

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА А

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский
университет, Беларусь*

В настоящее время моноклональные и поликлональные антитела (АТ), проявляющие собственную каталитическую активность, являются предметом углубленного изучения в иммунологии, биохимии, генной инженерии, биотехнологии и медицине [1].

До сих пор основные исследования абзимной активности проводились на иммуноглобулинах (ИГ) класса G, что определяется возможностью быстрого получения высокоочищенных препаратов IgG с применением недорогих аффинных матриц (сорбенты с протеином А или G). Активность же иммуноглобулинов других классов изучена пока недостаточно. Данное положение относится и к поликлональным ИГ класса А, несмотря на то, что общее количество IgA в организме сопоставимо с содержанием IgG.

В данной работе изучены особенности IgA-зависимых каталитических реакций. **Целью** исследования явилось определение оксидоредуктазной, протеолитической и нуклеазной активности IgA.

Материалы и методы

В работе были использованы ДНК тимуса теленка, тетраметилбензидин (ТМБ), пероксид водорода, субстраты для определения протеолитической активности (эластазной, катепсиноподобной, амидазной) Z-Arg-Arg-p-нитроанилид, Glp-Pro-Val-p-нитроанилид, N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилид, Gly-Phe-p-нитроанилид, бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилид (БАПНА), агароза, конъюгированная с антителами против IgA человека, реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ).

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 группы лиц без патологии периодонта.

Очистка поликлональных IgA из сыворотки и ротовой жидкости проводилась с помощью аффинной хроматографии на агарозе, конъюгированной с антителами против тяжелой цепи общих IgA человека. Различные виды абзимной активности определяли, как описано в [2]. 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.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакетов прикладных статистических программ.

Результаты и обсуждение

По данным электрофореза в ПАГ была установлена гомогенность выделенных препаратов IgA.

Эксперименты по определению абзимной активности показали, что высокая каталитическая эффективность характерна для IgA с пероксидазным, ДНКазным и эластазным действием, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом. Меньшая каталитическая эффективность установлена для абзимов с активностью катепсина G, минимальная — для амидазных ИГ.

Обнаружено, что кинетика абзимного протеолиза имеет линейный характер, что типично 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.

Было изучено влияние pH на основные типы реакций, катализируемых абзимами. Обнаружено, что изученный IgA-образец с активностью катепсина G имеет один оптимум pH в щелочной зоне, что характерно для сериновых протеаз. Другие результаты получены для препаратов IgA с эластазной и пероксидазной активностью. Были обнаружены 2 максимума pH в слабокислой (pH 6,0) и щелочной зонах, что не соответствует активности природных эластаз. При удлинении времени реакции до 24 часов максимум pH в слабокислой среде обозначился еще более выражено. Аналогичная зависимость была установлена нами и для образца IgA с пероксидазной активностью — реакция имела 2 явных оптимума при pH 5,0 и 7,0. Эти данные 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 активности и условиям протекания реакций.

Далее была выполнена сравнительная характеристика абзимной активности IgA, выделенных из ротовой жидкости и сыворотки крови.

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 во 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. 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.

Выводы:

1. 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 слабокислой и щелочной зонах.

2. 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Невинский, Г. А.* Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г. А. Невинский, Т. Г. Канышкова, В. Н. Бунева // Биохимия. 2000. № 65(11). С. 1245–1255.
2. *Абзимная* активность поликлональных иммуноглобулинов класса А / И. И. Генералов [и др.] // Вестник ВГМУ. 2014. № 13(4). С. 42–47.

Generalov I. I., Korotina O. L.

Catalytic activity of polyclonal immunoglobulins of IGA class

It has been found that human polyclonal IgAs expose the evident peroxidase, elastase, cathepsin-like and DNase abzyme activities with variable catalytic functions. IgAs isolated from oral fluids of patients with chronic periodontitis demonstrate elastase, peroxidase and DNase activities that is significantly ($p < 0.01-0.001$) higher than the levels of oral IgA abzymes of healthy persons and serum abzymes of patients with systemic lupus erythemathosus (SLE).