

И.И. ГЕНЕРАЛОВ
Витебский государственный
медицинский университет,
Витебск

УДК 616-097-034

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgG ПРИ АУТОИММУННЫХ, ВИРУСНЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В работе исследована ДНКазная, БАПНА-амидазная, гиалуронидазная и пероксидазная активность больных ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, вирусными гепатитами В и С, раком желудка, патологией щитовидной железы (аутоиммунным тиреодитом, диффузным токсическим зобом, раком щитовидной железы). Уровни абзимной активности больных достоверно превышали активность IgG контрольной группы, исключая пероксидазную активность, которая была выше активности доноров только у больных с заболеваниями щитовидной железы.

Обсуждаются возможные механизмы различий уровней абзимной активности, выявляющиеся при патологических процессах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: поликлональные IgG человека, абзимная активность.

COMPLEX ANALYSIS OF DIFFERENT POLYCLONAL ABZYME IgG ACTIVITIES IN AUTO-IMMUNE, VIRAL AND CANCER DISEASES

I.I. GENERALOV

Vitebsk State Medical University

We examined DNase, BAPNA-amidase, hyaluronidase and peroxidase abzyme activities in patients with reumathoid arthritis, systemic lupus erythemathosus, viral hepatites B and C, gastric cancer and different thyroid pathology (autoimmune thyroiditis, Grave's disease, thyroid cancer). The absolute levels of these variants of abzyme activity in patients were increased in comparison with the same ones in healthy donors ($p < 0,001$) except one of peroxidase activity which prevailed donors only in patients with thyroid pathology.

Possible mechanisms of increased abzyme activity levels in different kinds of pathology are discussed.

KEY WORDS: polyclonal human IgG, abzyme activity.

Изучение антител (АТ), обладающих ферментативной активностью, представляет собой новое направление, возникшее в последние годы развития иммунологии [10]. Немногим более чем за десять лет, прошедших с момента создания первых каталитических ИГ [17], были получены существенные результаты, касающиеся взаимодействия абзимов с разнообразными субстратами, механизма их действия, особенностей получения и т.д.

Сейчас область, находящаяся на стыке химии, биотехнологии и иммунологии – абзимология – представляет собой новое весьма динамично развивающееся научное направление. Исследования по данной проблеме широко проводятся в США, странах ЕЭС, Израиле, России. Уже получены первые моноклональные и генно-инженерные абзимы, пригодные для промышленного и медицинского применения [10].

Другая сторона обнаруженного явления – абзимная активность, возникающая в живом организме – только начинает изучаться. К настоящему времени доказано, что каталитические АТ могут закономерно возникать в ходе поликлонального иммунного ответа [15, 16].

Исследования роли абзимной активности в патологии являются весьма немногочисленными. В большинстве до сих пор опубликованных работ приводятся лишь доказательства ферментативной активности АТ без определения их связи с проявлениями болезней, лечением и возможным прогнозом [1, 2, 13, 14]. Отсюда **основной целью** нашего исследования явилась единовременная комплексная оценка различных видов абзимной активности при аутоиммунных, онкологических и вирусных заболеваниях, определение параметров абзимной активности IgG, а также изучение дифференциально-диагностических возможностей определения абзимной активности для диагностики патологических процессов.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовались препараты иммуноглобулинов (И) класса G, выделенные из сывороток крови больных и доноров комбинированным методом. Очистку и контроль чистоты полученных иммуноглобулинов (ИГ) проводили как описано в [3, 5, 9]. Концентрацию IgG в сыворотках определяли по методу Манчини [7].

Всего обследовано 63 больных ревматоидным артритом (12 – с серонегативной формой заболевания, остальные – с серопозитивной), больных СКВ – 20 человек, острым гепатитом В – 19, хроническим гепатитом С – 12, инфекционно-зависимой и смешанной формой бронхиальной астмы (БА) – 46, раком желудка – 48 человек, лиц с патологией щитовидной железы – диффузным токсическим зобом 34 человека, аутоиммунным тиреоидитом 36 человек, раком щитовидной железы 17 больных. Контрольную группу составили доноры областной станции переливания крови (69 человек).

В этих группах изучали ДНКазную, БАПНА-амидазную, гиалуронидазную и пероксидазную абзимную активность по методам, изложенным в [3, 5, 11]. Результаты определения выражали в единицах оптической плотности (условные единицы, УЕ) или в единицах ферментативной активности (ЕД).

Для выделения каталитически активных фракций металлозависимых абзимов использовали метод металло-хелатной хроматографии (МХХ) на

сорбенте с привитой иминодиуксусной кислотой. На основании ранее проведенных экспериментов [4, 6] было сделано предположение, что вследствие различного сродства IgG к МХХ-матрице можно получить фракции препарата с увеличенным содержанием каталитических АТ.

Результаты и обсуждение

Результаты электрофореза некоторых препаратов абзимно активных IgG после различных этапов очистки в полиакриламидном геле представлены на Рис. 1. Эти данные, а также результаты окрашивания электрофореграмм нитратом серебра подтвердили гомогенность полученных препаратов.

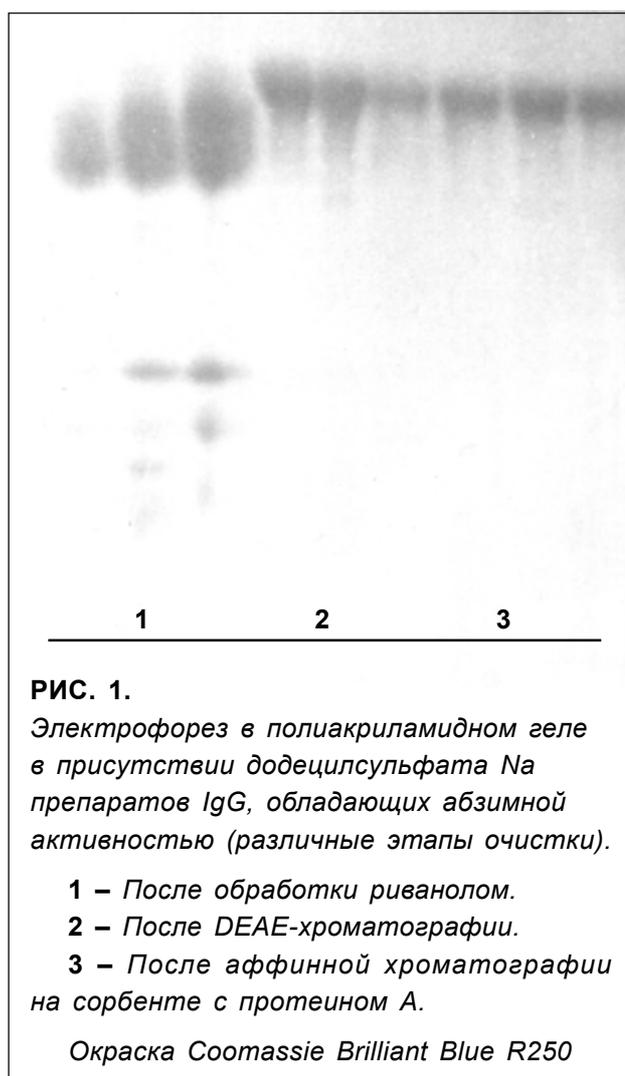


РИС. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата Na препаратов IgG, обладающих абзимной активностью (различные этапы очистки).

- 1 – После обработки риванолом.
- 2 – После DEAE-хроматографии.
- 3 – После аффинной хроматографии на сорбенте с протеином А.

Окраска Coomassie Brilliant Blue R250

Проведенные эксперименты выявили некоторые особенности абзимного действия поликлональных IgG. При исследовании влияния теплового фактора на абзимные реакции оказалось, что температурный оптимум у различных видов активности несколько отличается.

Для препарата IgG с ДНКазной активностью оптимум совпадал с физиологическим и был равен 37°C. При увеличении температуры инкубации до 56°C активность заметно снижалась. Эти результаты в целом подтверждаются данными других авторов по изучению термостабильности абзимных нуклеаз. В частности, при прогреве при 60°C IgG с РНКазным действием активность последних снижалась на 90% от исходной [2].

Для БАПНА-амидазной активности картина была несколько иная. Наибольшая активность изученного препарата IgG наблюдалась при 41°C (выше, чем при 37°C). Гиалуронидазная абзимная активность была максимальной при 37°C. Тем не менее, она сохранялась и после прогрева при 56°C. Это совершенно не совпадает с действием микробных гиалуронидаз, которые в таких условиях полностью ингибируются.

Наконец, препарат пероксидазных абзимов был самым термостабильным, активность мало менялась с изменением температуры. Это может свидетельствовать о том, что данная активность связана с инвариантными участками молекул IgG и мало зависит от переменных участков. Вероятно, тепловые конформационные изменения также затрагивают эту активность в меньшей степени.

При оценке зависимости от pH между абзимами также были обнаружены отличия. Препарат гиалуронидазных абзимов обладал широким оптимумом pH с максимумом в нейтральной зоне. Этот параметр сходен с pH действия микробных гиалуронатлиаз и полностью не совпадает с оптимумом сывoroточной лизосомальной и тестикулярной гиалуронидаз.

Схожим образом от pH зависел препарат абзимов с пероксидазным действием.

По данным литературы [1], аналогичную зависимость от pH проявляют и ДНКазные абзимы: широкий диапазон pH со слабым максимумом при 7.0-8.0. Некоторые выделенные нами препараты обладали подобным действием. Однако были обнаружены образцы, имеющие 2 оптимума – больший в слабощелочной зоне и меньший – в слабокислой. Это подтверждает каталитическую гетерогенность препарата абзимов.

В свою очередь, исследованные IgG с БАПНА-амидазным действи-

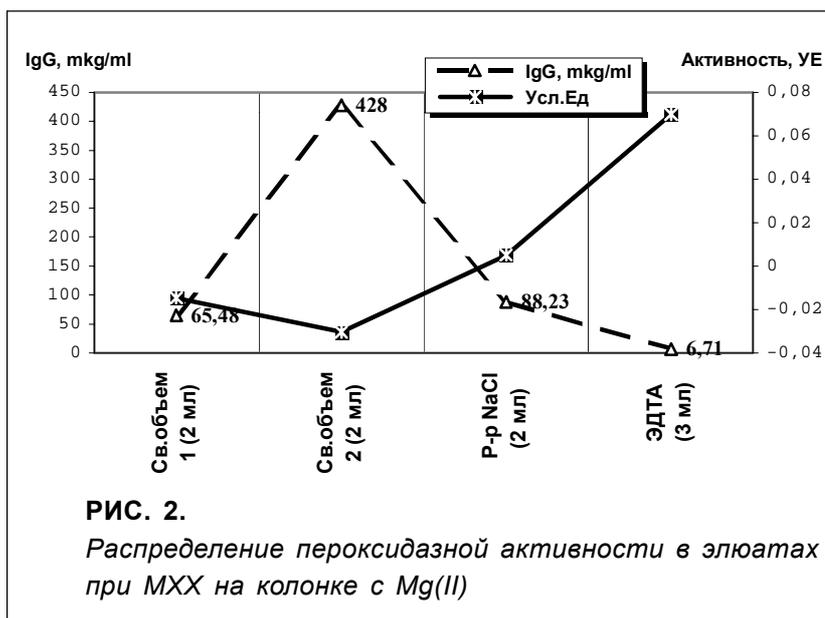
ем были активны от кислой до слабощелочной среды с невыраженным максимумом в нейтральной зоне.

ДНКазная абзимная активность существенно снижалась после превышения некоторой пороговой концентрации NaCl в среде (около 0.1-0.3М и выше). Это свидетельствует о существенном вкладе ионных взаимодействий в связывание таких абзимов с субстратом.

С другой стороны, для пероксидазной и БАПНА-амидазной активности такие взаимодействия имели меньшее значение – с увеличением ионной силы активность понижалась лишь умеренно.

При использовании МХХ для увеличения содержания абзимов в препарате IgG оказалось, что для гиалуронидазной, а также БАПНА-амидазной активности не удалось обнаружить существенных отличий в абзимной активности между фракциями одного препарата IgG, различно взаимодействующих с МХХ-матрицей. Однако было выявлено, что для некоторых реакций (например пероксидазной) удельная активность фракций IgG значительно возросла. Это увеличение зависит от степени избирательности взаимодействия IgG с соответствующим сорбентом. Если после сорбции на катионах меди удельная активность IgG увеличилась лишь в несколько раз для фракции IgG, задерживаемой на сорбенте ($1,1 \cdot 10^{-4}$ УЕ/мкг IgG против $4,3 \cdot 10^{-5}$ УЕ/мкг для исходных нефракционированных IgG), то для катионов магния удельная активность выросла на несколько порядков ($1,04 \cdot 10^{-2}$ УЕ/мкг IgG) и вся активность препарата IgG была связана именно с этой фракцией (Рис. 2).

Сопоставление уровней абзимной активнос-



ти при различной патологии выявляет следующее: наиболее выражено абзимное действие проявляется при аутоиммунных заболеваниях или болезнях, имеющих существенный аутоим-

мунный патогенетический компонент (основные результаты исследований представлены в Таблице).

Таблица

Уровни абзимной активности поликлональных IgG при изучаемых заболеваниях

Наибольший уровень ДНКазной абзимной активности отмечается при аутоиммунном тиреоидите, далее

Изучаемые заболевания	ДНКазная активность (УЕ/мг IgG)	БАПНА-амидазная активность (пКат/мг IgG)	Гиалуронидазная активность (УЕ/мг IgG)	Пероксидазная активность (ЕД/мг IgG)
<i>Ревматоидный артрит (серопозитивный)</i>	31,38±4,82	0,62±0,12	14,1±3,61	–
<i>СКВ</i>	28,95±3,69	0,5±0,058	15,66±2,45	0,014±0,003
<i>Бронхиальная астма</i>	29,42±4,61	0,6±0,20	11,19±1,93	0,015±0,0013
Вирусные гепатиты	36,96±4,11	0,38±0,047	7,94±2,48	–
в т. числе ОГВ	38,46±6,39	0,39±0,06	7,18±4,1	–
в т. числе ХГС	35,79±7,84	0,44±0,11	9,84±3,44	–
Рак желудка	15,02±2,79	0,98±0,19	6,31±1,45	0,021±0,001
Болезни щитовидной железы	34,2±2,0	0,74±0,06	-	0,02±0,0002
в т. числе диффузный токсический зоб	28,1±2,7	0,54±0,08	-	0,018±0,0001
в т. числе аутоиммунный тиреоидит	53,6±4,6	1,01±0,15	-	0,023±0,001
в т. числе рак щитовидной железы	17,1±1,8	0,38±0,03	-	0,022±0,0003
Доноры крови	7,8±0,99	0,083±0,006	6,81±1,74	0,018±0,0001

следуют вирусные гепатиты В и С. В целом эти результаты подтверждаются данными [1], где наивысший уровень ДНКазной активности обнаружен при вирусных гепатитах. Однако в этой работе не было проведено сравнение активности, присущей вирусной патологии, с ДНКазной активностью при аутоиммунных процессах.

Здесь следует обязательно обратить внимание еще на одно обстоятельство: и при вирусных гепатитах, и при аутоиммунном тиреоидите назначаемое лечение прямо не затрагивает иммунную систему (исключая терапию альфа-интерфероном при гепатитах). Глюкокортикостероиды (ГКС) назначаются непостоянно и обычно в небольших дозировках.

В свою очередь, при диффузных болезнях соединительной ткани (ДБСТ), особенно при СКВ, ГКС являются основой патогенетической терапии. Все шире их используют и в лечении РА [8]. Отсюда для исследования весьма трудно подобрать группу исходно не лечившихся больных с ДБСТ (особенно с прогрессирующими или тяжелыми формами).

Не исключено, что без лечения ГКС уровень ДНКазной абзимной активности у больных ДБСТ

был бы значительно выше. Это подтверждается другими полученными нами данными

В частности, при РА прием ГКС связан с достоверно более низким уровнем ДНКазной абзимной активности (0.037±0.0038 ЕД/мг IgG) в сравнении с группой больных, принимавших метотрексат (0.047±0.0035 ЕД/мг IgG), хотя группы больных были сходными. С другой стороны, прием цитостатиков при РА подавлял другие виды активности (гиалуронидазную и БАПНА-амидазную) в сравнении с группами больных, лечившихся стероидами и НПВП.

Эти результаты оказались сходными с данными наших экспериментов *in vitro*, где гидрокортизон значительно ингибировал абзимную ДНКазную реакцию, причем максимум эффекта приходился на концентрацию препарата 150-200 мкг/мл.

Весьма сложно оценить природу ингибирующего воздействия кортикостероидов на ДНКазную абзимную активность. Механизм их действия чрезвычайно многообразен и до конца не изучен. Считается, что ГКС подавляют любой воспалительный процесс, увеличивая транскрипцию генов липокортинина – блокатора фосфолипазы А₂ [12].

На продукцию ИГ они влияют опосредованно, подавляя пролиферацию субпопуляций лимфоцитов.

сходными каталитическими характеристиками. Такое направление представляется перспективным и экономически более выгодным в сравнении с гибридной технологией для моноклональных каталитических АТ. Полученные поликлональные абзимы

можно будет затем обогащать, в том числе с помощью предложенного нами метода металло-хелатной хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусных гепатитов // Биохимия. - 1997. - Т.62, №12. - С.1590-1601.
2. Власов А.В., Хельм М., Наумов В.А. с соавт. Особенности гидролиза тРНК аутоантителами из сыворотки крови больных некоторыми аутоиммунными и вирусными заболеваниями // Мол.биол. - Т.33, №5. - С.866-872.
3. Генералов И.И., Новиков Д.К. Изменение амидазной активности препаратов IgG у больных бронхиальной астмой до и после специфической иммунотерапии. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 1999. - №1. - С. 119-125.
4. Генералов И.И., Новиков Д.К., Жильцов И.В. Взаимодействие поликлональных IgG человека с катионами металлов // Весці НАН РБ (серыя біялагічных навук). - 1999. - №1. - С.95-101.
5. Генералов И.И., Сидорская Е.В. Абзимная активность препаратов IgG у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой // Иммунология. - 1998. - N3. - С.54-56.
6. Генералов И.И., Сидорская Е.В., Генералова А.Г., Жильцов И.В., Огрызко Н.Н., Адамович Л.А. Усиление абзимной активности поликлональных IgG при взаимодействии с катионами металлов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - №1. - С. 40-43.
7. Иммунологические методы: Пер. с нем./Под ред. Г Фримеля. - М., 1987.
8. Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. - М., 1989. - С.170-171.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981.
10. "Промышленная иммунология"// "В мире науки". - 1991. - N11. - С.105-106.
11. Сидорская Е.В., Генералов И.И., Окороков А.Н. Каталитическая активность препаратов IgG при заболеваниях щитовидной железы //Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - №1. - С. 40-43.
12. Теппермен Д., Теппермен Х.. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. - М., 1989. - С.359-360.
13. Kalaga R., Li L., O'Dell J., Paul S. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis //J.Immunol. - 1995, V.155. - N5. - P.2695-2702.
14. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., et al. Catalytic activity of antithyroglobulin antibodies. //J. Immunol.-1997.-Vol.154.-№7.-P.3328-3332.
15. Shreder K., Thomas R., Wallace M., Helms E., Iverson B. Evolution of catalytic activity throughout a polyclonal immune response elicited by a transition-state-analog hapten // Isr. J. Chem. - 1996 - Vol.36. - P.215-220.
16. Stephens D.B., Thomas R.E., Stanton J.F., Iverson B.L. Polyclonal antibody catalytic variability // Biochem. J. - 1998 - Vol.332. - P.127-134.
17. Tramontano A., Janda K.D., Lerner. Catalytic antibodies. //Science.-1986.-Vol.234.-P.1566-1569.