

АБЗИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА А

ГЕНЕРАЛОВ И.И., КОРОТИНА О.Л., ТИХОНОВА С.Ф., ГЕНЕРАЛОВА А.Г., ЖЕЛЕЗНЯК Н.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Проведено выделение поликлональных иммуноглобулинов класса А из ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом, а также здоровых лиц из группы контроля. В этих группах выполнена оценка ДНКазной, протеолитической и оксидоредуктазной абзимной активности IgA. Одновременно проведена оценка ДНКазной, протеолитической и оксидоредуктазной активности ротовой жидкости пациентов и лиц контрольной группы, которая служила источником выделения поликлональных иммуноглобулинов. Впервые установлено, что поликлональные IgA ротовой жидкости обладают собственной ДНКазной, пероксидазной, каталазной и протеолитической активностью.

Ключевые слова: абзимы, ДНКазная активность, протеолитическая активность, каталазная активность, пероксидазная активность, иммуноглобулины, антитела.

Abstract.

Isolation of polyclonal IgA from oral fluids of patients with chronic periodontitis and healthy individuals from the control group was conducted. These immunoglobulin samples were tested for the presence of their natural DNase, proteolytic and redox catalytic activity. Simultaneously with abzyme testing the assessment of DNase, proteolytic and oxidative activities of initial oral fluids used for primary isolation of IgA was performed. It was determined for the first time that polyclonal IgAs of oral fluids can possess intrinsic DNase, peroxidase, catalase and proteolytic activity.

Key words: abzymes, DNase activity, proteolytic activity, catalase activity, peroxidase activity, immunoglobulins, antibodies.

В настоящее время доказано, что поликлональные каталитические антитела (АТ) или абзимы («abzymes», от англ. – antibody+enzyme) регулярно появляются при самых разных аутоиммунных и инфекционных заболеваниях. При этом такие аутоабзимы имеют весьма различную субстратную специфичность – нуклеазную, протеолитическую, оксидоредуктазную [1].

По мнению многих исследователей, абзимная активность является одним из самых перспективных новых диагностических маркеров патологических процессов [2, 3, 4].

Однако, учитывая сравнительно короткий срок исследования поликлональных каталитических иммуноглобулинов (ИГ), а также широкий спектр возможных видов абзимной

активности, многие важные особенности их действия остаются пока неизученными.

Текущие исследования абзимной активности в подавляющем большинстве проводятся на каталитических АТ, относящихся к иммуноглобулинам класса G [5]. В первую очередь, это обусловлено сравнительной легкостью очистки IgG в сравнении с другими классами иммуноглобулинов (ИГ). Для выделения IgG разработаны и промышленно выпускаются селективные аффинные сорбенты с протеином А или G, которые позволяют за короткий срок получить значительные количества электрофоретически гомогенного IgG [1].

Тем не менее, изучение абзимной активности IgA представляется весьма перспективным, поскольку молекула секреторного IgA

может быть более эффективным катализатором по сравнению с IgG, учитывая ее многовалентность (ди- или тример) [6], наличие большого количества сульфгидрильных групп и т.д. Отсюда возникают и возможности новой интерпретации ряда механизмов и явлений, связанных с местным гуморальным иммунитетом (IgA-опосредованным).

Тем не менее, имеются лишь единичные исследования, посвященные каталитической активности поликлональных IgA [7]. Целенаправленного же изучения различных видов IgA-абзимов, появляющихся в норме или при каких-либо патологических состояниях, до сих пор не проводилось.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования стало определение каталитической (ДНКазной, протеолитической, оксидоредуктазной) абзимной активности иммуноглобулинов класса А, выделенных из ротовой жидкости здоровых лиц и пациентов с хроническим периодонтитом.

Методы

В работе были использованы ДНК тимуса теленка, тетраметилбензидин (ТМБ), субстрат для сериновых протеаз бензоил-DL-аргинин- ρ -нитроанилид (БАПНА), субстрат гранулоцитарной эластазы Glp-Pro-Val- ρ -нитроанилид, субстрат катепсина G N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe- ρ -нитроанилид, субстрат катепсина C Gly-Phe- ρ -нитроанилид, субстрат катепсина B Z-Arg-Arg- ρ -нитроанилид, агароза, конъюгированная с антителами против IgA человека (α -цепь), агароза для электрофореза, реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ), краситель для ДНК этидия бромид (все – производства Sigma, США). Остальные реактивы – отечественного производства и перефасовки квалификации «хч» и «чда».

При постановке иммунохимических методов применяли антисыворотки к сывороточным ИГ классов G, A, M производства РНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (РФ, Москва).

Материалом для исследования послужили образцы ротовой жидкости и выделенные из них иммуноглобулины класса А 27 пациентов с хроническим простым периодонтитом и 27 образцов IgA от группы здоровых лиц (контроль).

Для выделения IgA из ротовой жидкости применялась методика аффинной хроматогра-

фии на сефарозе, конъюгированной с антителами против общих IgA человека.

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

Полученный после этого препарат подвергали аффинной хроматографии на сефарозе, конъюгированной с антителами против общих IgA человека, уравновешенной буфером для сорбции. Для этого использовали 0,1 М фосфатный буфер (ФБР), pH 7,4. Колонки отмывали до полного исчезновения белка в элюенте.

С матрицы, конъюгированной с антииммуноглобулином, элюцию проводили 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 2,6-2,8. Отбирали аликвоты, содержащие максимальное количество белка. Такие пробы объединяли. Их нейтрализовали 3 М раствором Трис, pH 9,0 до pH 7,0-7,5.

Пробы диализовали против изотонического раствора хлорида натрия. Концентрацию белка после диализа определяли спектрофотометрией при 280 нм. Препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках хранили в морозильнике при -20°C.

Проведенный дальнейший иммунохимический и электрофоретический анализ образцов IgA подтвердил их гомогенность.

Качественное определение ИГ различных классов в образцах проводили иммунодиффузией по Оухтерлони. По результатам иммунодиффузии обнаружена одна полоса преципитации, соответствующая IgA.

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

Для выявления абзимной активности в образцах иммуноглобулинов класса А нами была проведена адаптация способов определения ферментативной ДНКазной, перокси-



Рисунок 1 – Электрофорез препаратов IgA в ПАГ: треки 1, 3, 4, 5, 6 – препараты иммуноглобулинов А в различных концентрациях, выделенные из различных образцов ротовой жидкости; трек 2 – свободный контрольный трек без образца клинического материала.

дазной, каталазной и протеолитической активности.

Определение ДНКазной активности IgA проводили по методу предупреждения образования риванолового сгустка с оценкой результатов по балльной шкале (от 0 до 5 баллов, где 5 баллам соответствует максимальная активность) [8].

Дополнительно ДНКазную активность IgA подтверждали методом гидролиза синтетических ДНК-субстратов (ампликонов) с анализом продуктов гидролиза электрофорезом в агарозе с окраской бромидом этидия.

В качестве модельного субстрата для оценки гидролиза ДНК использовали ампликоны внутреннего контрольного образца (ВКО) из тест-системы для обнаружения ДНК *S. trachomatis* производства «Амплисенс», Россия. ВКО в данной тест-системе – это модифицированный, исходно клонированный в плазмиде фрагмент ДНК *S. trachomatis*, фланкированный специфическими праймерами СТ-1 и СТ-2, выбранными в области генома криптической плазмиды возбудителя. Ампли-

фицируемые фрагменты (ампликоны) ДНК внутреннего контрольного образца имеют стандартную величину в 630 п.н. и поэтому удобны для анализа минимальных изменений в структуре ДНК.

Аmplификацию ВКО в ПЦР проводили согласно инструкции фирмы-производителя в амплификаторе «Махугене» (ФРГ).

По окончании амплификации к ампликонам (субстрату) добавляли образец IgA с каталитической ДНКазной активностью. Инкубировали при 37°C в течение 20 ч. Электрофорез продуктов реакции проводили в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере pH 8,3, содержащем 1 мкг/мл этидия бромид. Реакцию учитывали и фотографировали на трансиллюминаторе UVT-1.

Колориметрические варианты других методик модифицировались с целью одномоментного определения ферментативной активности значительного количества образцов. Для этого они были адаптированы к регистрации на отечественном планшетном фотометре Ф300 производства РУП «Витязь», Витебск, Республика Беларусь.

Пероксидазную активность IgA определяли, используя в качестве субстратов пероксид водорода и хромоген тетраметилбензидин. Каталазную активность IgA оценивали по распаду перекиси водорода в реакции с молибдатом аммония.

Оценку протеолитического действия IgA выполняли по гидролизу ряда синтетических субстратов-нитроанилидов, специфичных к различным видам протеолитической активности. Для этого применяли бензоил-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА), субстрат гранулоцитарной эластазы Glp-Pro-Val-p-нитроанилид, субстрат катепсина G N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилид, субстрат катепсина C Gly-Phe-p-нитроанилид, субстрат катепсина B Z-Arg-Arg-p-нитроанилид.

Реакции ставили в полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа. Учет проводили на многоканальном фотометре Ф300. Полученные результаты определения абзимной активности выражали в условных единицах (Ед), соответствующих единицам оптической плотности.

Дополнительно с применением данных методов изучали ДНКазную, протеолитическую, пероксидазную и каталазную актив-

ность ротовой жидкости пациентов и лиц контрольной группы, которая служила источником выделения поликлональных IgA.

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. Корреляцию между признаками определяли по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Нам удалось впервые установить, что в препаратах поликлональных IgA, выделенных из ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом, а также здоровых лиц, обнаруживается достоверная пероксидазная, каталазная, протеолитическая (эластазная, катепсиноподобная) и ДНКазная абзимная активность.

Наличие собственной ДНКазной активности IgA было подтверждено методом электрофореза (рис. 2).

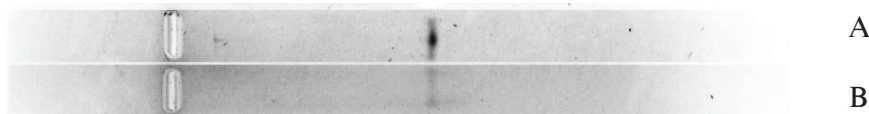


Рисунок 2 – Гидролиз ДНК-ампиконов под действием IgA: А – контрольный трек ДНК *S. trachomatis* без IgA, В – изменение субстратной ДНК под действием абзимных IgA с активностью 4 балла по методу риванолового сгустка.

Из данных эксперимента следует, что абзимные IgA вызывают снижение количества ДНК в полосе субстратного ампликона. При этом ДНКазная активность избранного образца IgA составляла 4 балла по методу риванолового сгустка, что было установлено предварительно. Образцы с более высокой активностью приводили к полному исчезновению полосы ДНК ампликона *S. trachomatis*.

При сравнении нуклеазной активности IgA пациентов и здоровых лиц было установлено, что ДНКазная абзимная активность при хроническом периодонтите в среднем была выше, чем в контрольной группе (1,0 (0,5:1,5) Ед к 0,5 (0,0:1,5) Ед, $n=27$), однако различия были недостоверными ($p=0,2$).

При оценке протеолитической активности БАПНА-амидазная активность всех образцов IgA была минимальной. При этом отличий БАПНА-амидазной активности IgA у больных и здоровых лиц обнаружить не удалось ($p=0,75$).

Вследствие этого нами были проведены дополнительные исследования эластазной и катепсиноподобной активности выделенных препаратов IgA. Предварительный анализ данных видов протеолитической активности обнаружил, что наибольшую удельную активность проявляют IgA с эластазной активностью, специфическим субстратом для которых является трипептид Glp-Pro-Val-р-нитроанилид.

При сравнении величин абзимной активности IgA пациентов и здоровых лиц оказалось, что эластазная абзимная активность пациентов была значительно выше, чем у здоровых (0,183 (0,038:0,359) к 0,067 (0,03:0,261) Ед, $n=18$) однако различие между группами было недостоверным, в первую очередь, из-за выраженной вариабельности данных внутри группы пациентов.

Уровень активности IgA в отношении

еще одного специфического субстрата для гранулоцитарных сериновых протеаз (фермента катепсина G) был также достаточно высоким и при этом сходным в группе пациентов и группе контроля [0,035 (0,016:0,069) к 0,049 (0,033:0,161) Ед, соответственно; $n=18$, $p=0,24$].

Уровни активности в отношении субстратов цистеиновых протеиназ (катепсина В

и С) были невысокими. Для обнаружения катепсин В- и катепсин С-подобной активности IgA потребовалась 20 ч инкубация абзим-субстратной смеси, при этом полученные значения в опытных и контрольных группах были минимальными; обнаружены лишь единичные положительные пробы.

Кроме того, при анализе величин абзимной активности IgA оказалось, что удельная протеолитическая и ДНКазная активность (в пересчете на концентрацию 1 мг/мл абзима), выявленная в отдельных образцах IgA, может превышать ранее установленную удельную каталитическую активность IgG по крайней мере от 5 до 10 раз. Это подтверждает возможность активного участия IgA в патогенезе и/или саногенезе самых различных иммуноспалительных заболеваний, включая патологию ротовой полости.

При сравнительной оценке различных видов протеолитической активности ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом и лиц контрольной группы было установлено, что с развитием заболевания резко усиливается ее эластазная активность.

В частности, при инкубации в течение 2 ч гранулоцитарная эластазная активность ротовой жидкости пациентов составила 0,219 Ед (0,041:0,777) в сравнении с 0,001 Ед (0:0,028) активности ротовой жидкости здоровых лиц (n=18, p<0,001).

Сходным образом оказалась повышенной активность катепсина В гранулоцитов [0,204 Ед (0,083:0,506) к 0,09 Ед (0,040:0,12); n=18, p=0,013] при инкубации ферментно-субстратной смеси в течение 20 ч.

Сравнительно высокой оказалась активность катепсина G ротовой жидкости, причем она обнаруживалась сходным образом как у больных, так и здоровых лиц [0,161 Ед (0,032:0,319) и 0,166 Ед (0,119:0,278), соответственно, n=18, p>0,05].

Активность катепсина С ротовой жидкости была незначительной и не отличалась достоверно у пациентов и здоровых.

В отличие от абзимной амидазной активности БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости пациентов также была достоверно выше активности, выявленной в контрольной группе (0,227 (0,154:0,388) к 0,110 (0,01:0,209) Ед, p<0,001).

Окислительно-восстановительная актив-

ность ротовой жидкости, как и выделенных из нее абзимов класса IgA, также оказалась существенно более высокой при патологии, чем в группе здоровых.

В частности, при сравнении величин пероксидазной абзимной активности IgA пациентов и здоровых лиц оказалось, что данная активность пациентов была достоверно и значительно выше, чем у здоровых лиц (0,399 Ед (0,134:1,06) к 0,073 Ед (0,023:0,192); n=27, p<0,001).

Сходным образом пероксидазная активность ротовой жидкости пациентов также существенно (более чем в 5 раз) превышала таковую у здоровых (0,67 (0,184:0,873) к 0,093 (0,041:0,267) Ед; n=27), при этом отличия были также высокодостоверными (p<0,001).

Аналогичные результаты были продемонстрированы и для каталазной активности в ротовой жидкости [0,90 Ед (0,65:0,95) к 0,13 Ед (0,66:0,54); n=27, p<0,001]. Однако достоверных различий уровней каталазных IgA между больными и здоровыми установлено не было.

ДНКазная абзимная активность ротовой жидкости пациентов в среднем была выше, чем у здоровых (4,0 Ед (3,0:5,0) к 3,5 Ед (1,5:5,0)), однако различия также были недостоверными (p=0,19).

Таким образом, проведенное исследование ферментативной активности ротовой жидкости выявило достоверное повышение активности ряда ферментов (пероксидазы, гранулоцитарной эластазы, катепсина В) у пациентов с хроническим периодонтитом в сравнении со здоровыми лицами. Данные показатели могут изучаться в дальнейшем как дополнительные лабораторные критерии диагностики степени тяжести или течения хронического периодонтита.

Заключение

1. Впервые обнаружена собственная каталитическая ДНКазная, пероксидазная, каталазная, катепсиноподобная и эластазная активности IgA ротовой полости.

2. Определение оксидоредуктазной, амидазной и эластазной активности ротовой жидкости может служить дополнительным лабораторным признаком развития хронического периодонтита.

Литература

1. Генералов, И. И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И. И. Генералов. – Витебск, 2000. – 105 с.
2. Каталитические аутоантитела как новый молекулярный инструмент в ревматоидной практике / А. Г. Габитов [и др.] // Терапевтический архив. – 2006. – № 6. – С. 59-66.
3. Catalytic Antibodies / ed. E. Keinan. – Wiley-Vch Verlag, 2005. – 578 p.
4. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis / S. Lacroix-Desmazes [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005 Mar. – Vol. 102, N 1. – P. 4109-4113.
5. Невинский, Г. А. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г. А. Невинский, Т. Г. Канышкова, В. Н. Бунева // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 11. – С. 1245-1255.
6. Иммунологические методы / под ред. Г. Фриделя. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
7. Naturally occurring catalytic antibodies: evidence for preferred development of the catalytic function in IgA class antibodies / Y. Mitsuda [et al.] // Mol. Biotechnol. – 2007 Jun. – Vol. 36, N 2. – P. 113-122.
8. Генералова, А. Г. Оценка ДНКазной активности методом риванолового сгустка / А. Г. Генералова, И. И. Генералов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 11. – С. 24-34.

Поступила 26.09.2014 г.

Принята в печать 07.10.2014 г.

Сведения об авторах:

Генералов И.И. - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Коротина О.Л. - аспирант кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Тихонова С.Ф. - студентка 1 курса лечебного факультета УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Генералова А.Г. - к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Железняк Н.В. - к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической микробиологии. E-mail: g2@tut.by – Генералов Игорь Иванович.