

И.И.ГЕНЕРАЛОВ,  
Е.В.СИДОРСКАЯ,  
А.Г.ГЕНЕРАЛОВА,  
И.В.ЖИЛЬЦОВ, Н.Н.ОГРЫЗКО,  
Л.А.АДАМОВИЧ  
Витебский государственный  
медицинский университет,  
Витебск

УДК 616-097-034

## УСИЛЕНИЕ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IGG ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КАТИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

В работе изучено модулирующее воздействие катионов различных металлов - Mg(II), Ca(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II) - на абзимную активность препаратов IgG, выделенных из сыворотки больных и здоровых лиц. Изучалась БАПНА-амидазная, ДНКазная, гиалуронидазная и пероксидазная абзимная активность IgG. Было выявлено, что ДНКазная активность в наибольшей степени зависит от активирующего воздействия катионов металлов. В меньшей степени это касается пероксидазной и гиалуронидазной активности. Достоверного влияния катионов на БАПНА-амидазную активность обнаружено не было.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** поликлональные IgG человека, абзимная активность, катионы металлов.

## MODULATION OF POLYCLONAL IgG ABZYME ACTIVITIES BY INTERACTION WITH METAL CATIONS

I.I.GENERALOV, E.V.SYDORSKAYA, A.G.GENERALOVA, I.V.ZHYLTSOV,  
N.N.OGRYZKO, L.A.ADAMOVITCH  
Vitebsk Medical University, Belarus

The modulation of human polyclonal IgG abzyme activity by different metal cations -Mg(II), Ca(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II) - was investigated. We studied DNase, hyaluronidase, peroxidase and BAPNA-amidase catalytic activities. It was found that DNase abzyme activity was depend strongly on metal cation activation. Hyaluronidase and peroxidase activities were less connected with metal cations. And we did not found an influence of metal cations on BAPNA-amidase abzyme activity.

**KEY WORDS:** human polyclonal IgG, abzyme activity, metal cations.

В последнее время интенсивно изучается новая функция антител (АТ) и иммуноглобулинов (ИГ) - их способность ускорять различные биохимические превращения. Выяснилось, что в определенных условиях ИГ могут выступать в роли биологических катализаторов. Такие ИГ получили название абзимов (от англ. abzyme = antibody+enzyme), а проявляемая ими активность была

названа абзимной. Многочисленными исследованиями на моноклональных АТ были изучены основные принципы и закономерности абзимного катализа. Было показано, что данная активность АТ может возникать как в результате искусственной иммунизации, аутоиммунных процессов, так и в результате генно-инженерной модификации активных центров ИГ, в том числе приводящих

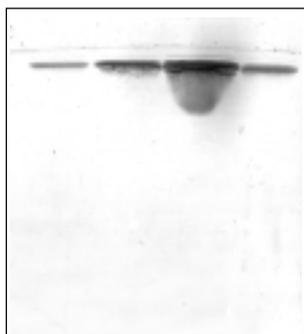
к связыванию в активном центре различных кофакторов (главным образом - катионов металлов (3).

Однако постепенно накапливались данные, доказывающие, что каталитические АТ возникают не только в условиях эксперимента, но и в ходе реального поликлонального иммунного ответа на антиген или при развитии аутоиммунного заболевания. Спектр катализируемых реакций оказался весьма широким (протеолиз, оксидоредуктазная активность, гиалуронидазная активность, ДНК-азная и РНК-азная активность, протеинкиназная активность и т.д. (3).

Тем не менее, за исключением единичных работ (1,4,6), до сих пор не изучалось действие кофакторов на абзимную активность поликлональных ИГ, возникающую в норме и при патологических состояниях. Особенно важным представляется изучение комплексов ИГ с катионами металлов. Катионы металлов весьма часто являются индукторами или модуляторами ферментативной активности. Отсюда задачей нашего исследования явилось изменение абзимной активности поликлональных IgG под влиянием катионов металлов.

**Материалы и методы.** *Нами была изучена абзимная активность поликлональных IgG, выделенных из сыворотки крови больных ревматоидным артритом, аутоиммунным тиреоидитом, бронхиальной астмой, раком желудка и толстого кишечника, гастритом, язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки (всего более 350 препаратов).*

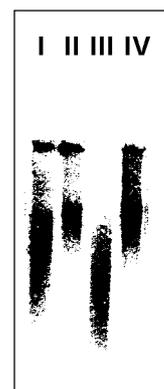
*Были отобраны образцы, проявляющие абзимную гиалуронидазную, ДНКазную, БАПНА-амидазную (как аналог протеолитической) и оксидоредуктазную (пероксидазную) активность. Очистку и контроль чистоты полученных препаратов проводили как описано в (5, 7). Результаты электрофореза (по методике Laemmli (7) без 2-меркаптоэтанола) различных каталитически активных препаратов IgG представлены на Рис.1. Наличие гиалуронидазной активности ИГ было подтверждено методом гель-фильтрации продуктов распада на матрице Toyopearl HW 75, а ДНКазная абзимная активность была доказана электрофорезом продуктов деградации ДНК в агарозе (Рис.2).*



**РИС. 1.**  
*Электрофорез различных образцов IgG, обладающих абзимной активностью, окраска нитратом серебра.*

**РИС. 2.**  
*Агарозный электрофорез продуктов распада ДНК под действием IgG с абзимной активностью*

- I** — Инкубация в течение 24 ч (опыт)
- II** — Контроль (24 ч)
- III** — Инкубация в течение 48 ч (опыт)
- IV** — Контроль (48 ч)



К образцам с абзимной активностью добавляли катионы металлов (Ca (II), Mg (II), Mn, Cu (II), Zn (II), Ni (II) в исходной концентрации  $10^{-4}$ М и исследовали изменения каталитической активности.

Гиалуронидазную, ДНКазную, БАПНА-амидазную пероксидазную активность препаратов IgG определяли разработанными нами методами (2, 5). Модификации заключались в том, что время инкубации для определения ДНКазной активности сократили с 20 до 2 ч, а пероксидазной - до 4 часов с оценкой последней реакции при помощи мультискана АИФ Ц01С (методика N11). В буферный раствор для реакции (0.02-0.05М трис-НСl буфер, рН 7.4) вводили катионы (хлориды или сульфаты) в вышеуказанной концентрации и инкубировали с ИГ и субстратом.

Результаты определения абзимной активности, полученные в единицах оптической плотности, в дальнейшем выражали следующим образом: для ДНКазной и гиалуронидазной активности формула расчета активности препарата ИГ выглядела как:

$$A(E_d) = (E_k - E_o) \times 100\% / E_k,$$

а для БАПНА-амидазной и пероксидазной активностей —

$$A(E_d) = E_o - E_k,$$

где  $A(E_d)$  - активность,

$E_k$  - средняя оптическая плотность контрольных проб,

$E_o$  - средняя оптическая плотность опытных проб.

В контрольных пробах оценивали спонтанный распад субстрата (контроль буфера), распад под действием ИГ без катионов (контроль ИГ) и распад под действием самих катионов (контроль металлов).

### Результаты и обсуждение

Нами было показано, что катионы металлов оказывают существенное влияние на каталитическую активность препаратов IgG. Наиболее высокой удельной каталитической активностью обладают IgG, проявляющие ДНКазную абзимную активность. Здесь же наиболее выражено активирующее действие катионов металлов.

Далее следуют пероксидазная активность, а затем гиалуронидазная и БАПНА-амидазная. Последние менее подвержена модулирующему действию катионов.

Были обнаружены определенные закономерности во взаимодействии абзимов с катионами металлов.

Получено, что ДНКазная активность в большинстве случаев активируется марганцем и магнием, затем кальцием и медью (в некоторых пробах - более чем на 70% от исходной), однако нами обнаружены отдельные IgG, активируемые катионами цинка и никеля. Здесь следует отметить следующее обстоятельство: Zn-зависимая ДНКазная активность была обнаружена у всех отобранных больных с эндокринной патологией (9 из 9 обследованных), редко выявлялась при диффузных болезнях соединительной ткани - ревматоидном артрите (2 из 9) и не обнаруживалась при других изученных видах патологии. Разность по частоте встречаемости этого признака была высоко достоверна ( $p < 0.001$ ). Данный факт требует дальней-

шего тщательного изучения с увеличением объема выборки.

Пероксидазная активность стимулируется катионами меди (II), однако стимулирующим действием обладают и катионы магния, особенно в пробах с невысокой исходной активностью. Кроме того, ионы Cu (II) вызывают значительный спонтанный распад субстрата. Катионы же магния ускоряют распад перекиси водорода только совместно с абзимами.

Гиалуронидазная активность абзимов весьма слабая, тем не менее она может быть активирована марганцем, цинком, кальцием.

БАПНА-амидазная активность ИГ наиболее переменчива. Амидазная активность части проб мало менялась под действием катионов металлов. Можно отметить действие катионов кальция и цинка, активирующих катионы с наибольшей частотой.

Результаты наших экспериментов представлены в таблице 1 и на диаграмме (Рис.3).

Таблица 1

Частоты ускорения абзимных реакций под действием различных катионов металлов (в процентах).

Катионы	Гиалуронидазная активность	ДНКазная активность	БАПНА-амидазная активность	Пероксидазная активность
Без катионов	17.02	12.9	20.0	15.38
Ca	14.89	13.9	32.0	-
Cu	10.64	12.9	8.0	30.77
Mg	8.51	20.7	8.0	38.46
Mn	21.28	21.78	4.0	7.69
Zn	19.15	10.89	24.0	7.69
Ni	8.51	6.93	4.0	-

**Примечание:** При оценке не учитывались препараты, абзимная активность которых была обусловлена только IgG и не зависела от изученных катионов металлов.

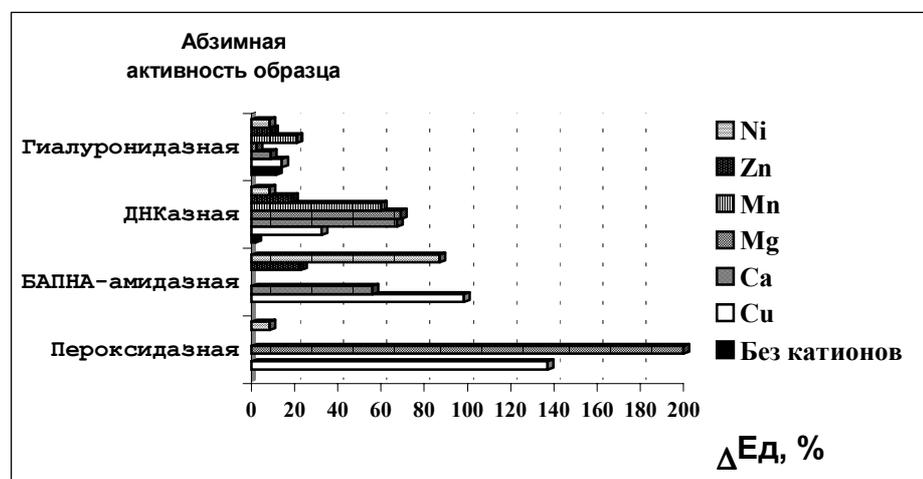


РИС.3

Увеличение каталитической активности различных препаратов IgG при взаимодействии с катионами металлов

**Примечание:** По горизонтальной оси представлено ускорение абзимной реакции (в процентах) в сравнении с контрольным распадом субстратов (соответствует нулевой линии).

В целом мы пришли к заключению, что абзимная активность IgG, выделенная от конкретного больного, может не совпадать с активностью другого препарата IgG, даже выделенного от больного с такой же патологией и в схожие сроки от начала заболевания. Не совпадает в этом случае и активирующее действие кати-

онов на такие IgG. Одна и та же абзимная активность IgG может быть активирована разными катионами у разных больных. Это представляется существенным, так как подобные АТ могут быть маркерами индивидуального течения заболевания, его вариантов и могут по-разному участвовать в патогенезе болезни.

#### Литература:

1. Андриевская О.А., Бунева В.Н., Забара В.Г., Наумов В.А., Ямковой В.И., Невинский Г.А. Иммуноглобулины класса М из сыворотки крови больных системной красной волчанкой эффективно расщепляют РНК // Мол. биол. - 1998. - Т.32, №5. - С.908-915.
2. 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.
3. Генералов И.И., Новиков Д.К. Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение // Усп. совр. биол. - 1998. - Т.118, вып.2. - С.178-193.
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. Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Власов А.В., Хлиманков Д.Ю., Барановский А.Г., Шипицын М.В., Ямковой В.И., Бунева В.Н., Невинский Г.А. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из молока человека и их возможная биологическая роль // Мол. биол. - 1997. - Т.31, №6. - С.1082-1091.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981.