

УДК 616-097-071 : 57.08.3

Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А

И.И. Генералов, О.Л. Коротина, С.В. Жерулик, А.Г. Генералова, М.В. Волкова

Витебский государственный медицинский университет

Methods of determination and types of catalytic activity of polyclonal immunoglobulin A

I.I. Generalov, O.L. Korotina, S.V. Zherulik, A.G. Generalova, M.V. Volkova

Vitebsk State Medical University

Аннотация

Целью настоящей работы стала разработка методов определения оксидоредуктазной, протеолитической и нуклеазной абзимной активности IgA, выделенных из сывороток пациентов системной красной волчанкой (СКВ), ротовой жидкости здоровых лиц и пациентов с хроническим периодонтитом, и оценка параметров их каталитической активности.

Методы. Изучены различные методы выделения IgA из сыворотки и ротовой жидкости для дальнейшей оценки их абзимной активности. Наилучшие результаты получены с применением метода аффинной хроматографии на матрице, конъюгированной с антителами против тяжелой цепи IgA человека.

Предложены методы определения каталитической активности IgA. ДНКазную абзимную активность определяли разработанным собственным методом по риваноловому сгустку ДНК, протеолитическую эластазную, катепсиноподобную и амидазную определяли фотометрическим методом в реакциях с субстратами Glp-Pro-Val-p-нитроанилидом, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилидом, Gly-Phe-p-нитроанилидом, Z-Arg-Arg-p-нитроанилидом, бензоил-аргинин-p-нитроанилидом. Каталазную активность оценивали в реакции перекиси водорода с молибдатом аммония, пероксидазную – в реакции с тетраметилбензидином. Изучалась кинетика абзимных реакций и их зависимость от pH реакционной смеси.

Результаты. Показано, что для абзимных IgA с пероксидазной и эластазной активностью характерна гетерогенность по скорости каталитических реакций и по зависимости реакций от pH среды. Ряд образцов абзимных IgA имеет не менее 2-х оптимумов pH в слабощелочной и щелочной зонах.

Установлено также, что IgA, выделенные из ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом, обладают наиболее высокой эластазной, пероксидазной и ДНКазной активностью, которая достоверно ($p < 0,01-0,001$) пре-

Summary

The main goal of current work was to elaborate the methods of detection of oxidoreductase, proteolytic and nuclease IgA abzymes isolated from the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and oral fluids of healthy individuals and patients with chronic periodontitis with further assessment of catalytic parameters of abzyme IgAs.

Methods. Different methods of IgA purification from sera and oral fluids optimal for their next abzyme testing were studied. The best results were obtained with chromatography on immunoaffinity resin coupled with polyclonal goat antibodies against heavy chains of human IgA.

A group of methods was proposed to evaluate intrinsic catalytic activity of IgAs. DNase abzymes were tested by original rivanol-DNA clot test, proteolytic elastase, cathepsin-like and amidase activities were determined with substrates Glp-Pro-Val-p-nitroanilide, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide, Gly-Phe-p-nitroanilide, Z-Arg-Arg-p-nitroanilide, and benzoyl-arginine-p-nitroanilide by plate colorimetric assay. Catalase activity was studied using hydrogen peroxide reaction with ammonium molybdate; peroxidase was tested in reaction with tetramethylbenzidine. Optimal pH of abzyme reactions and their kinetics were studied.

It has been found that IgA abzymes with peroxidase and elastase activities demonstrate variable reaction rates and different pH optima. Some abzyme IgA samples showed at least 2 pH optima in moderately acidic and alkaline zones.

Results. It was demonstrated also that IgAs isolated from oral fluids of patients with chronic periodontitis display the evident elastase, peroxidase and DNase activities that is significantly ($p < 0,01-0,001$) higher than activity of oral IgA abzymes of healthy persons and serum abzymes of SLE patients. The abzyme IgA activity mimicking the action of cathepsins B and C was not registered.

вышает активность IgA ротовой жидкости здоровых лиц и IgA сывороток пациентов СКВ. Абзимной активности, характерной для катепсинов В или С, выявить не удалось.

Ключевые слова

Ферментативная активность, ротовая жидкость, слюна, IgA, абзим, пероксидаза, каталаза, эластаза, катепсин, ДНКаза

Актуальность работы

В настоящее время моноклональные и поликлональные антитела (АТ), проявляющие собственную каталитическую (или абзимную) активность, являются предметом углубленного изучения со стороны исследователей, работающих на стыке иммунологии, биохимии, генной инженерии, биотехнологии и медицины. Показано, что абзимы катализируют химические реакции по тем же принципам, что и истинные ферменты: стабилизация переходного состояния субстрата, сближение реагирующих группировок со сдвигом электронных плотностей химических связей, снижение энтропии реагентов, и т.д. [1]. Однако следует отметить, что основные закономерности абзимного катализа были установлены при использовании моноклональных абзимов. Механизмы же действия природных каталитических антител до сих пор исследованы недостаточно.

Среди поликлональных каталитических АТ наибольший интерес вызывают абзимы, обладающие оксидоредуктазным, нуклеазным и протеолитическим действием. Данные виды абзимов активно изучаются многими группами исследователей [2, 3]. Удалось установить, что поликлональные АТ разного происхождения проявляют выраженную каталитическую гетерогенность. В частности, варибельность абзимного действия продемонстрирована в отношении гидролитических и окислительно-восстановительных реакций [2].

Из этих данных следует, что особенности каталитического действия поликлональных АТ и иммуноглобулинов (ИГ) зависят как от источника их получения, так и от субстрата катализируемой реакции. Абзимные АТ выделяют от пациентов с многообразной аутоиммунной и инфекционной патологией, находящихся на разных стадиях развития заболеваний и с различной степенью их активности [3]. В каждом отдельном случае такие АТ могут существенно различаться, что требует дополнительного изучения параметров данных каталитических реакций.

Key words

Enzymatic activity, oral fluid, saliva, IgA, abzyme, peroxidase, catalase, elastase, cathepsin, DNase

Кроме того, основные исследования абзимной активности обычно проводятся на антителах, относящихся к иммуноглобулинам класса G. Вероятнее всего, это определяется возможностью быстрого получения высокочистых препаратов IgG на недорогих аффинных матрицах (сорбенты с протеином А или G). Активность же иммуноглобулинов других классов изучена пока недостаточно. Это можно отнести и к поликлональному IgA, несмотря на то, что общее содержание IgA в организме превышает содержание IgG.

Предполагается, что ИГ класса А могут оказаться эффективными абзимными катализаторами. Уже получены первые экспериментальные доказательства данного положения. Кит Ю.Я. с соавт. выявили протеинкиназную активность секреторного IgA, выделенного из молока родильниц [4]. Оптимальные условия реакции не совпадали с описанными для известных протеинкиназ. Далее было выявлено, что небольшие субфракции поликлональных sIgA молока человека способны катализировать реакции гидролиза ДНК и РНК, гидролиз полисахаридов [5] и казеина [6]. В молоке здоровых рожениц были обнаружены sIgA не только с протеин- но и липид- [7] и полисахаридкиназными [8] активностями, фосфорилирующие минорные липиды и полисахариды. В целом грудное молоко и молозиво оказались уникальными источниками абзимов с различной ферментативной активностью

Тем не менее, пока существуют лишь единичные исследования, связанные с оценкой каталитической активности поликлональных IgA сывороток или других биологических жидкостей (слюна и др.) Одно из них посвящено абзимной активности IgA сывороток и слюны здоровых лиц [9]. По результатам работы авторы заключают о большем каталитическом потенциале IgA в сравнении с IgG. Далее этой же группой исследователей было выявлено, что АТ класса IgA в сыворотке и слюне селективно катализируют распад белка gp 120 ВИЧ со скоростью, достаточной для биологической защиты от вирусных частиц [10]. Существование каталитических АТ к

gp120 класса IgA у неинфицированных лиц подтверждает их роль в механизмах устойчивости к ВИЧ-инфекции.

В предварительных исследованиях нами было обнаружено, что фракция иммуноглобулинов А, выделенная из ротовой жидкости (РЖ) пациентов хроническим периодонтитом (ХП) и здоровых лиц проявляет каталитическую активность в отношении различных субстратов. Выявлена оксидоредуктазная (пероксидазная), протеолитическая (эластазная, катепсиноподобная) и нуклеазная (ДНКазная) активность IgA [11].

В настоящей работе мы провели адаптацию методов определения абзимной активности применительно к иммуноглобулинам класса А, а также изучили ряд особенностей IgA-зависимых каталитических реакций.

Таким образом, целью данного исследования явилась разработка методов определения оксидоредуктазной, протеолитической и нуклеазной активности IgA и определение параметров их каталитической активности.

Методы исследований

В работе были использованы ДНК тимуса теленка, тетраметилбензидин (ТМБ), субстраты для определения протеолитической активности бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА), Glp-Pro-Val-р-нитроанилид, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-р-нитроанилид, Gly-Phe-р-нитроанилид, Z-Arg-Arg-р-нитроанилид; агароза, конъюгированная с антителами против IgA человека (α -цепь), сефароза, конъюгированная с лектином жакалинном, агароза для электрофореза, реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ), флюорохром этидия бромид (все – производства Sigma, США). При постановке иммунологических методов применяли антисыворотки к сывороточным ИГ классов G, A, M производства РНИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи (РФ, Москва). Остальные реактивы – отечественного производства и перефасовки квалификации «хч» и «чда».

Материалом для исследования послужили сыворотки и выделенные из них иммуноглобулины класса А 14 пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), находившихся на стационарном лечении в УЗ «Витебская областная клиническая больница»; образцы ротовой жидкости и выделенные из них IgA 55 пациентов с хроническим маргинальным периодонтитом, находившихся на лечении в УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника», а также 31 проба ротовой жидкости и IgA от контрольной группы лиц без патологии периодонта.

Иммунодиффузию и электрофорез выделенных образцов IgA в ПАГ проводили как описано в [12] и [13].

Для определения абзимной активности нами была проведена адаптация способов оценки ферментативной ДНКазной, пероксидазной, каталазной и протеолитической активности для их определения в препаратах иммуноглобулинов класса А. При этом для оценки гидролиза белков под влиянием IgA в качестве субстратов использовали нитроанилиды различных аминокислот и пептидов, специфичных для соответствующего вида протеолитической активности (см. «Результаты исследований»).

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием набора пакетов прикладных статистических программ. Использовали методы описательной статистики. Характер распределения изучаемых величин оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Так как в большинстве случаев распределение признаков имело характер, отличный от нормального, при его описании использовали показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей. Соответственно, при сравнении двух выборок для обнаружения отличий применяли критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

1. Выбор метода для очистки поликлональных IgA из сыворотки и ротовой жидкости

Для оценки каталитической (абзимной) активности IgA требуется получить высокочистые препараты иммуноглобулинов (ИГ). Однако эффективная очистка АГ класса IgA по-прежнему остается достаточно сложной задачей.

Для получения IgA предлагается несколько основных методов. Один из них основан на многоступенчатой очистке препарата многократной ионообменной DEAE-хроматографией и гель-фильтрацией (сефадекс G200 или аналогичные матрицы). Данная методика весьма трудоемка и требует нескольких дней для выполнения [12]. Мы не использовали данный метод, так как по результатам предварительных экспериментов оказалось, что при попытке выделения IgA из слюны (ротовой жидкости) при помощи вышеизложенного способа образуются сильно разбавленные препараты иммуноглобулинов, не определяющиеся методом иммунодиффузии. Очевидно, что в первую очередь это связано с низкой концентрацией IgA в слюне (~100-

300 мкг/мл, [10]) в сравнении с сывороточной концентрацией IgA (2-4 мг/мл).

В основной работе мы сравнили две других методики очистки. Одна из них базируется на селективной адсорбции IgA на жакалин-сефарозе (лектин-аффинная очистка), другая – на применении иммуноаффинной матрицы – агарозы, конъюгированной с антителами против тяжелой цепи общих IgA человека.

Для получения сыворотки кровь без добавления антикоагулянта инкубировали в течение 2 часов при температуре 4°C до образования сгустка. Затем центрифугировали 10-15 мин в центрифужных пробирках в центрифуге с бакетным ротором (1500 об/мин). Аккуратно забирали чистую сыворотку.

Для дальнейшего выделения IgA из сыворотки проводили предварительное высаливание образцов 45% раствором сульфата аммония с диализом против 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,4 на 0,15М NaCl.

Предварительную очистку проб ротовой жидкости проводили следующим образом. До 8-10 мл ротовой жидкости центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 минут. Далее образцы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Полученные после этого препараты подвергали аффинной хроматографии на обеих матрицах, уравновешенных буферами для сорбции. Колонки отмывали до исчезновения белка в элюенте.

Элюцию IgA с сорбента с жакалином проводили раствором 0,8 М галактозы в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4. С матрицы, конъюгированной с антииммуноглобулином, элюцию проводили 0,1 М глицин-HCl буфером pH 2,6-2,8

с нейтрализацией проб 1М раствором Трис, pH 9.0 до pH 7.0-7.5.

Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяли (определение белка проводили микромодификацией метода Bradford). Пробы диализовали против изотонического раствора хлорида натрия. Конечную концентрацию белка оценивали спектрофотометрией при 280 нм (коэффициент экстинкции для IgA равен 1,32).

Проведенный дальнейший электрофоретический анализ образцов IgA подтвердил их гомогенность при использовании обоих методов аффинной очистки.

Контроль чистоты полученных ИГ проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ, Sigma) в системе буферов по Laemmli с использованием 10% или 12% разделяющего геля в присутствии додецилсульфата натрия. Гель окрашивали Кумасси R250. По результатам электрофореза различных образцов IgA ротовой жидкости обнаруживалась одна белковая полоса, мигрирующая в зоне гамма-глобулинов (см. рис. 1), что подтверждает их гомогенность.

Иммунохимическая чистота IgA была подтверждена методом иммунодиффузии по Оухтерлони.

Следует отметить, что с помощью лектин-аффинной хроматографии на жакалин-сефарозе были получены препараты с более низкой концентрацией IgA. Это представляется естественным, так как данный способ позволяет выделять только IgA подкласса 1, которые составляют лишь 40-70% от общего IgA в различных биологических жидкостях.

1 2 3 4 5 6



Рис. 1. Электрофорез абзимных препаратов IgA в ПАГ

Примечание: треки 1, 2, 3, 6 – препараты иммуноглобулинов А в разных концентрациях, выделенные из различных образцов ротовой жидкости; треки 4 и 5 – свободные контрольные треки без образца клинического материала

Таким образом, для выделения IgA оптимальной является хроматография на матрице, конъюгированной с антителами против общих IgA человека. При очистке образцов ротовой жидкости такой метод позволяет получить IgA в количествах, достаточных для анализа их абзимной активности. Сравнительно низкая концентрация балластных белков в ротовой жидкости делает возможным многократное использование данной матрицы. В свою очередь, при необходимости анализа абзимной активности подклассов IgA возможно применять лектин-аффинную хроматографию на жакалин-сефарозе.

2. Разработка методов определения ДНКазной, протеолитической и оксидоредуктазной активности IgA

В проведенных к настоящему времени исследованиях поликлональных абзимных IgA в основном изучалась их активность деполимеризующего действия – нуклеазная (ДНКазная) и протеолитическая. Во всех этих случаях применялся электрофоретический метод детекции продуктов распада биополимеров.

В частности, в работе Т.Г. Каньшковой с соавт. проводилось определение ДНКазной абзимной активности IgA и IgG, выделенных из молока [14]. Нуклеазная активность АТ здесь оценивалась в реакции гидролиза суперспирализованной формы плазмидной ДНК (в частности, плазмиды pBR322). По окончании реакции для определения олигомеров ДНК проводили электрофорез реакционной смеси с визуализацией продуктов реакции геля бромидом этидия.

Сходным образом, Одинцова Е.С. с соавт. [5] и Planque S. et al. [10] для определения протеолитической активности IgA использовали электрофорез продуктов распада субстратных белков в полиакриламидном геле (казеина и белка ВИЧ gp120, соответственно).

Однако такие способы сложно применять в клинических условиях для одновременной оценки ДНКазной либо протеолитической абзимной активности многих образцов иммуноглобулинов класса А. Для выполнения этих методик требуется специальное электрофоретическое и регистрирующее оборудование.

Нами проведена адаптация самостоятельно разработанного метода определения ДНКазной абзимной активности для оценки каталитического действия поликлональных IgA. Способ основан на образовании сгустка 2-этокси-6,9-диаминоакридина лактата (риванола) с ДНК

пропорционально деполимеризации последней под действием абзимных антител.

Исходно мы применили данный способ для оценки каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса G [15]. В настоящем исследовании произведена модификация данного метода для определения ДНКазной активности IgA с подбором концентраций реагентов и времени инкубации.

Итоговый вариант методики выполнялся следующим образом: к 0,2 мл раствора ДНК в концентрации 0,3 мг/мл добавляли 0,1 мл препарата IgA в концентрации 100 мкг/мл на 0,15М NaCl и 0,1 мл 0,02 М трис-НСl буфера рН 8.3, содержащем 0,01М MgCl₂. В смесь вносили азид Na до 0,1% конечной концентрации. Контролем служил 0,15 М раствор NaCl. Постановка реакции осуществлялась в центрифужных пробирках. После инкубации в течение 20 часов на поверхность проб наслаивали 20 мкл 0,75% раствора риванола, встряхивали до получения сгустка и оценивали реакцию.

Учет реакции проводили по разработанной балльной шкале. Отсутствие активности (0 Ед) – крупный, компактный сгусток «риванол-субстрат»; 1 Ед – слабая активность, рыхлый сгусток; 2 Ед – слабая активность, рыхлый сгусток, хлопья, нити; 3 Ед – средняя активность, хлопья, нити; 4 Ед – высокая активность, распад сгустка, хлопья, нити; 5 Ед – максимальная активность, полный распад субстрата с образованием гомогенной взвеси.

Результаты определения ДНКазной активности IgA ротовой жидкости ряда пациентов с хроническим периодонтитом, соответствующие различным значениям балльной шкалы, приведены на рис. 2.

Для сравнения эти же пробы после инкубации тестировались электрофорезом в агарозном геле (референс-метод) с окраской фрагментов ДНК этидия бромидом (рис. 3).

Анализ результатов двух методик позволяет заключить, что разработанная нами модификация определения ДНКазной абзимной активности IgA по методу риванолового сгустка достоверно отражает убыль субстрата в процессе реакции, и данный способ может быть использован для оценки абзимной активности IgA.

Оценку протеолитического действия IgA выполняли фотометрическим способом по гидролизу ряда синтетических субстратов-нитроанилидов, специфичных к различным видам протеолитической активности. Методы, основанные на определении продукта данной реакции

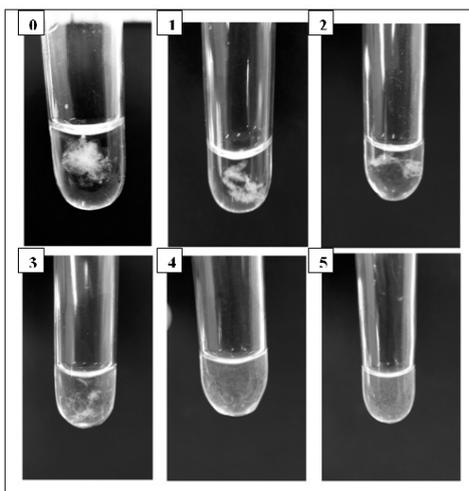


Рис. 2. Определение ДНКазной активности различных IgA-абзимов методом риванолового сгустка.

Примечание. Активность проб увеличивается от 0 Ед (отсутствие) до 5 Ед (максимальная активность).

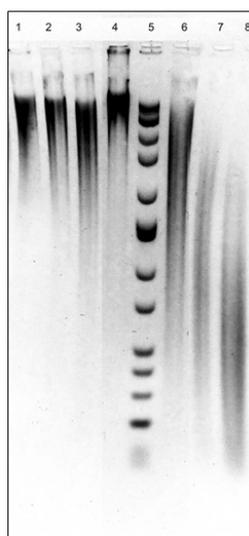


Рис. 3. Агарозный электрофорез продуктов абзимного гидролиза ДНК

Примечание. Треки 1-3 – пробы IgA с активностью 1-3 Ед по методу риванолового сгустка; трек 4 – контроль ДНК без абзимов (0 баллов); трек 5 – Sigma-маркеры молекулярного веса ДНК (40-10.000.000 п.о.), трек 6-8 – пробы IgA с активностью 4, 5 и 5 Ед, соответственно

p-нитроанилина (с учетом коэффициента его молярной экстинкции 9800 л/моль*см), высокочувствительны и хорошо воспроизводимы. При этом они существенно проще в постановке в сравнении с методами электрофореза и могут быть использованы для массовых исследований.

В реакциях применяли субстрат сериновых протеаз бензоил-аргинин-p-нитроанилид (БАП-НА), субстрат гранулоцитарной эластазы Glp-Pro-Val-p-нитроанилид, субстрат катепсина G N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилид,

субстрат катепсина С Gly-Phe-p-нитроанилид, субстрат катепсина В Z-Arg-Arg-p-нитроанилид.

Поскольку данные виды каталитической активности IgA до сих пор не изучались, проводилась адаптация всех методов определения ферментативной активности для оценки абзимных IgA с детекцией результатов на многоканальном фотометре Ф300 производства ОАО «Витязь», Республика Беларусь.

Реакции ставили в полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа. IgA вно-

силы в реакционную смесь суммарным объемом 0,2 мл в конечной концентрации 50 мкг/мл на 0,15M NaCl.

Определение БАПНА-амидазы IgA проводили в 0,1 М трис-HCl буфере, pH 8,3 в течение 20 ч при 37°C, эластазы – в 0,1 М трис-HCl буфере pH 7,5, содержащем 1 мМ субстрата в течение 2 ч, катепсина G – в том же буфере в течение 4 ч, катепсинов B и C с предварительной активацией ферментов восстановителем (цистеином) – в 0,1М фосфатном буферном растворе pH 6,0, содержащем 1 мМ ЭДТА, 2,5 мМ цистеина гидрохлорида и 0,5 мМ субстрата при инкубации в течение 20 ч.

При инкубации проб в течение 20 ч в реакционную среду вносили азид натрия до концентрации 0,1%.

Для оценки оксидоредуктазного действия IgA исследовали их пероксидазную и каталазную абзимную активность.

Пероксидазную активность IgA определяли в реакции с ТМБ и 0,01% перекисью водорода в 0,1 М цитратно-фосфатном буферном растворе pH 5,0 в течение 30 мин при 37°C; реакцию останавливали добавлением 2 М серной кислоты; каталазную – с 0,2% H₂O₂ в 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,4 в течение 20 ч при 37°C; реакцию останавливали добавлением 10% молибдата аммония.

Для всех видов активности помимо пероксидазной учет реакций проводили на многоканальном фотометре при двухволновом измерении (405 нм и 620 нм). Пероксидазную реакцию регистрировали при двухволновом измерении на 450 и 620 нм, соответственно. Полученные

результаты выражали в условных единицах (Ед), соответствующих единицам оптической плотности. Для каталазы определяли относительную убыль субстрата (перекиси водорода) в сравнении с контрольными значениями.

3. Оценка параметров каталитической активности поликлональных IgA

Предварительные эксперименты показали, что высокая каталитическая эффективность характерна для IgA с пероксидазной, ДНКазной и эластазной активностью, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом. Меньшая каталитическая эффективность установлена для абзимов с активностью катепсина G, минимальная – для БАПНА-амидазных ИГ.

Кинетика эластазной, катепсиноподобной, БАПНА-амидазной и пероксидазной абзимных реакций представлена на рис. 4, 5, 6, 7.

Из представленных данных следует, что кинетика абзимного протеолиза имеет линейный характер, что характерно для ферментативных реакций при полном насыщении активных центров катализатора.

Кинетика пероксидазной абзимной реакции близка к линейной на первых 15-20 минутах инкубации ферментно-субстратной смеси, затем процесс замедляется. Это может быть связано с уменьшением активности, либо с исходной гетерогенностью абзимных ИГ.

Также нами было изучено влияние pH на основные типы реакций, катализируемых абзимами.

Пероксидазную, эластазную и катепсиноподобную (катепсин G) абзимные реакции прово-

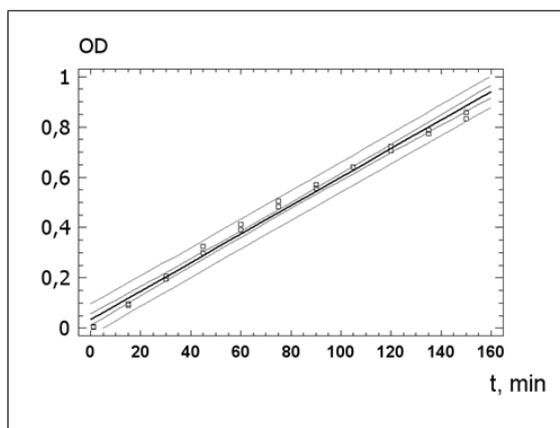


Рис. 4. Кинетика гидролиза субстрата эластазы поликлональными IgA

Примечание. Инкубация реакционной смеси при 37°C.

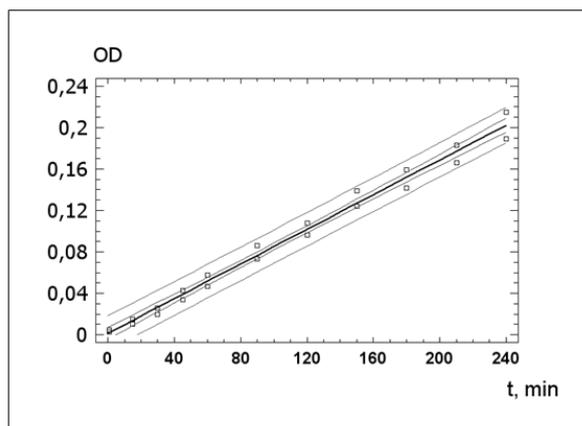


Рис. 5. Кинетика гидролиза субстрата катепсина G поликлональными IgA

Примечание. Инкубация реакционной смеси при 37°C.

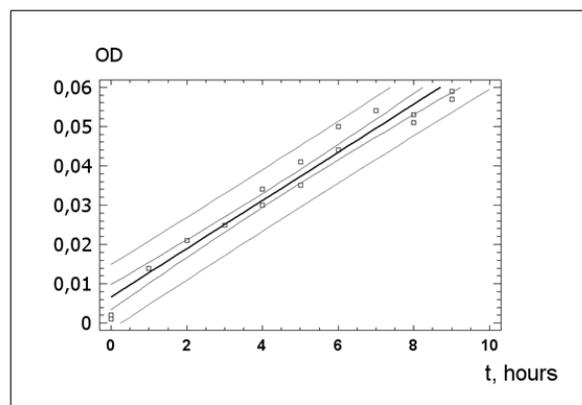


Рис. 6. Кинетика гидролиза субстрата БАПНА поликлональными IgA

Примечание. Инкубация реакционной смеси при 37°C.

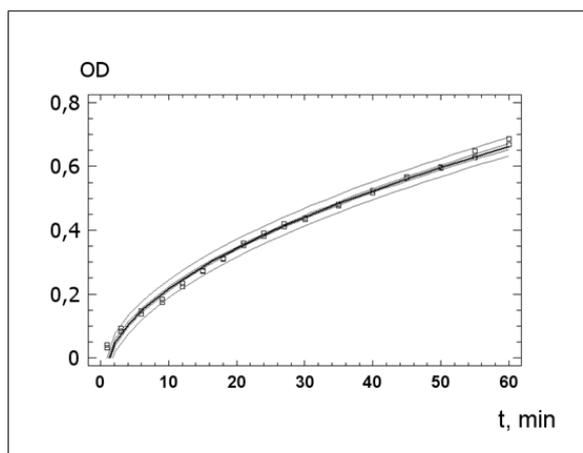


Рис. 7. Кинетика пероксидазной реакции поликлональных IgA

Примечание. Инкубация реакционной смеси при 20°C.

дили в следующих буферных растворах: 0,1 М глицин-HCl-буфере рН 2,6; 0,05 М ацетатном буфере рН 4,0-5,0-6,0; 0,05 М трис-HCl буфере рН 7,0-8,0-9,0.

Результаты представлены на рис. 8, 9, 10.

Из них следует, что изученный IgA-образец с активностью катепсина G имеет один оптимум рН в щелочной зоне, что характерно для сериновых протеаз.

Другие результаты получены для препаратов IgA с эластазной и пероксидазной активностью. При инкубации эластазных ИГ в течение 5 часов

с субстратом были обнаружены 2 максимума рН в слабокислой (рН 6,0) и щелочной зонах, что не соответствует активности природных эластаз. При удлинении времени реакции до 24 часов максимум рН в слабокислой среде обозначился еще более выраженно.

Аналогичная зависимость была установлена нами и для образца IgA с пероксидазной активностью – реакция имела 2 явных оптимума при рН 5,0 и 7,0 (рис. 9).

Эти данные совпадают с нашими предыдущими результатами, а также данными группы

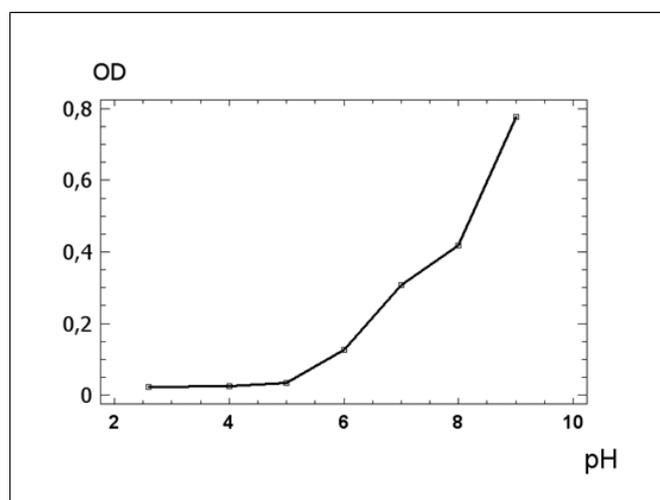


Рис. 8. Каталитические IgA с активностью катепсина G – зависимость от pH среды.

Примечание. Время инкубации – 4 ч при 37°C.

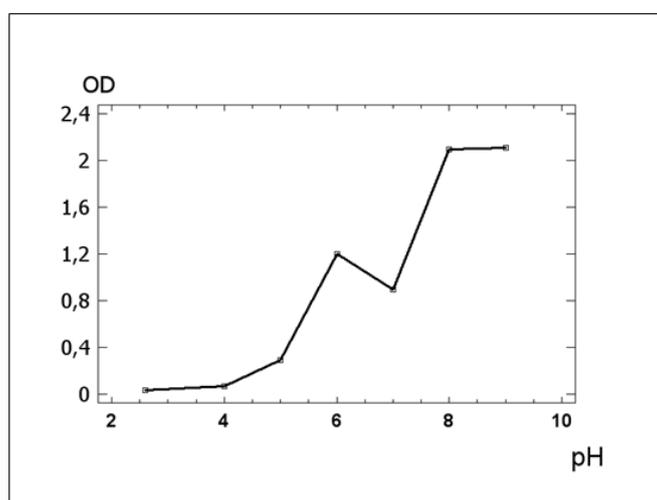


Рис. 9. Каталитические IgA с активностью эластазы – зависимость от pH среды.

Примечание. Время инкубации – 5 ч при 37°C.

Г.А. Невинского относительно выраженной гетерогенности поликлонального абзимного катализа, которые были получены ранее для абзимных иммуноглобулинов класса G [16]. Они позволяют хотя бы частично объяснить результаты клинических исследований абзимной активности, где препараты, выделенные от разных пациентов с одной и той же патологией или даже у одного пациента в разные сроки заболевания могли существенно отличаться по уровню активности и условиям протекания реакций [16].

4. Сравнительная характеристика абзимной активности IgA, выделенных из ротовой жидкости и сыворотки крови

Суммарные результаты определения оксидоредуктазной (пероксидазной, каталазной), протеолитической и ДНКазной активности IgA представлены в таблице 1.

Полученные данные указывают на существенные отличия как в уровнях, так и в частоте обнаружения различных видов абзимной активности среди изучаемых групп.

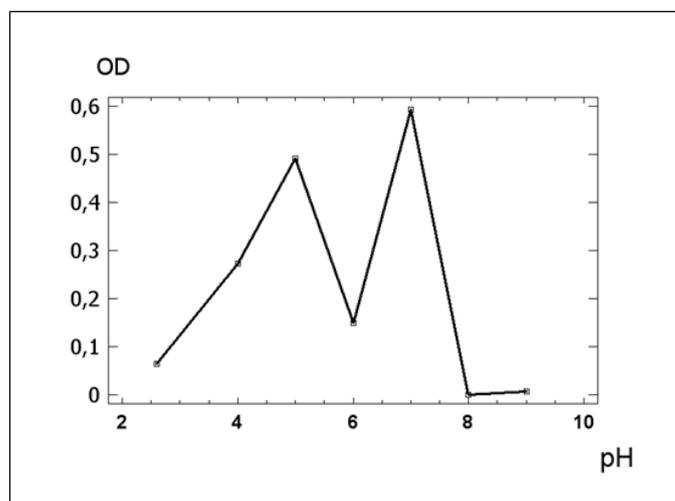


Рис. 10. Каталитические IgA с активностью пероксидазы – зависимость от pH среды.

Примечание. Время инкубации – 30 мин при 37°C.

Таблица 1. Каталитическая активность IgA из сывороток пациентов с СКВ, ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом и здоровых лиц

Ферментативная активность IgA, Ед	Пациенты с СКВ (IgA сыв-ки, n=14)	Пациенты с ХП (IgA РЖ)	Лица без патологии периодонта (IgA РЖ)
	1	2	3
Пероксидаза	(-)	0,497 (0,086:1,085) ^{***} , n=52	0,055 (0,016:0,114), n=31
Каталаза	9,64 (7,38:14,92) ^{##}	5,80 (2,74:14,56), n=52	4,49 (2,78:6,83), n=30
БАПНА-амидаза	0,015 (0:0,03)	0,007 (0:0,015), n=52	0,010 (0,007:0,014), n=30
Эластаза	(-)	0,251 (0,064:0,814) ^{**} , n=47	0,071 (0,008:0,246), n=30
Катепсин G	0,003 (0:0,045)	0,019 (0,004:0,056), n=47	0,042 (0,012:0,095), n=29
Катепсин B	0,004 (0,001:0,006)	0,003 (0:0,014), n=43	0,006 (0:0,011), n=29
Катепсин C	(-)	0,0 (0:0,025), n=43	(-)
ДНКазы (баллы)	0,0 (0:1,0)	1,0 (0,5:2,125) ^{**} , n=52	0,5 (0:0,75), n=31

Примечания: (-) активность не обнаружена; ^{***} и ^{**} – различия между 2 и 3 группой достоверны, p<0,001 и 0,01, соответственно; ^{##} – различия между 1 и 3 группой достоверны, p<0,01.

Во всех группах установлена лишь минимальная активность цистеиновых протеиназ (катепсина В и С), причем активности катепсина С в 2-х группах из 3-х обнаружено не было.

Активности сериновых протеиназ (БАПНА-амидаза, катепсин G и эластаза) распределялись по-разному. БАПНА-амидазная активность в всех группах была минимальной. В свою очередь, эластазная активность IgA ротовой жидкости была максимальной у пациентов с хроническим периодонтитом, достоверно превышая значения контрольной группы; при этом такой вид активности полностью отсутствовал в сывороточных IgA пациентов СКВ.

Сходный профиль активности был характерен и для пероксидазных IgA (отсутствие ее в сывороточных IgA пациентов СКВ и максимальный уровень у пациентов с хроническим периодонтитом).

Каталазная активность во всех группах была невыраженной, наибольшие уровни зарегистрированы в сывороточных IgA пациентов СКВ.

ДНКазная активность была максимальной в IgA ротовой жидкости пациентов хроническим периодонтитом, достоверно превышая уровни контрольной группы и уровни сывороточных IgA пациентов СКВ.

Анализ данных результатов позволяет заключить, что абзимная активность IgA, выделенных из ротовой жидкости, существенно выше, чем активность сывороточных IgA пациентов СКВ. В свою очередь, удельная абзимная активность IgA, выделенных из любого источника, значительно превышает удельную абзимную активность поликлональных IgG, которая была детально изучена нами ранее [17]. При использовании одних и тех же методов исследования для регистрации абзимной активности концентрация IgG находилась в пределах 0,5-1,0 мг/мл, тогда как концентрация IgA составляла 50-100 мкг/мл. Тем самым активность ряда образцов IgA превышает удельную активность IgG не менее чем на порядок.

Заслуживает отдельного рассмотрения установленное нами преобладание абзимной активности IgA ротовой жидкости в сравнении с сывороточной абзимной активностью при СКВ. Необходимо учитывать, что все обследованные нами пациенты СКВ имеют длительный

стаж заболевания с неоднократным лечением глюкокортикостероидами, которые подавляют абзимную активность. Однако даже с учетом этого обстоятельства активность IgA ротовой жидкости представляется существенно более высокой. Следует отметить, что полученные нами результаты полностью соответствуют данным единичного исследования Planque S. с соавт., посвященного протеолитической активности IgA слюны и сыворотки здоровых лиц в отношении белка gp120 вируса ВИЧ [10]. Авторы работы приходят к выводу, что IgA слюны являются наиболее эффективными поликлональными абзимными катализаторами, превышая активность IgA сыворотки более чем в 15 раз [10]. По их мнению, абзимный катализ может быть весьма значимым и важным механизмом местной иммунной защиты, по крайней мере, в отношении вирусов. Безусловно, что данная гипотеза нуждается в многочисленных дополнительных подтверждениях и требует проведения дальнейших исследований.

Выводы

1. Разработан комплекс методов, которые позволяют достоверно определять оксидоредуктазную (пероксидазную, каталазную), протеолитическую (эластазную, БАПНА-амидазную, катепсиноподобную) и нуклеазную (ДНКазную) абзимную активность поликлональных иммуноглобулинов класса А, выделенных из ротовой жидкости и сыворотки крови.
2. Для абзимных IgA с пероксидазной и эластазной активностью характерна гетерогенность по скорости каталитических реакций и по зависимости реакций от рН среды. Ряд образцов абзимных IgA имеет не менее 2-х оптимумов рН в слабнокислой и щелочной зонах.
3. Абзимные IgA, выделенные из ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом, обладают наиболее высокой эластазной, пероксидазной и ДНКазной активностью, которая достоверно ($p < 0,01-0,001$) превышает активность IgA ротовой жидкости здоровых лиц и IgA сывороток пациентов СКВ.

Исследование выполнено при поддержке Белорусского Республиканского Фонда фундаментальных исследований, грант БРФФИ №М13-105.

Литература

1. Catalytic Antibodies. Ed. Eh. Keinan. Weinheim.: Wiley-Vch Verlag, 2005; 578.
2. Catalytic antibodies. Chemical immunology: Ed. Paul S. Basel: S. Karger AG, 2000; 162.
3. Сучков С.В., Алекберова З.С., Палеев Ф.Н. и др. Достижения и перспективы клинической абзимологии. Вестник РАМН. 2005; №9: 38-43.
4. Кит Ю.Я., Семенов Д.В., Невинский Г.А. Существуют ли каталитические антитела у здоровых людей? Мол.биол. 1995; Т.29 (4): 893-905.
5. Savelev A.N., Kanyshkova T.G., Kulminskaya A.A. et al. Amyolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk. Clin Chim Acta 2001; 314(1-2): 141-52.
6. Odintsova E.S., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Casein-hydrolysing activity of sIgA antibodies from human milk. J. Mol. Recognit. 2005; 18(5): 413-21.
7. Gorbunov D.V., Karataeva N.A., Buneva V.N. et al. Lipid kinase activity of antibodies from milk of clinically healthy human mothers. Biochim Biophys Acta 2005; 1735(3): 153-66.
8. Karataeva N.A., Gorbunov D., Prokudin I.V. et al. Human milk antibodies with polysaccharide kinase activity. Immunol Lett. 2006; 103(1): 58-67.
9. Mitsuda Y., Planque S., Hara M. et al. Naturally occurring catalytic antibodies: evidence for preferred development of the catalytic function in IgA class antibodies. Mol Biotechnol. 2007; 36 (2): 113-22.
10. Planque S., Mitsuda Y., Taguchi H. et al. Characterization of gpl 20 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection. AIDS Res. Hum. Retroviruses 2007; 23: 1541-1554.
11. Генералов И.И., Коротина О.Л., Тихонова С.В. и др. Абзимная активность поликлональных иммуноглобулинов класса А. Вестн. ВГМУ 2014; 13(4): 42-47.
12. Иммунологические методы. Под ред. Г.Фримеля; пер.с нем. М.: Мед., 1987; 472.
13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981; 286.
14. Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В. и др. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль. Мол. биол. 1997; 31(6): 1088-1096.
15. Kundzer A.V., Volkova M.V., Bogdanos D.P. et al. Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs: a putative serological marker in patients with spondyloarthritis. Immunol. Res. 2013; 56(1): 383-392.
16. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Бунева В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии. Биохимия 2000; 65 (11): 1245-1255.
17. Генералов И.И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях. Иммунопатология, аллергология, инфектология.-2000.-№3.-С.12-17.

Сведения об авторах:

Генералов Игорь Иванович – зав. кафедрой клинической микробиологии ВГМУ, д-р. мед. наук, профессор; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, g2@tut.by, 8-0212-37-06-12

Коротина Ольга Львовна – аспирант кафедры клинической микробиологии ВГМУ; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, korol-med@mail.ru, 8-0212-37-06-12.

Жерулик Софья Валерьевна – аспирант кафедры онкологии с курсом лучевой диагностики и курсом ФПК и ПК ВГМУ; 210603, г.Витебск, ул.П. Бровки, 33, polozkaya@tut.by, 8-0212-57-64-16.

Генералова Анжелика Геннадьевна – доцент кафедры патологической физиологии ВГМУ; канд. мед. наук; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, scider@mail.ru, 8-0212-37-06-12.

Волкова Маргарита Васильевна – ассистент кафедры госпитальной терапии ВГМУ; канд. мед. наук; 210033, г. Витебск, ул. Воинов-Интернационалистов, 37, margovolkova@gmail.com, 8-0212-37-06-12.

Поступила 15.01.2015 г.