке примерно 17.9 кДа. Использование поликлональных антител к HMGB1 подтвердило, что этот фрагмент является HMGB1, а с помощью анти-His-Tag антител показано, что этот фрагмент начинается с N-конца, что показано на Рисунке 7В.

Локализация области гидролиза крайне важна, так как HMGB1 обладает несколькими доменами с различными свойствами, схема строения HMGB1 представлена на Рисунке 7Г. На рисунке видно, что белок обладает двумя важными участками связи с рецептором TLR4 и RAGE, которые и обуславливают его провоспалительные свойства. С учётом массы самого выраженного продукта гидролиза можно предположить, что основной сайт находится в месте связывания HMGB1 с RAGE. Именно этот рецептор ассоциируется с более ярким, чем для TLR4 воспалением, а также с развитием аутоиммунных процессов. Гидролиз этого участка в HMGB1 подтверждает противовоспалительную активность HMGB1-гидролизующих антител, что согласуется с результатами, полученными ранее для ДНК-гидролизующей активности.

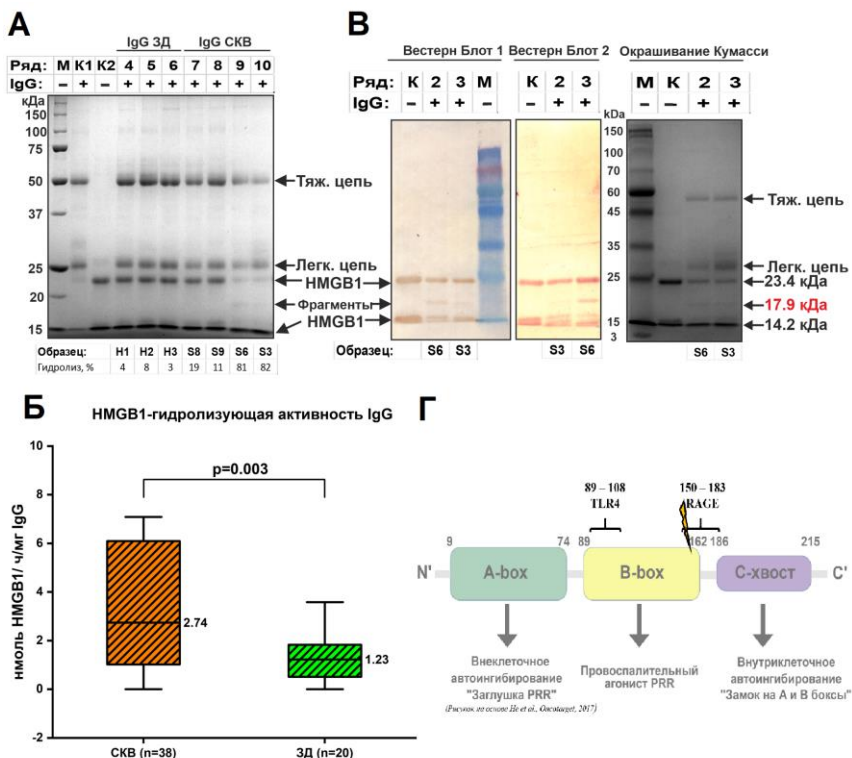


Рис. 7. Анализ гидролиза HMGB1 антителами пациентов с СКВ и здоровых доноров (ЗД). А – примеры результатов анализа гидролиза HMGB1 после 17-ч инкубации с образцами IgG пациентов с СКВ (IgG СКВ) и здоровых доноров (IgG ЗД) методом 15% SDS-PAGE с окрашиванием Кумасси. Дорожка K1 – IgG без HMGB1. Дорожка K2 – контрольные реакции без IgG. Дорожки, отмеченные номерами – реакции с образцами IgG. Дорожки М – маркеры молекулярной массы. Видны тяжелая (тяж.) и легкая (легк.) цепи IgG, а также HMGB1 с продуктами гидролиза. Уровень гидролиза (%) рассчитывали денситометрически; Б – сравнение уровня HMGB1-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ и ЗД; В – Анализ продуктов гидролиза HMGB1 с помощью вестерн-блоттинга с поликлональными антителами к HMGB1 (левая панель) и окрашивания Кумасси (правая панель). Молекулярные массы фрагментов определяли с использованием Image Lab 6.0. Масса продукта гидролиза HMGB1 показана красным. Дорожки К – контрольные реакции без IgG. Дорожки М – маркеры молекулярной массы; Г – Схематичное представление субъединиц HMGB1. TLR4 – толл-подобный рецептор 4; RAGE – рецептор конечных продуктов гликирования; знак оранжевой молнии – примерное основное место гидролиза белка антителами.

6. Гистон-гидролизующая активность IgG

Далее проведено исследование каталитической активности IgG пациентов с СКВ в отношении гистонов. Количественный анализ удельной активности показал, что уровень гидролиза всех четырёх исследуемых гистонов антителами пациентов с СКВ оказался выше, чем у ЗД, результаты представлены на Рисунке 8. При этом не было обнаружено связей между уровнем активности и клиническими признаками заболевания. Это согласуется с ранее полученным результатом, что антитела к гистонам не считаются достаточно значимыми в патогенезе СКВ.

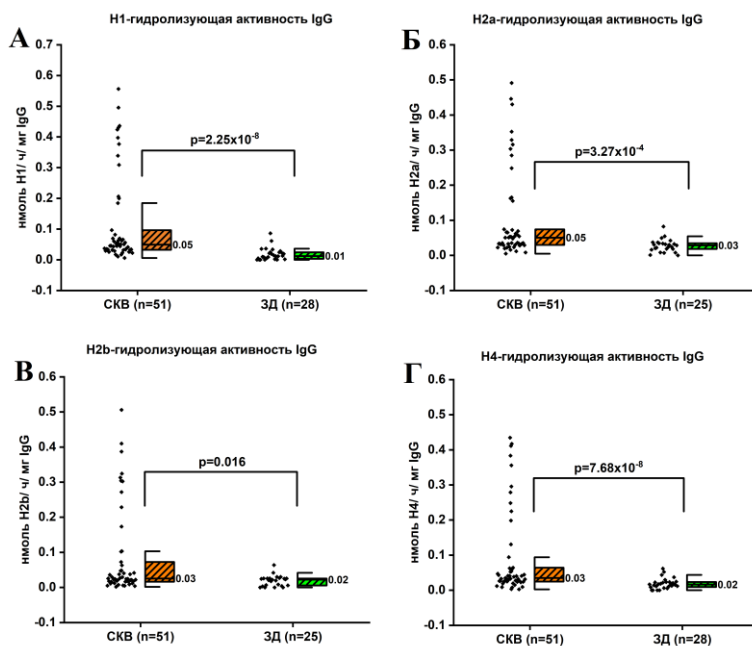


Рис. 8. Сравнение удельной протеолитической активности при гидролизе различных гистонов образцами IgG пациентов с СКВ и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня протеолитической активности IgG для соответствующих выборок. Нижняя граница ящика на графике обозначает первый квартиль выборки, горизонтальная полоса внутри графика – медиана выборки, верхняя граница ящика – третий квартиль выборки, усы ящика – полтора интерквартильных размаха.

7. Гидролиз TNF- α антителами IgG пациентов с СКВ

В качестве контрольного белка при исследовании протеолитических свойств IgG пациентов с СКВ использован TNF α . Данный цитокин не

обладает аларминными свойствами, однако активно участвует в воспалительных процессах. Установлено, что IgG

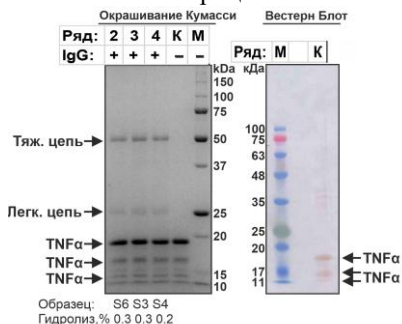


Рис. 9. SDS-ПААГ (левая панель) и вестерн-блот (правая панель) анализа гидролиза TNF-α после 17 ч инкубации с IgG пациентов с СКВ. Денситометрический анализ показал практически полное отсутствие гидролиза. К – контроль без IgG; М – молекулярные маркеры.

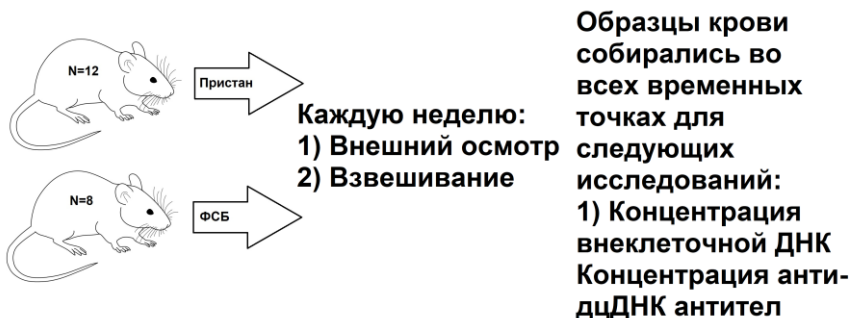
пациентов с СКВ не гидролизуют TNF-α. Результаты представлены на Рисунке 9. Одной из причин отсутствия активности антител в отношении TNF-α может заключаться в строении цитокина. TNF-α представляет собой компактную структуру из трёх мономеров, соединённых ковалентными связями, что делает доступ антител к потенциально уязвимым для гидролиза местам белка труднодоступным. Другой причиной может являться то, что, как было указано ранее, основной функцией каталитических антител, по-видимому, является устранение клеточного мусора и других

иммуногенных молекул и комплексов. Несмотря на то, что TNF-α является одним из важнейших участников воспалительного ответа при СКВ, сама по себе эта молекула не является целевой для аутоиммунных процессов.

8. Мышиная модель СКВ

При исследовании аутоиммунных процессов важно понимание их динамики. Однако, динамическое исследование аларминов и антител к ним у людей, обладающих индивидуальным иммунным опытом, в нескольких точках крайне затруднительно. В связи с этим для исследования динамики изменения вкДНК и антител к ней использована пристан-индуцированная модель СКВ. Эта модель зарекомендовала себя в многочисленных исследованиях и является довольно лёгкой в постановке и поддержании, а также имеет предсказуемые результаты. Дизайн эксперимента представлен на Рисунке 10.

Пристан-индуцированная модель СКВ характеризуется рядом клинических признаков, указывающих на то, что модель сработала. К таким признакам относится увеличение концентрации антител к дцДНК, о чём будет сказано ниже, а также, например, алоpecia и поредение шерстяного покрова, что продемонстрировано на Рисунке 11. Так же показано, что у мышей из экспериментальной группы, происходит аккумуляция жировой ткани в абдоминальной области, о чём ранее не сообщалось.



-2 недели	0 неделя	8 неделя	14 неделя	22 недели	28 неделя	36 неделя
Сбор образцов крови	Иммунизация	Сбор образцов крови	Сбор образцов крови	Сбор образцов крови	Сбор образцов крови	Сбор образцов крови

Рис. 10. Дизайн эксперимента по изучению ассоциаций между концентрациями внеклеточной ДНК, антител к ДНК и клиническими признаками заболевания, выполненного на пристан-индуцированной модели СКВ мышей.

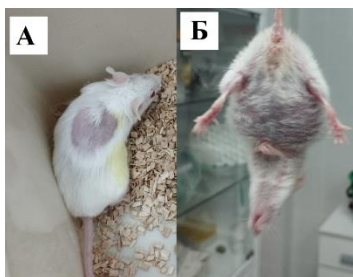


Рис. 11. Изменения во внешности мышей, ассоциированные с развитием СКВ-подобного состояния. Очаговая алопеция (А), потеря шерстяного покрова и аккумуляция жировой ткани в абдоминальной области (Б).

В течение первых 8 недель после иммунизации различий в концентрации вкДНК в плазме между экспериментальной и контрольной группами не наблюдали (Рисунок 12А). У мышей, иммунизированных пристаном, уровень вкДНК в плазме резко и достоверно повысился в период с 8 по 14 недели после иммунизации. Затем последовало столь же резкое снижение до исходных значений. Неожиданно, концентрация вкДНК в плазме также повысилась в контрольной группе в период с 8 по 22 недели после иммунизации. После этого также произошло статистически значимое снижение до исходных значений. Разница в общей концентрации вкДНК в плазме между группами не была статистически значимой ни в одной временной точке.

У мышей, иммунизированных пристаном, концентрация антител к дцДНК начала повышаться практически сразу, и к 8-й неделе она оказалась статистически значимо выше, чем у здорового контроля ($p = 0.00025$) (Рисунок 12Б). После этого, в период с 8-й по 22-ю неделю после иммунизации, концентрация аутоантител к дцДНК в плазме мышей, иммунизированных пристаном, незначительно снизилась и вышла на плато.

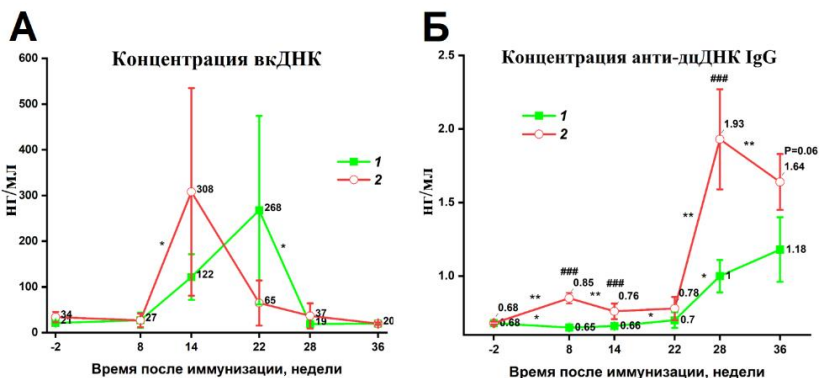


Рис. 12. А – Концентрация общей вкДНК в плазме в шести временных точках после иммунизации. Результаты представлены в виде медианных значений. «Усы» на графике обозначают абсолютное медианное отклонение. 1 – контрольная, 2 – экспериментальная группа мышей. Символ * обозначает статистически значимую разницу между соседними временными точками. Статистическая значимость между соседними временными точками внутри одной группы определялась с помощью критерия Уилкоксона. Статистическая значимость между двумя группами в одной временной точке определялась с помощью U-критерия Манна-Уитни. Б – Концентрация общей вкДНК в плазме в шести временных точках после иммунизации. Результаты представлены в виде медианных значений. «Усы» на графике обозначают абсолютное медианное отклонение. 1 – контрольная, 2 – экспериментальная группа мышей. Символ * обозначает статистически значимую разницу между соседними временными точками. Символ # обозначает статистически значимую разницу между разными группами в одной временной точке.

К 22-й неделе после иммунизации статистическая значимость различий между группами исчезла ($p = 0.07$). Начиная с 22-й недели после иммунизации, начался резкий рост концентрации антител к дцДНК в плазме крови мышей как экспериментальной, так и контрольной групп. Уровень антител к дцДНК в экспериментальной группе достиг своего пика на 28-й. В этот момент он снова стал статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0.001$). Затем концентрация антител к дцДНК в плазме мышей экспериментальной группы начала снижаться. У контрольных мышей концентрация антител к дцДНК была наибольшей через 36 недель после иммунизации. На этом этапе статистически значимое различие между группами снова исчезло ($p = 0.06$).

Ни на одной из временных точек не обнаружено статистически значимых корреляций между концентрацией вкДНК и уровнем антител к дцДНК. Однако, как показано на Рисунках 12 А и Б, пик образования антител к дцДНК смещался на 14 недель после пика концентрации вкДНК. Это наблюдалось как в экспериментальной группе (недели 28 и 14), так и в контрольной группе (недели 36 и 22). Статистически значимая обратная

корреляция обнаружена между абсолютным изменением (дельта) уровней антител к дцДНК в плазме и концентрациями вкДНК у мышей, иммунизированных пристаном, в период с 14 по 28 недели (Рисунок 13).

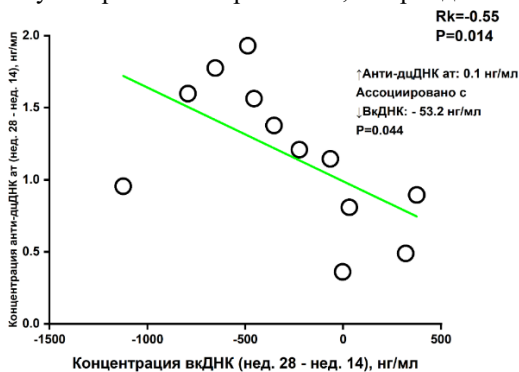


Рис 13. Корреляция между абсолютным изменением (дельта) концентрации антител к двуцепочечной ДНК и внеклеточной ДНК с 14 по 28 неделю эксперимента. R_k – коэффициент корреляции Кендалла. Текст под результатами корреляционного анализа является результатом регрессионного анализа, в котором изменение концентрации вкДНК выступала в качестве целевой переменной, а антитела к дцДНК – предиктора.

Для контрольной группы такой корреляции не обнаружено, но, как отмечено выше, также наблюдался сдвиг пиков концентрации вкДНК и аутоантител к дцДНК на 14 недель. Таким образом, уровни вкДНК и аутоантител к дцДНК не коррелировали в отдельные временные точки, но изменения уровней этих показателей коррелировали обратно пропорционально. Кроме того, проведено исследование связи между изменением концентрации вкДНК и антител к дцДНК с 14 по 28 неделю в экспериментальной группе методом линейной регрессии. Модель оказалась статистически значимой ($p=0.044$). Таким образом удалось продемонстрировать, что вкДНК и антитела к дцДНК связаны друг с другом, что повышает потенциальную роль внеклеточной ДНК в патогенетическом процессе на модели СКВ.

ВЫВОДЫ

1. При системной красной волчанке выявлено достоверное повышение НМGB1 в 2.5 раза, цитруллинированного гистона H3 в 2 раза и миелопероксидазы в 2.7 раз по сравнению со здоровыми донорами, а также в сравнении с пациентами с другими ревматологическими заболеваниями. Общая и ядерная внеклеточная ДНК многократно повышаются только по сравнению со здоровыми донорами. Связь нетоза с патологическим процессом подтверждается обратной корреляцией между концентрацией миелопероксидазы и скоростью клубочковой фильтрации, а также

повышением концентрации этого маркера и цитруллинированного гистона H3 у пациентов с СКВ, с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями.

2. У пациентов с СКВ отмечается повышение по сравнению со здоровыми донорами концентрации антител ко всем исследованным аларминам: оцДНК (в 13 раз) и дцДНК (в 5 раз), гистоны (в 1.5 раза), HMGB1 (в 2.5 раза). Связь с тяжестью заболевания, выраженная в баллах по индексу SELENA-SLEDAI, обнаружена только для антител к ДНК, что демонстрирует их высокую специфичность при этом заболевании.

3. Показано, что IgG пациентов с СКВ гидролизуют ряд субстратов, способных проявлять свойства аларминов: ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H4), HMGB1. Уровень гидролитической активности IgG пациентов с СКВ оказался достоверно выше, чем здоровых доноров. Установлено, что пациенты с СКВ по уровню ДНК-гидролизующей активности IgG делятся на две подгруппы, отличающиеся по клиническим признакам. Пациенты с высокой ДНКазной активностью IgG отличались тенденцией к снижению тяжести заболевания ($p = 0.08$), выраженного в баллах по SELENA-SLEDAI, а также статистически значимым повышением частоты хронического течения заболевания по сравнению с острым или подострым. Кроме того, ДНК-гидролизующая активность IgG оказалась обратно ассоциирована с тяжестью заболевания, выраженной в баллах по SELENA-SLEDAI. Повышение ДНКазной активности на 1 нмоль ДНК/ч/мг IgG связаны со снижением SELENA-SLEDAI на 20.6%. Эти результаты указывают на то, что антитела с каталитическими активностями могут играть положительную роль в патогенезе СКВ.

4. Анализ ассоциации концентрации цитокинов и аутоантител у пациентов с СКВ показал, что концентрация антител к дцДНК коррелирует с такими важными провоспалительными цитокинами, как TNF α ($p=0.015$) и IFN α 2 ($p=0.03$). При этом не выявлено прямых корреляций между этими или любыми другими провоспалительными цитокинами и уровнем каталитической активности IgG пациентов с СКВ, что может указывать на невовлеченность ДНК-гидролизующих антител в провоспалительные процессы при СКВ.

5. На пристан-индуцированной модели СКВ у мышей методами корреляционного анализа и линейной регрессии показана обратная ассоциация между изменениями концентраций внеклеточной ДНК и аутоантител к двуцепочечной ДНК в период между 14 и 28 неделями после иммунизации. Повышение концентрации анти-ДНК антител на 0.1 мг/мл связано со снижением концентрации внеклеточной ДНК на 53.2 нг/мл, демонстрируя динамический характер изменений этих показателей.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. **Melamud, M. M.**, Ermakov, E. A., Boiko, A. S., Kamaeva, D. A., Sizikov, A. E., Ivanova, S. A., Baulina, N. M., Favorova, O. O., Nevinsky, G. A., Buneva, V. N. Multiplex analysis of serum cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – № 22. – С. 13829.
2. **Melamud M. M.**, Tolmacheva A. S., Sizikov A. E., Klyaus N. A., Zhuravlev E. S., Stepanov G. A., Nevinsky, G. A., Buneva, V. N., Ermakov, E. A. NETosis-Related Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Ankylosing Spondylitis: A Comparative Study // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 24. – С. 12127.
3. **Меламуд, М. М.**, Ермаков, Е. А., Толмачева, А. С., Сизиков, А. Э., Кляус, Н. А., Невинский, Г. А., Буенва, В. Н. HMGB1 и анти-HMGB1 антитела при системной красной волчанке и других ревматических заболеваниях // Вестник РГМУ. 2025. №6. С. 170–177. DOI: 10.24075/vrgmu.2025.074
4. **Melamud M. M.**, Ermakov E. A., Tolmacheva A. S., Kostrikina I. A., Sizikov A. E., Nevinsky G. A., Buneva, V. N. Catalytic IgG Antibodies Hydrolyze DNA, Histones, and HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 19. – С. 9635.
5. **Melamud M. M.**, Ermakov E. A., Tolmacheva A. S., Nevinsky G. A., Buneva V. N. Dynamic Inverse Relationship Between Cell-Free DNA and Anti-dsDNA Antibodies in Experimental SLE Highlights the Potential for Targeted Immunomodulatory Therapy //Pathophysiology. – 2025. – Т. 32. – №. 3. – С. 48.