

УДК 577.155.2

Юрій КИТ

КАТАЛІТИЧНО АКТИВНІ АНТИТІЛА (НАТУРАЛЬНІ АБЗИМИ) В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

*Інститут біології клітини НАН України, вул Драгоманова 14/16, Львів, 79005, Україна
Електронна пошта: kit@cellbiol.lviv.ua*

Узагальнено дані літератури щодо каталітично активних антитіл (абзимів) сироватки крові та молока людини, виявлених в нормі та при деяких патологіях. Розглянуто їхню можливу біологічну активність в організмі людини.

Ключові слова: сироватка крові, молоко людини, каталітично активні антитіла.

Аналізуючи результати досліджень особливостей утворення комплексів антиген-антитіло та ензим-субстрат, Л. Полінг у 1948 р. вперше дійшов до висновку, що антитіла, подібно до ензимів, за певних умов можуть каталізувати хімічні реакції [1]. Ідея отримання антитіл із каталітичною активністю шляхом імунізації тварин іммобілізованими на носії гаптенами – стабільними аналогами перехідних станів хімічних реакцій – належить Б. Дженксу [2] і вперше експериментально підтвердили в 1986 р. дві групи дослідників під керівництвом Р. Лернера [3] та П. Шульца [4]. Одержані ними антитіла володіли здатністю пришвидшувати у 1000 разів гідроліз складних ефірів, тому їх назвали “каталітично активні антитіла” або “абзими”. Шляхом скерованої імунізації тварин у поєднанні з технологією моноклональних антитіл було отримано абзими, здатні каталізувати понад 100 хімічних реакцій [6]. Усе це дало підставу стверджувати про формування нової біологічної дисципліни – абзимології.

Новий стимул у розвиток абзимології привнесли у 1989 р., коли група С. Пола виділила із сироватки крові хворих на бронхіальну астму антитіла, здатні гідролізувати вазоактивний інтестинальний нейропептид (VIP). [7]. Протягом наступних років з'ясували що при багатьох захворюваннях (автоімунних, вірусних, онкологічних) в організмі людей продукуються антитіла, які гідролізують пептиди та білки, ДНК, РНК та полісахариди (див. [8–11]). Такі каталітично активні антитіла назвали “природними” або “натуральними” абзимами. Оскільки в організмі клінічно здорових людей абзимів не було виявлено, то висловлено припущення, що їхня продукція тісно пов'язана саме з патологічними процесами. Питання про існування природних абзимів в організмі в нормі виникло після того, як було показано, що в молозиві та молоці клінічно здорових жінок є секреторні імуноглобуліни класу А (sIgA), здатні каталізувати фосфорилування казеїну [12]. Упродовж наступних років у молозиві та молоці людини виявили АТ різних ізотипів, які гідролізують

ДНК [13 – 16], РНК [17, 18], нуклеотиди [19], білки [20 – 21] та полісахариди [22], а також фосфорилують білки [23 – 25], ліпіди [26 – 29] та полісахариди [30].

У наступних дослідженнях було з'ясовано, що натуральні абзими також у сироватці крові клінічно здорових людей [31 – 36]. Каталітична активність цих абзимів спрямована на гідроліз чужорідних та аутологічних антигенів [34 – 36].

Як уже згадувалось, здатність каталізувати реакцію взаємодії радикала кисню із водою, що призводить до утворення пероксиду водню та озону, є властивістю всіх класів імуноглобулінів ссавців. Ця активність не залежить від антигенної специфічності антитіл та їхнього походження і визначається амінокислотними залишками триптофану (Trp 36 і Trp37), який є у конститутивній частині 99 % усіх імуноглобулінів [37 – 39]. Подібну каталітичну активність було також виявлено у деяких білків неімуноглобулінової природи – бета-галактозидази та овальбуміну курячого яйця [38, 39]. Оскільки у каталізі не задіяні варіабельні ділянки, то оксидоредуктазна активність імуноглобулінів, на думку деяких дослідників, не є функцією абзимів.

Інший тип каталітичної активності антитіл сироватки крові клінічно здорових донорів – їхня здатність каталізувати гідроліз білкових антигенів за механізмом, подібним до дії серинових протеїназ [9, 10]. Оскільки у каталізі задіяні варіабельні ділянки антитіл, структура яких кодується недиференційованими формами генів імуноглобулінів, то ці абзими за своєю природою є поліреактивними авто-АТ. Абзими, виявлені в нормі, належать до класу IgM і здатні гідролізувати білкові та вірусні суперантигени: білок gp120, оболонки вірусу ВІЛ та протеїн А оболонки бактерії *S. aureus* [34, 35]. Крім того виявили, що IgM і IgG сироватки крові людей похилого віку можуть гідролізувати нейротоксичний бета-амілоїдний пептид, задіяний у розвитку хвороби Альцгеймера. Згідно з цими даними абзими, виявлені у клінічно здорових людей, виконують в організмі захисну функцію [36].

Абзими, які володіють протеїнказнаю активністю. Здатність антитіл каталізувати фосфорилування білків вперше ми описали в 1991 р. [40]. При дослідженні протеїнказнаю активності молока клінічно здорових жінок виявили, що електрофоретично гомогенні sIgA фосфорилують казеїн молока людини по залишках серину. Ця праця стала основою для проведення наступних досліджень абзимів молока людини. Головною проблемою під час вивчення натуральних абзимів є те, що в організмі людини також існують ензими з аналогічною каталітичною активністю, тому існує вірогідність забруднення ними препаратів АТ. Для отримання АТ із необхідною чистотою було розроблено відповідні схеми очищення [23, 24, 40], які з певними модифікаціями використовують дотепер. Ці охоплюють багато основних афінних і іонообмінних хроматографій та гель-фільтрацій.

В основу виділення sIgA-абзимів покладено їхню значно вищу спорідненість до протеїну А-сефарози каталітично активної фракції sIgA порівняно з каталітично неактивними АТ цього ж класу [24, 40]. Встановлено, що лише 5–10 % від загальної кількості sIgA молока людини володіють такою ж властивістю, що суттєво полегшує їхнє виділення. Очищені на протеїн А-сефарозі препарати АТ молока здебільшого склалися із sIgA з домішками невеликої кількості IgG, які потім легко розділяли іонообмінною хроматографією на DEAE-сорбенті. На наступній стадії очищення електрофоретично гомогенні препарати sIgA піддавали хроматографії на сорбентах із іммобілізованими на них субстратами протеїнказнаю реакції – АТР-сефарозі та казеїн-сефарозі. Варто зазначити, що афінна хроматографія на сорбентах із іммобілізованими субстратами ензиматичних реакцій є ефективним методич-

ним підходом, який дає змогу, по-перше, отримати препарати каталітичних АТ із високою питомою активністю; по-друге, визначити рівень спорідненості абзимів до субстратів реакції. Афінною хроматографією отримали фракції sIgA із високою спорідненістю до казеїну та АТР, які володіли протеїнказнаю активністю. Для визначення локалізації каталітичного центру на молекулі каталітично активних sIgA ми застосували метод афінної модифікації молекул sIgA. Він допомагає не лише з'ясувати, які саме поліпептиди залучені до каталізу, але й виявити можливі домішки протеїнкази у препаратах АТ. Як афінні модифікатори ми використовували два реакційно здатні аналоги АТР – діальдегідне похідне [α - 32 P]АТР (оксоАТР), та алкілююче похідне [α - 32 P]АТР (RCl-АТР) [11, 12]. З'ясовано, що в молекулі sIgA ковалентно модифікуються лише легкі (у випадку оксоАТР), або одночасно важкі і легкі (у випадку RCl-АТР) ланцюги молекули sIgA. Оскільки інших білків, які б ковалентно модифікувалися алкілюючими похідними АТР, у препаратах каталітично активних sIgA не виявлено, то зроблено висновок про те, що протеїнказна активність властива саме молекулам sIgA, і не є наслідком забруднення препаратів АТ протеїнказами. Високу спорідненість легкого ланцюга sIgA до АТР було також підтверджено афінною хроматографією sIgA-абзимів на АТР-сефарозі за умов дисоціації поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів [166, 172].

У наступних працях було з'ясовано, що крім казеїну, IgA-абзими можуть фосфорилувати й інші білки молока, а також, за певних умов, здатні до автофосфорилування [23 – 25]. Дещо неочікувані результати було отримано, коли донором фосфату в реакції фосфорилування слугували інші нуклеотидтрифосфати. З'ясовано, що всі пуринові та піримідинові нуклеотидтрифосфати є субстратами протеїнказнаю активності sIgA-абзимів [24]. Це свідчить про унікальні властивості абзимів, які, на відміну від протеїнкази, використовують як донор фосфату АТР і лише деякі з них – GTP. Отже, sIgA-абзими можна класифікувати як протеїнкази, які володіють багатосубстратною специфічністю і властивості яких суттєво відрізняються від властивостей інших протеїнкази. Крім препаратів sIgA молока людини, казеїнказну активність також ми виявили в електрофоретично гомогенних препаратах мономерного IgA, очищеного з плазми крові клінічно здорових людей [33].

Абзими, які володіють ліпідкізнаю активністю. Ліпідкізнаю активність sIgA вперше було виявлено під час аналізу продуктів фосфорилування фракцій sIgA, отриманих хроматографією на протеїн А-сефарозі [26, 27]. Мічені радіоактивним фосфором продукти екстрагували з реакційної суміші розчином хлороформ-метанол і розділяли на три фракції тонкошаровою хроматографією у системі, запропонованій для аналізу фосfolіпідів. З'ясовано, що ліпіди є в комплексі з sIgA-абзимами, який не руйнується в процесі очищення АТ афінною та іонообмінною хроматографією, а також гель-фільтрацією в ізотонічних буферних системах. Гель-фільтрація у присутності 5 % діоксану веде до дисоціації комплексів і втрати ліпідкізнаю активності препаратами sIgA. Фосфорильовані ліпіди гідролізувались під дією кислот, що свідчить про їхню складну будову [27]. Детальний аналіз будови цих ліпідів провели в лабораторії проф. Г. О. Невінського в Інституті хімічної біології та фундаментальної медицини СВ РАН [28, 29]. Для цього використали комбінований метод ензиматичної та хімічної деградації, який застосовують для аналізу гліколіпідів і гангліозидів, який охоплює їхню обробку нейрамінідазою, лужний метанольний гідроліз та окислення перйодатом. З'ясовано, що фосфо-

рильовані ліпіди, подібно до гангліозидів, містять сіалову кислоту, але, на відміну від них, не окислюються періодатом, що свідчить про відсутність у них цис-діольних зв'язків. Лужний метанольний гідроліз ефірних зв'язків фосфорильованих ліпідів призводив до утворення 4–5-ти хроматографічних фракцій на відміну від двох, у випадку гідролізу гангліозидів. Автори зробили висновок, що субстратами sIgA-абзимів молока є два мінорні гліколіпіди, до складу яких входить один залишок сіалової кислоти та 4 або 5 залишків жирних кислот. Залишається не з'ясованим, які саме залишки гліколіпідів залучені у фосфорилування. Аналіз субстратної специфічності ліпідкіназної активності виявив, що, подібно до протеїнкіназної активності, sIgA-абзими використовують, як донор фосфату, всі нуклеотидтрифосфати, а також неорганічний ортофосфат. Виявлено, що субстратами sIgA-абзимів молока людини можуть бути також оліго- та полісахариди [30]. Подібно до ліпідкіназної активності субстратами цієї реакції можуть бути різні нуклеотиди і навіть неорганічний ортофосфат. Грунтуючись на цих результатах, можна припустити, що фосфорилування гліколіпідів молока людини відбувається по залишках їхніх вуглеводних компонентів. На відміну від протеїнкіназної активності, яку виявили лише в sIgA, ліпідкіназною активністю можуть володіти також IgG молока людини [30].

Варто зазначити, що ліпідкіназну активність виявили і у фракції IgG, яку виділяли з сироватки крові хворих на системний червоний вовчак [41, 42]. Як і у випадку sIgA-абзимів молока людини, каталітично активні IgG виділяли за допомогою послідовних хроматографій на колонках із протеїн А-сефарозою, DEAE-фрактогелем та АТР-сефарозою. З'ясовано, що ліпідкіназна активність препаратів АТ молока та сироватки крові хворих на СЧВ мають багато спільних ознак. В обох випадках ліпіди співвиділяються з АТ у складі імунних комплексів, які володіють спорідненістю до АТР-сефарози. Продукти фосфорилування ліпідів екстрагують розчинами хлороформ:метанол і розділяють тонкошаровою хроматографією. Гель-фільтрація препаратів АТ у присутності 5 % діоксану руйнує комплекси АТ з ліпідами. Важливо зазначити, що руйнування комплексів ліпід-АТ стимулює процес автофосфорилування у присутності $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ sIgA-абзимів молока і IgG-абзимів плазми крові хворих на СЧВ.

Нуклеотид-гідролізуючі абзими. Нуклеотид-гідролізуючу активність АТ вперше виявили у sIgA [12], але найбільш детально її досліджено для IgG молока людини [19]. Для вивчення каталітичної активності препарати IgG виділяли з молока людини, використовуючи класичну схему, яка охоплювала хроматографію білків молока на колонках із протеїн А-сефарозою, DEAE-целюлозою, імобілізованими на сефарозі моноспецифічними антитілами до IgG людини та АТР-сефарозою. З'ясовано, що електрофоретично гомогенні IgG молока людини, а також їхні Fab-фрагменти здатні гідролізувати рибонуклеотид – дезоксирибонуклеотид-5'-моно-, два- та трифосфати. Для виявлення каталітично активних ділянок у складі молекули IgG автори, як і у випадку дослідження sIgA-абзимів, використали метод афінної модифікації молекул IgG алкілюючими аналогами радіоактивно міченого АТР. Визначено, що АТР-зв'язувальна ділянка є на легкому (L) ланцюзі молекули IgG. Для аналізу каталітичної активності абзимів розробили оригінальний метод визначення нуклеотид-гідролізуючої активності білків у поліакриламідному гелі після їхнього розділення електрофорезом за денатуруючих умов [19]. За допомогою цього методу виявлено, що нуклеотид-гідролізуючою активністю володіють цілісні молекули IgG-абзимів або їхні олігомерні форми. Редукція імуноглобулінів

із їхньою подальшою дисоціацією на важкі та легкі ланцюги призводить до втрати каталітичної активності. На підставі отриманих результатів зроблено висновок, що хоча АТР-з'язувальні ділянки розміщені на L-ланцюгу молекули IgG, H-ланцюги також потрібні для каталізу цієї реакції гідролізу. Аналіз термодинамічних та кінетичних параметрів цієї реакції за участю різних нуклеотидів засвідчив, що найнижча K_m становить 44 мкМ під час гідролізу АТР, а найвища ($K_m = 79$ мкМ) - dСТР. V_{max} для різних нуклеотидів змінюється від 0,57 мкМ/хв для dАТР до 1,1 мкМ/хв для СТР.

Протеїн-гідролізуючі антитіла (протабзими). Абзими, які володіють протеазною активністю, назвали протабзимами. Вперше протабзими, здатні гідролізувати інтестинальний вазоактивний пептид (VIP), виявили у 1989 р. група дослідників під керівництвом С. Пола у сироватці крові деяких хворих на астму. [6]. Ці ж дослідники розробили схему виділення протабзимів із сироватки крові та процедуру аналізу їхньої каталітичної активності. Ця процедура забезпечила такі вимоги: високу гомогенність препаратів імуноглобулінів, спорідненість антитіл до субстратів реакції, каталітичну активність Fab-фрагментів антитіл, здатність антитіл гідролізувати субстрат після їхнього розділення гель-фільтрацією за умов дисоціації імунних комплексів (рН-шок). У наступних дослідженнях з'ясували, що у сироватці крові хворих на автоімунні захворювання є протабзими високоспецифічні, щодо автоантигенів – субстратів їхньої каталітичної активності. За чутливістю до дії інгібіторів протабзими можна класифікувати як серинові протеази [10, 43]. У табл. 1. показано взаємозв'язок між типом автоімунного захворювання та субстратною специфічністю деяких протабзимів.

Важливим аспектом одержаних авторами даних є функціональна активність виявлених протабзимів. VIP складається із 28-ми амінокислотних залишків і його наявність виявлено в центральній і периферичній нервовій системі. У людини VIP є медіатором розслаблення гладкої мускулатури дихальних шляхів і його дефіцит в організмі приводить до спазму бронхів. Афінню хроматографією на колонці з імобілізованим VIP у двох із шести хворих на астму було виявлено АТ, які володіли здатністю гідролізувати цей нейропептид. З'ясовано, що гідроліз нейропептиду абзимами відбувається в ділянці Gln-Met. Забруднення препаратів АТ протеїназами було виключене, оскільки Fab-фрагменти цих IgG також гідролізували VIP.

Природа антигену, який призводить до індукції VIP-гідролізуючих абзимів, залишається ще не з'ясовано. Найбільш ймовірно, що таким АГ є ендогенний VIP, оскільки моноклональні АТ, отримані імунізацією тварин цим нейропептидом, аналогічно до IgG-абзимів сироватки крові хворих бронхіальною астмою також володіли подібною каталітичною активністю. Ця ж група дослідників виявила, що легкий ланцюг моноклональних АТ до VIP упізнає і гідролізує цей пептид. Шляхом сайт-направленого мутагенезу виявили, що заміна Ser і His в амінокислотній послідовності легкого ланцюга протеолітично активних АТ призводить до втрати їхньої каталітичної активності [49].

Іншим прикладом протеолітично активних АТ, пов'язаних із автоімунними захворюваннями людини, є тиреоглобулін-гідролізуючі абзими, виділені з сироватки крові хворих гострим автоімунним тироїдитом Хашимото [10, 44]. Використовуючи як субстрат радіоактивно мічений тиреоглобуліну, з'ясували, що гідроліз його абзимами призводить до утворення низькомолекулярних пептидів. Величина K_m цієї реакції мала наномольярний порядок концентрації тиреоглобуліну. Ці ж абзими

каталізували, хоч і з меншою швидкістю, гідроліз синтетичного субстрату – трипептид-метилкумарину.

Взаємозв'язок деяких автоімунних захворювань з субстратною специфічністю протабзимів

Номер за пор.	Тип захворювання	Субстрати реакції	Література
1.	Бронхіальна астма	Інтестинальний вазоактивний пептид (VIP)	[6]
2.	Автоімунний тиройдит	Тиреоглобулін	[44]
3.	Розсіяний склероз	Основний білок мієліна Гістон H1	[45, 46], [21]
4.	Автоімунний міокардит	Міозин тканини міокарда	[8, 9]
5.	Гемофілія А	Фактор VIII	[9]
6.	Множинна мієлома	Протромбін	[10]
7.	Сепсис	Фактори VIII, IX	[47]
8.	СНІД	Казеїн	[48]

Поряд із АТ, виділеними з сироватки крові хворих на автоімунні захворювання, протеїнажною активністю також володіють мультимерні форми легких ланцюгів імуноглобулінів хворих мієломою (білки Бенс-Джонса) [50]. З'ясовано, що ці білки гідролізують синтетичні хромогенні субстрати трипсину (хромазини TRY і VApNa). Оптимум реакції простежувався при рН 8,4, і величина Км становила 140–730 мкМ (для TRY) і 18–27 мкМ (для VApNa). С. Пол із співаваторами провів скринінг на протеолітичну активність легких ланцюгів моноклональних антитіл, білків Бенс-Джонса, а також їхніх рекомбінантних варіабельних фрагментів. Субстратом реакції тут слугували пептид-метилкумаринамід (пептид-МСА) і вазоактивний інтестинальний поліпептид (VIP). Виявлено, що 12 із 21 препарату білків Бенс-Джонса і один із 3-х отриманих варіабельних фрагментів АТ каталізували гідроліз одного або обох цих субстратів. Легкі ланцюги деяких моноклональних антитіл володіли протеїнажною активністю щодо пептиду-МСА та VIP, але їхній гідроліз відбувався за іншими сайтами порівняно з гідролізом за участю білків Бенс-Джонса. Гідроліз VIP характеризувався Км порядку 1 нМ, що свідчить про високу спорідненість цього пептида до АТ. На підставі цих досліджень зробили висновок, що легкі ланцюги деяких імуноглобулінів можуть володіти протеолітичною активністю, і цей феномен може мати патофізіологічне значення.

Важлива роль протабзимів у розвитку патологічних процесів при автоімунних захворюваннях спонукала дослідників на пошук абзимів із аналогічною каталітичною активністю та ще невідомою субстратною специфічністю. Результатом такого пошуку стало виявлення гідролізуючої активності IgG спинномозкової рідини та сироватки крові хворих на розсіяний склероз щодо основного білка мієліну (ОБМ) мозку. Розсіяний склероз (РС) є прогресуючим демієлінізуючим захворюванням, яке супроводжується утворенням склеротичних бляшок у головному і/або спинному мозку, що призводить до розвитку неврологічних порушень різного ступеня важкості [51]. Однак РС належить до автоімунних захворювань, оскільки вважають, що саме імунні реакції відіграють головну роль під час демієлінізації аксонов. Характерною ознакою цієї хвороби є наявність у спинномозковій рідині та сироватці крові хворих автоантитіл до деяких білків мозку, зокрема до основного білка мієліну (ОБМ), глікопротеїну мієліну олігодендроцитів, циклонукдеотидфосфодіестерази та інших білків [52]. Авто-АТ до цих антигенів виявлено лише у хворих

на PC, тому їхнє визначення у спинномозковій рідині та крові використовують для діагностики цього захворювання та оцінки ступеня його важкості. Нещодавно у сироватці крові хворих на PC виявили абзими, які гідролізують ОБМ [45, 46]. Оскільки руйнування ОБМ є причиною демієлінізації аксонів, є підстави припускати, що у цьому процесі задіяні абзими, які гідролізують ОБМ.

Наступні дослідження виявили, що індукція протеїн-гідролізуючих абзимів в організмі людини є характерною ознакою не лише автоімунних захворювань, оскільки із сироватки крові хворих гемофілією А було виділено антитіла, які гідролізували фактор згортання крові VIII (FVIII). Відомо, що гемофілія А є спадковим захворюванням, асоційованим з мутацією в X-хромосомі, що призводить до дефіциту синтезу FVIII, наслідком чого є порушення процесу згортання крові. З'ясовано, що при доведеному введенні терапевтичного препарату FVIII у 25–50 % пацієнтів спостерігався високий рівень антитіл до цього фактора. Анти-FVIII IgG інгібують дію препаратів FVIII, що становить серйозну проблему при лікуванні цієї хвороби. Група дослідників під керівництвом С. Лекруа-Десмазеса з плазми крові хворих на гемофілію А хроматографією на протеїн G-сефарозі і наступною гель-фільтрацією виділили IgG, які гідролізували FVIII [205]. Подібну активність також виявили і у Fab-фрагментів цих АТ. Як субстрат автори використовували біотинільований FVIII плазми крові людини, продукти гідролізу якого детектували Вестерн-блот аналізом. З'ясовано, що анти-FVIII IgG не гідролізують альбумін сироватки крові людини і фактор згортання крові IX, тому є високоспецифічними протеїназами. Інгібітори протеїназ (E-64, пепстатин, лейпептин) не впливали на протеолітичну активність препаратів АТ, що у сумі з іншими доказами (афінне виділення АТ, гель-фільтрація АТ за умов дисоціації імунних комплексів, каталітична активність Fab-фрагментів), підтверджує, що FVIII-гідролізуюча активність препаратів АТ пов'язана з абзимами, а не з домішками протеїназ. У наступних працях автори показали, що 13 із 23 (54 %) анти-FVIII IgG - позитивних хворих гемофілією А містять у сироватці крові FVIII-гідролізуючі абзими. Рівень активності абзимів у крові цих пацієнтів достовірно корелював із рівнем нейтралізації терапевтичної дії FVIII. Автори вважають, що результати цих досліджень переконливо доводять, що натуральні абзими можуть безпосередньо діяти як патогенні чинники.

Хоча абзими із протеїназною активністю належать до найбільш вивчених природних абзимів, їхню присутність у молоці людини було підтверджено лише недавно [53]. Група дослідників під керівництвом проф. Г.О. Невінського виявили, що електрофоретично гомогенні препарати sIgA молока людини гідролізують казеїни жіночого та коров'ячого молока. Поєднавши хроматографічні та електрофоретичні методи, автори довели, що казеїн-гідролізуюча активність властива саме молекулам sIgA і не є наслідком забруднення препаратів протеїназами. Проведений аналіз протеїназної активності sIgA-абзимів виявив їхню високу чутливість до дії інгібіторів серинових протеїназ і нечутливість до інгібіторів цистеїнових та аспарагінових протеїназ. Абзими із подібною субстратною специфічністю також виявили в сироватці крові хворих на СНІД [48]

Функціональна активність протабзимів в організмі хворих залишається недостатньо вивченою. Вважають, що протабзими безпосередньо задіяні у розвитку автоімунних захворювань. Головним доказом на користь цього твердження є те, що рівень протабзимів у сироватці крові хворих тісно пов'язаний із важкістю перебігу хвороби. Покращення стану хворого і показників його лабораторних аналізів у процесі лікування корелює зі зниженням рівня протабзимів у сироватці крові. Ці

ознаки свідчать про те, що протабзими можуть бути перспективними індикаторами розвитку автоімунних захворювань у людини.

ДНК-гідролізуючі антитіла (ДНК-абзими). ДНК - гідролізуючі антитіла належать до найбільш вивчених на сьогодні абзимів. Імуноглобуліни класу G, які володіють топоізомеразною активністю (каталізують одониткові розриви надспіралізованої форми плазмідної ДНК), вперше виділили з плазми крові хворих на системний червоний вовчак у 1992 р. в Інституті молекулярної біології РАН (м. Москва) група вчених під керівництвом проф. О. Габібова [13]. Інтенсивні дослідження наступних років показали, що абзими з аналогічною активністю містяться у сироватці крові хворих на різні автоімунні захворювання (склеродермія, ревматоїдний артрит, тироїдит, розсіяний склероз), а також у хворих на СНІД, променеvu хворобу, гепатит та лімфопроліферативні типи онкологічних захворювань [54, 55]. Абзими з ДНК-гідролізуючою активністю не виявили у сироватці крові хворих на грип, пневмонію, туберкульоз, тонзиліт, деякі онкологічні захворювання, а також у клінічно здорових людей. З'ясовано, що ДНК-абзими можуть бути патогенними чинниками при деяких автоімунних захворюваннях. Наприклад, у хворих на СЧВ рівень ДНК гідролізуючої активності IgG сироватки крові тісно корелював із клінічною маніфестацією цього захворювання [8]. Подібна закономірність також виявлялася у деяких хворих на ревматоїдний артрит [56].

Патогенна дія ДНК-абзимів може бути безпосередньо пов'язана з їхньою цитотоксичною активністю. Виявлено, що ДНК-абзими класу IgG індукують каспаз-залежний апоптоз у клітин промієлоцитів людини лінії HL-60, Т-клітин лімфоми людини лінії Raji, трансформованих фібробластів миші лінії L929, клітин людської еритролейкемії лінії K562 *in vitro* [57, 58]. Подібною активністю володіли і Fab-фрагменти цих антитіл. Механізм такої цитотоксичної дії на клітини залишається не з'ясованим. Вважають, що цитотоксична активність ДНК-абзимів може бути пов'язана з їхньою здатністю інтерналізуватися в клітини, транспортуватися в ядро і спричиняти деструкцію ДНК хроматину.

Вперше пошук і наступні дослідження ДНК-гідролізуючих антитіл у молоці людини провели у лабораторії проф. Г. О. Невінського. Виявлені абзими належали до класу IgG і гідролізували плазмідну ДНК і синтетичні олігонуклеотиди [7, 11, 13]. ДНК-гідролізуючі абзими виділяли з молока послідовними хроматографіями на колонках із протеїн А-сефарозою, DEAE-сорбентами, ДНК-целюлозою та наступною гель-фільтрацією АТ за умов дисоціації імунних комплексів (рН-шок). Для локалізації каталітичних центрів молекули АТ застосовано методи обмеженого протеолізу та афінної модифікації молекул АТ реакційно здатними похідними радіоактивно мічених олігонуклеотидів. Відомо, що ДНКазною активністю володіє не лише цілісна молекула IgG, але й її F(ab')₂ - та Fab-фрагменти. Для дослідження ДНК-гідролізуючої активності абзимів автори вперше використали метод ензимограм. Він ґрунтується на здатності нуклеаз частково відновлювати свою каталітичну активність після їхнього розділення електрофорезом за денатуруючих умов у поліакриламідному гелі, який містить вполімеризовану високомолекулярну ДНК. Після ренатурації білків, місця гідролізу ДНК виявляють фарбуванням гелю специфічними до ДНК барвниками. За допомогою цього методу визначено, що ДНК-гідролізуючою активністю володіють не лише цілісні молекули IgG молока людини або продукти їхнього обмеженого протеолізу, а й ізольовані легкі ланцюги цих АТ.

У наступних дослідженнях виявили, що ДНК-гідролізуючою активністю володіють також sIgA молока людини [14, 15]. Поєднання згаданих методів дозволило з'ясувати, що, на відміну від IgG, у гідролізі ДНК молекулою sIgA задіяні легкі (L) та важкі (H) ланцюги. Н-ланцюги відповідальні за зв'язування субстрату, хоча каталітичний центр молекули sIgA розміщений лише на L-ланцюгах цих імуноглобулінів. Крім плазмідної ДНК і синтетичних олігонуклеотидів, абзими молока здатні гідролізувати ядерну ДНК клітин ссавців, а також тРНК та синтетичні рибоолігонуклеотиди. Аналіз ДНК- та РНК-гідролізуючої активності абзимів молока людини свідчить про їхнє моноклональне походження. Треба зазначити, що АТ, які здатні гідролізувати синтетичні олігонуклеотиди, ДНК та РНК, було також виділено з колоструму корів [59].

Полісахарид-гідролізуючі абзими. Здатність імуноглобулінів гідролізувати полісахариди вперше описала в 1999 р. група дослідників під керівництвом доктора біологічних наук Неустроева К. Н. [60]. З'ясували, що IgG і IgM плазми крові хворих на ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, пієлонефрит та деякі онкологічні захворювання гідролізують мальтозовмістні олігосахариди, глікоген і подібні їм сполуки. Як субстрат при дослідженні глікозидазної активності використовували пара-нітрофеніл-мальтоолігосахариди різної довжини, а продукти реакції аналізували за допомогою тонкошарової хроматографії та зворотної фазової рідинної хроматографії високого розділення. Функція цих абзимів залишається невідомою.

Наявність у молозиві та молоці клінічно здорових жінок абзимів класів IgG та sIgA, здатних гідролізувати полісахариди виявила ця ж група дослідників [22]. Виявлені абзими каталізували розщеплення мальтозовмістних олігосахаридів, глікогену та подібних їм сполук. З'ясовано, що амілолітичною активністю володіють Fab-фрагменти антитіл, проте які саме ланцюги залучено до каталізу, залишається ще не з'ясованим. Особливістю абзимів молока є їхня висока полісахарид-гідролізуюча активність (у 5–50 разів вища порівняно з подібними абзимами сироватки крові хворих на автоімунні захворювання), що свідчить про їхню важливу роль у метаболізмі олігосахаридів молока людини.

Висновок. Виявлення каталітичної активності антитіл суттєво змінило класичне уявлення про роль і функції імуноглобулінів в організмі людини. Каталітично активні антитіла (абзими) виявлено у нормі, і при багатьох захворюваннях. В нормі абзими здебільшого представлені антитілами IgM, для яких характерна протеолітична активність щодо чужорідних антигенів, або аутоантигенів, які зазнали суттєвої хімічної модифікації. Знешкоджуючи ці антигени, абзими виконують захисну функцію в організмі клінічно здорових людей. У людей із аутоімунними захворюваннями абзими здебільшого представлені антитілами IgG, які володіють протеолітичною і нуклеазною активністю. Молекулярними мішеннями протеолітичної активності цих абзимів слугують функціонально важливі білки (тироглобулін, кардіоміозин, основний білок мієліну і тощо), гідроліз яких призводить до розвитку певного типу аутоімунного захворювання (аутоімунний тироїдит, аутоімунний міокардит, розсіяний склероз). Тому абзими з протеолітичною активністю (протабзими) є перспективними маркерами для діагностики певних типів аутоімунних захворювань. Абзими, які володіють нуклеазною активністю (ДНК-абзими) виявили при різних захворюваннях аутоімунної та неаутоімунної природи (аутоімунний тироїдит, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, поліартрит, множинна мієлома, СНІД, променева хвороба). Оскільки ДНК-абзими не було виявлено у клінічно здорових людей, то наявність цих каталітично активних антитіл в організмі є

певною ознакою патологічних змін в імунній системі людини. У зв'язку з цим ДНК-абзими є перспективними маркерами для визначення важкості перебігу певних автоімунних і неавтоімунних захворювань у людини.

Оскільки лактація є частиною репродуктивного циклу жінки, то функціональна активність імуноглобулінів молозива та молока може відображати індивідуальні особливості стану її гуморального імунітету. Дані літератури і результати наших досліджень свідчать про те, що в молозиві та молоці породіль можуть бути наявні абзими із захисною та з патогенною функцією. У зв'язку з цим абзими молозива і молока породіль можуть слугувати маркерами у ранній діагностиці автоімунних порушень у породіль.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Pauling L.* Nature of forces between large molecules of biological interest // *Nature*. — 1948. — Vol. 161. — P. 707–709.
2. *Jencks W. P.* Catalysis in Chemistry and Engymology // New York: McGraw Hill, 1969. — 288 p.
3. *Tramontano A., Janda K. D., Lerner R. A.* Catalytic antibodies // *Science* — 1986. — Vol. 234, No. 4783 — P. 1566–1570.
4. *Pollack S. J., Jacobs J. W., Schultz P. G.* Selective chemical catalysis by an antibody // *Science* — 1986. — Vol. 234, No. 4783 — P. 1570–1573.
5. *Hanson C. V., Nishiyama Y., Paul S.* Catalytic antibodies and their applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2005. — Vol. 16, No. 6 — P. 631–636.
6. *Paul S., Voile D. J., Beach C. M., Dowell M. J.* Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibodies // *Science*. — 1989. — Vol. 244, №. 4909 — P. 1158–1162.
7. *Невинский Г. А., Каньшкова Т. Г., Бунева В. Н.* Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // *Биохимия*. — 2002. — Т. 65, № 11 — С. 1473–1487.
8. *Gabibov A.* Antibody catalysis: biochemistry, immunology, pathology // *Immunol. Lett.* — 2006. — Vol. 103, No. 1. — P. 1–2.
9. *Lacroix-Desmazes S, Wootla B., Delignat S., Dasgupta S.* Pathophysiology of catalytic antibodies // *Immunol Lett.* — 2006. — Vol. 103, No. 1. — P. 3–7.
10. *Paul S., Nishiyama S., Planque S., Taguchi H.* Theory of proteolytic antibody occurrence // *Immunol Lett.* — 2006. — Vol. 103, No. 1. — P. 8–16.
11. *Kim Ю. Я, Стойка П. С.* Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — Т. 79, № 2 — С. 5–16.
12. *Кит Ю. Я. Семенов Д. Ю., Невинский Г. А.* Существуют ли каталитически активные антитела у здоровых людей? (Протеинкиназная активность sIgA из человеческого молока) // *Молекулярная биология*. — 1995. — Т. 29, № 4. — С. 893–905.
13. *Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Khlimankov D. Yu., Buneva V. N. et al.* DNA –hydrolyzing activity of the light chain of IgG antibodies from milk of healthy human mothers // *FEBS Lett.* — 1997. — Vol. 416, No. 1. — P. 23–26.
14. *Nevinsky G. A., Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Vlassov A. V. et al.* Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 83, No. 1–3. — P. 115–129.

15. *Kit Y. Y., Mitrofanova E. E., Shestova O. E., Kuligina E. V. et al.* Human anti-DNA secretory immunoglobulins A possess endonuclease activity and they are able to cause the destruction of nuclear chromatin in vitro // Укр. біохім. журн. — 2000. — Т. 72, № 3 — С. 73–76.
16. *Kim Ю.Я., Стойка Р. С.* Виділення з молока людини секреторних імуноглобулінів класу А, з різною спорідненістю до ДНК та дослідження їх ДНК-гідролізуючої активності // Імунологія та алергологія. — 2005. — № 1. — С. 53–55.
17. *Buneva V. N., Kanyshkova T. G., Vlassov A. V., Semenov D. V. et al.* Catalytic DNA- and RNA-hydrolyzing antibodies from milk of healthy human mothers // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1998. — Vol. 75, No. 1–3. — P. 63–76.
18. *Kit Yu. Ya., Kuligina E. V., Richter V. A.* Secretory IgAs from human milk with affinity to mammalian DNA are capable of hydrolyzing ribosomal RNA // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 3 — С. 8–13.
19. *Семенов Д. В., Каньшкова Т. Г., Кут Ю. Я., Хлиманков Д. Ю.* Иммуноглобулин G молока человека гидролизует нуклеотиды // Биохимия. — 1998. — Т. 63, №8 — С. 1097–1106.
20. *Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // J. Mol. Recognit. — 2005. — Vol. 18, No. 5. — P. 413–421.
21. *Kit Yu. Ya, Starykovych M. A., Richter V. A., Stoika R. S.* Detection and characterization of IgG and sIgA abzymes capable of hydrolyzing histone H1 // Biochemistry (Moscow). — 2008, — Vol. 73, No. 8. — P. 950–956.
22. *Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Kulminskaya A. A., Buneva V. N. et al.* Amylolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk // Clin. Chim. Acta. — 2001. — Vol. 314, No. 1–2. — P. 141–152.
23. *Kit Y.Y., Semenov D. V., Nevinsky G. A.* Phosphorylation of different human milk proteins by human catalytic secretory immunoglobulin A // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1996. — Vol. 36, No 3. — P. 521–527
24. *Nevinsky G. A., Kit Y. Ya., Semenov D. V., Khlimankov D. Y., Buneva V. N.* Secretory Immunoglobulin A from human milk catalyzes milk protein phosphorylation // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1998. — Vol. 75, No 1. — P. 77–91.
25. *Kit Y., Kuligina E., Semenov D., Richter V.* Oligodeoxyadenylate stimulates the protein kinase activity of anti-DNA sIgA from human milk // Acta Biochim. Pol. — 2002. — Vol. 5, No 1. — С. 291–294.
26. *Кут Ю. Я., Шипицин М. В., Семенов Д. В., Рухтер В. А., Невинский Г. А.* Фосфорилирование липидов, прочно связанных с иммуноглобулином А, в препаратах антител из молока человека, обладающих протеинкиназной активностью // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 6. — С. 852–858.
27. *Кут Ю. Я., Семенов Д. В., Кулигина Е. В., Рухтер В. А.* Влияние нуклеиновых кислот и полисахаридов на фосфотрансферазную активность препаратов sIgA, выделенных из молока человека // Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 1. — С. 59–64.
28. *Gorbunov D. V., Semenov D. V., Shipitsin M. V., Kit Yu. Yu., Kanyshkova T. G., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Phosphorylation of Minor Lipids of Human Milk Tightly Bound to Secretory Immunoglobulin A // Rus. J. Immunol. — 2000. — Vol. 5, No 3. — С. 267–278.
29. *Gorbunov D. V., Karataeva N. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Lipid kinase activity of antibodies from milk of clinically healthy human mothers // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — Vol. 1735, No. 3. — P. 153–166.
30. *Karataeva N. A., Gorbunov D. V., Prokudin I. V., Buneva V. N. et al.* Human milk antibodies with polysaccharide kinase activity // Immunol. Lett. — 2006. — Vol. 103, No. 1. — P. 58–67.

31. *Li L., Kalaga R., Paul S.* Proteolytic components of serum IgG preparations // *Clin. Exp. Immunol.* — 2000. — Vol. 120, No. 2. — P. 261–266.
32. *Філяк Є. З., Коробов В. М., Кім Ю. Я.* Дослідження впливу оксиду азоту на нуклеазну активність імуноглобулінів крові здорових людей // *Біологія тварин.* — 2002. — Т. 4, № 1–2. — С. 157–162.
33. *Кім Ю. Я., Кім А. А., Гум Н. П., Пухтер В. А.* Протеинкиназная активность иммуноглобулинов плазмы крови человека // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Т. 77, № 3. — С. 49–55.
34. *Nishiyama Y., Mitsuda Y., Taguchi H., Planque S.* Towards covalent vaccination: improved polyclonal HIV neutralizing antibody response induced by an electrophilic gp120 V3 peptide analog // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282, No. 43. — P. 31250–31256.
35. *Taguchi H., Planque S., Nishiyama Y., Symersky J.* Autoantibody-catalyzed hydrolysis of amyloid beta peptide // *J Biol Chem.* — 2008. — Vol. 283, No. 8. — P. 4714–4722.
36. *Kalaga R., Li L., Odell J. R., Paul S.* Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from immunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis // *J. Immunol.* — 1995. — Vol. 155, No. 5. — P. 2695–2702.
37. *Zhu X., Wentworth P. Jr., Wentworth A. D., Eschenmoser A. et al.* Probing the antibody-catalyzed water-oxidation pathway at atomic resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2004. — Vol. 101, No. 8. — P. 2247–2252.
38. *Wentworth A. D., Jones L. H., Wentworth P. Jr., Janda K. D. et al.* Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2000. — Vol. 97, No. 38. — P. 10930–10935.
39. *Wentworth Jr. P., Jones L. H., Wentworth A. D., Zhu X. et al.* Antibody catalysis of the oxidation of water // *Science.* — 2001. — Vol. 293, No. 12. — P. 1806–1811.
40. *Kit Y. Y., Kim A. A., Sidorov V. N.* Affinity-purified secretory immunoglobulin A possesses the ability to phosphorylate human milk casein // *Biomed. Sci.* — 1991. — Vol. 1, No. 2. — P. 201–204.
41. *Kit Yu., Kovaleva V., Drobot L.* Study of phosphotransferase activity of IgG fraction possessing affinity to ATP from blood serum of humans with lupus erythematosus // *Frontiers in autoimmunity: fundamental aspects and clinical perspectives : Internat. Conf., September 8–18, 2002. : Abstract Book.* — Keszthely, (Hungary), 2002. — P. 39.
42. *Кім Ю. Я., Ковалева В. А., Пухтер В. А.* Фосфотрансферазная активность препаратов IgG из сыворотки крови больных системной красной волчанкой // *Биополімері і клітина.* — 2003. — Т. 19, № 2. — С. 185–189.
43. *Zhou G. W., Guo J., Huang W., Fletterick R. J. et al.* Crystal structure of a catalytic antibody with a serine protease active site // *Science.* — 1994. — Vol. 265, No. 5175. — P. 1059–1064.
44. *Rose N. R., Burek C. L.* Autoantibodies to thyroglobulin in health and disease // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 83, No. 1–3. — P. 245–251.
45. *Polosukhina D. I., Buneva V. N., Doronin B. M., Tushkevich O. B. et al.* Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies the sera of patients with multiple sclerosis // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — Vol. 11, No. 8 — P. 266–272.
46. *Ponomarenko N. A., Durova O. M., Vorobiev I. I., Aleksandrova E. S. et al.* Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models // *J. Immunol. Methods.* — 2002. — Vol. 269, No. 1–2 — P. 197–211.
47. *Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri S. V., Hayon-Sonsino D. et al.* High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis // *Proc. Natl. Acad. Sci/ U S A.* — 2005 — Vol. 102, No. 11 — P. 4109–4113.

48. *Odintsova E. S., Kharitonova M. A., Baranovskii A. G., Sizyakina L. P. et al.* Proteolytic activity of IgG antibodies from blood of acquired immunodeficiency syndrome patients // *Biochemistry (Mosc)*. — 2006 — Vol. 71, No. 3 — P. 251–261.
49. *Gao Q. S., Sun M., Rees A. R., Paul S.* Site-directed mutagenesis of proteolytic antibody light chain // *J. Mol. Biol.* — 1995 — Vol. 253, No. 5 — P. 658–664.
50. *Matsuura K., Sinohara H.* Catalytic cleavage of vasopressin by human Bence Jones proteins at the arginylglycinamide bond // *Biol. Chem.* — 1996 — Vol. 377, No. 9 — P. 587–589.
51. *Лисьяний Н. И.* Иммунология и иммунотерапия рассеянного склероза // Серия "Нейроиммунология". — 2003. — Т. 4. — 251 с.
52. *Vojdani A., Cooper E.* Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, alpha-beta-crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis // *J. Intern. Med.* — 2003 — Vol. 254, No. 4 — P. 363–374.
53. *Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // *J. Mol. Recognit.* — 2005. — Vol. 18, No. 5. — P. 413–421.
54. *Gabibov A. G., Gololobov G. V., Makarevich O. I., Schourov D. V. et al.* DNA-hydrolyzing autoantibodies // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1994 — Vol. 47, No. 2–3 — P. 293–302.
55. *Baranovsky A., Matushin V. G., Vlassov A. V., Zabara V. G. et al.* DNA-and RNA-hydrolyzing antibodies from the blood of patients with various forms of viral hepatitis // *Biochemistry (Moscow)*. — 1997 — Vol. 62, No. 12 — P. 1358–1366.
56. *Gabibov A.* Antibody catalysis: biochemistry, immunology, pathology // *Immunol. Lett.* — 2006. — Vol. 103, No. 1. — P. 1–2.
57. *Сучков С. В.* Сравнительное исследование каталитических (ДНК-гидролизующих) и цитотоксических свойств анти-ДНК аутоантител // *Бюл. эксп. биол. мед.* — 2001. — Т. 131, № 4. — С.420–423.
58. *Kozyr A. V., Sashchenko L. P., Kolesnikov A. V., Zelenova S. V. et al.* Anti-DNA autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines. // *Immunol. Lett.* — 2002. — Vol. 80, No. 1 — P. 41–47.
59. *Stepaniak L.* Isolation and partial characterization of catalytic antibodies with oligonuclease activity from bovine colostrum // *Prep. Biochem. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 32, No. 1 — P. 17–28.
60. *Saveliev A. N., Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Ershova N. A. et al.* Amylolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis // *Immunol. Lett.* — 2002 — Vol. 86, No. 3 — P. 291–297.

SUMMARY

Yurij KIT

CATALYTIC ANTIBODIES (ABZYMES) IN NORM AND PATHOLOGY

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Dragomanov St.,
14/16, Lviv 79005, Ukraine. E.mail: kit@cellbiol.lviv.ua*

The review is focused on the analysis of published data about the catalytic activity of antibodies (abzymes) of human blood serum and milk, revealed in norm and pathology. Possible biological role of abzymes in human organism is considered.

Key words: blood serum, human milk, catalytic antibodies, catalytical activity.