

ХАРАКТЕРИСТИКА АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ IgG У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

ВОЛКОВА М.В., ВЕЛИЧИНСКАЯ О.Г.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра госпитальной терапии

Резюме. Проведен анализ абзимной активности IgG у пациентов с ранним ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми лицами и оценена ее клинико-патогенетическая значимость на основе корреляционного анализа между уровнями абзимной активности, клиническими признаками и лабораторными данными.

Уровни ДНКазной и супероксиддисмутазной активности IgG у обследованных пациентов превышали контрольные величины. Величины БАПНА-амидазной и каталазной активности у пациентов были сопоставимы с контрольными уровнями. Обнаружены статистически значимые ($p < 0,05$) взаимосвязи между удельной ДНКазной активностью IgG и числом болезненных суставов ($r = 0,42$), уровнем С-реактивного белка ($r = 0,59$), количеством CD4+ Т-лимфоцитов ($r = 0,76$), фагоцитарным индексом ($r = 0,85$), между удельной каталазной активностью и длительностью болезни ($r = -0,46$), количеством CD8+ Т-лимфоцитов ($r = -0,82$), что подтверждает клиническую и патогенетическую значимость абзимной активности IgG при раннем ревматоидном артрите и указывает на участие абзимов в развитии аутоиммунного воспаления при данном заболевании.

Ключевые слова: ранний ревматоидный артрит, каталитическая активность IgG.

Abstract. The study of abzyme IgG activity in patients with early rheumatoid arthritis in comparison with healthy persons was conducted. The clinical and pathogenetic significance of abzyme activity was assessed on the basis of correlation analysis between its levels, clinical signs and laboratory findings.

The levels of DNase and superoxide dismutase IgG activity in the examined patients were higher in comparison with those in the control group. There were no differences between the levels of BAPNA-amidase and catalase activities in patients with arthritis and healthy persons. We revealed statistically significant ($p < 0,05$) relationships between DNase IgG activity and the number of tender joints ($r = 0,42$), the level of C-reactive protein ($r = 0,59$), the number of CD4+ T-lymphocytes ($r = 0,76$), phagocytic index ($r = 0,85$), between catalase activity and the duration of the disease ($r = -0,46$), the number of CD8+ T-lymphocytes ($r = -0,82$), that confirms the clinical and pathogenetic significance of abzyme IgG activity in early rheumatoid arthritis and points to the participation of abzymes in the development of autoimmune inflammation in this disease.

Иммуноглобулины, обладающие каталитической активностью, получили название абзимы («abzymes», от англ. – antibody+enzyme), а отрасль иммунологии,

изучающей абзимы, называют абзимологией. Достижения абзимологии вносят новые сведения в функционирование системы иммунитета, способствуют решению различных биотехнологических задач [12, 15, 17].

Спектр катализируемых антителами реакций чрезвычайно широк [18]. С одной стороны, антитела действуют по механизмам, сходным с истинными ферментами. В то же

время абзимы могут катализировать реакции, не имеющие в природе аналогов [13, 16].

Исследование роли каталитической антител *in vivo* при патологических состояниях вызывает значительный интерес.

В настоящее время многие исследования в иммунологии посвящены изучению роли абзимов в патогенезе различных заболеваний, а также возможностей использования результатов определения абзимной активности в диагностике, лечении и профилактике патологических состояний [2]. Обнаружение каталитической активности иммуноглобулинов при ревматических заболеваниях создает предпосылки для дальнейших научных исследований, посвященных изучению абзимов в качестве биомаркеров данных заболеваний, а также разработке их диагностических критериев [5]. При ревматоидном артрите (РА) изучалась патогенетическая роль и клиническая значимость ДНК-гидролизующих антител. Наибольшая активность была выявлена у лиц мужского пола с серопозитивным по ревматоидному фактору вариантом артрита и у женщин с серонегативным вариантом. В целом между пациентами с серонегативным и серопозитивным артритом различий в уровнях ДНКазной активности иммуноглобулинов получено не было. Максимальная ДНКазная активность была выявлена у пациентов с экстраартикулярными проявлениями РА [4]. При РА также доказано наличие абзимов, обладающих протеолитической активностью, в частности в отношении пентапептида Gln-Arg-Arg-Ala-Ala – белкового компонента, ассоциированного с высоким риском развития РА [14].

До настоящего времени не предпринималось попыток изучения каталитических антител при раннем ревматоидном артрите (рРА). Однако, учитывая наибольшую выраженность аутоиммунного компонента воспаления на ранних стадиях заболевания, можно предположить возможность индукции при рРА иммуноглобулинов, обладающих каталитическими свойствами.

Целью исследования явился анализ каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов у пациентов с рРА, а также оценка ее клинико-патогенетической зна-

чимости на основе корреляционного анализа между уровнями абзимной активности и клиническими признаками, а также лабораторными данными рРА.

Методы

Всего обследовано 23 пациента с ранним ревматоидным артритом (рРА) и 39 здоровых лиц (контрольная группа). Диагноз РА устанавливали в соответствии с классификационными критериями 2010 года [21]. Различий по полу и возрасту между сравниваемыми группами пациентов и здоровых лиц не было выявлено ($p > 0,05$). Средняя длительность болезни пациентов с рРА составила $3,87 \pm 2,59$ месяца (95%ДИ: 2,75-4,99). В группе пациентов с рРА 11 пациентов (47,8%) были серопозитивными по ревматоидному фактору, 12 (52,2%) – серонегативными. Активность 1 степени отмечалась у 4 пациентов (17,39%), 2 степени – у 14 (60,87%), 3 степени – у 5 пациентов (21,74%). Рентгенологическая 1 стадия отмечалась у 2 пациентов (8,69%), 2 стадия – у 21 пациента (91,31%). У всех пациентов определялся 1-ый функциональный класс. Средняя величина DAS28 составила $4,95 \pm 1,76$ (95%ДИ: 4,19-5,72). Среднее значение индекса Ричи равнялось $14,78 \pm 12,03$ (95%ДИ: 9,58-19,98).

Все пациенты, принявшие участие в исследовании, на амбулаторном этапе принимали нестероидные противовоспалительные препараты. Обследование на каталитическую активность выполнялось до назначения терапии базисными препаратами и глюкокортикоидами.

Выделение препаратов поликлональных IgG 1,2 и 4 подклассов из сыворотки крови проводили комбинированным риванол-аффиннохроматографическим методом [11]. К полученной чистой сыворотке прибавляли охлажденный до 4°C 1% раствор 2-этокси-6,9-диаминоакридина лактата (риванола) в соотношении 1 объем риванола к 1 объему сыворотки. Смесь инкубировали при температуре 4°C не менее 2 часов. Осадок отбрасывали, риванол из надосадочной жидкости удаляли адсорбцией на сорбенте Молселект G 25. Да-

лее проводили аффинную хроматографию, пропуская препарат через колонку с агарозой, конъюгированной с белком А золотистого стафилококка, уравновешенную 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4 со скоростью 6-7 капель в минуту. После этого колонку последовательно промывали 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4 с 1% раствором тритона X-305, а затем без детергента в количестве 5-6 объемов колонки до исчезновения белка в элюенте. Далее колонку отмывали 0,3 М раствором NaCl. Элюцию связавшихся иммуноглобулинов класса G (G1, G2, G4) вели 0,1 М глицин-HCl буфером pH 2,8 до исчезновения белка в элюенте. Отбирали аликвоты, содержащие максимальное количество белка (определяли по методу Бредфорд [10]). Эти пробы объединяли. Их нейтрализовали 1 М раствором Трис pH 9,0 до pH 7,0-7,5. Препараты диализовали против изотонического раствора NaCl. Полученные IgG после диализа осветляли, центрифугируя в центрифуге с бакетным ротором при 3000 об/мин в течение 10 минут. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм.

Препараты IgG хранили в пластиковых пробирках при -20°C . Контроль чистоты полученных IgG проводили с помощью электрофореза в диссоциирующих и восстанавливающих условиях [1]. Результаты проведенных электрофорезов подтвердили чистоту препаратов IgG.

Все виды каталитической активности IgG оценивали на 1 мг образца (удельная абзимная активность IgG). Удельную ДНКазную активность IgG выражали в баллах. Удельную БАПНА-амидазную, каталазную и супероксиддисмутазную (СОД) активность выражали в относительных единицах активности (ЕА). Постановка реакций ДНКазной [2], БАПНА-амидазной [9], каталазной [7] и СОД активности [3] IgG осуществлялась согласно методикам, разработанным и модифицированным нами и апробированным на различных биологических моделях.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 7.0. Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих нормальное распределе-

ние, описывали средним значением (M) и средним квадратическим отклонением (s) в виде $M \pm s$. Для количественных признаков, не имеющих нормального распределения, центральные тенденции и дисперсии описывались медианой (Me), размахом (Min-Max) и межквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля). Рассчитывались 95% доверительные интервалы (ДИ) для средних и медиан. Для сравнения количественных признаков, имеющих нормальное распределение, использовался t-критерий Стьюдента. Для выявления корреляционных взаимосвязей использовался метод ранговых корреляций Спирмена (Spearman).

Результаты и обсуждение

Уровни удельной ДНКазной активности IgG у обследованных лиц представлены в таблице 1.

Различия между уровнями удельной ДНКазной активности IgG у пациентов с рРА по сравнению с группой здоровых лиц были статистически высокозначимыми ($p < 0,0001$).

Согласно данным литературы [3, 8] наиболее высокие уровни ДНКазной активности иммуноглобулинов наблюдаются при аутоиммунных заболеваниях. Величина данного вида активности коррелирует с показателями воспаления и степенью тяжести аутоиммунного процесса [10].

В нашем исследовании при рРА уровни ДНКазной активности поликлональных IgG оказались выше ($p < 0,0001$), чем у здоровых лиц, что подтверждает представление о РА как о прогрессирующем системном аутоиммунном заболевании, при котором наблюдаются выраженные иммунопатологические сдвиги. Учитывая появление на ранних стадиях аутоиммунных заболеваний антинуклеарных антител, антител к двухспиральной ДНК и др., можно предположить, что абзимы, обладающие ДНКазной активностью, на ранних стадиях РА имеют приспособительное значение. В частности, они способны разрушать избыток нуклеиновых кислот, появляющихся в ходе цитолиза. По мере развития РА ДНКазные абзимы оказывают повреждающее воздействие на тка-

Таблица 1

Уровни удельной ДНКазной активности IgG у обследованных лиц

Группы обследованных лиц	Медиана	Размах (Min-Max)	95%ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
рРА	4,50	3,00-5,00	4,00-5,00	4,00-5,00	23
Здоровые лица	0,00	0,00-2,00	0,00-0,00	0,00-0,00	39

ни за счет цитотоксических эффектов и влияния на процессы апоптоза [3, 19, 20].

В нашем исследовании обнаружена взаимосвязь между удельной ДНКазной активностью IgG и числом болезненных суставов ($r=0,42$; $p<0,05$), уровнем С-реактивного белка ($r=0,59$; $p<0,05$), количеством CD4+ Т-лимфоцитов ($r=0,76$; $p<0,05$), фагоцитарным индексом ($r=0,85$; $p<0,05$). Выявленные корреляции свидетельствуют о клинической и патогенетической значимости ДНКазной абзимной активности при рРА, в частности, об участии ДНКазных абзимов в развитии аутоиммунного воспаления при данном заболевании.

Уровни удельной БАПНА-амидазной активности IgG у обследованных лиц представлены в таблице 2.

Различия между уровнями удельной БАПНА-амидазной активности IgG у пациентов с рРА по сравнению с контрольными значениями оказались незначимыми ($p>0,05$). По-видимому, необходимо продолжить исследование протеолитической активности IgG при данном заболевании с изменением специфичности изучаемых протеолитических реакций.

Уровни удельной каталазной активности представлены в таблице 3.

Таблица 2

Уровни удельной БАПНА-амидазной активности IgG у обследованных лиц

Группы обследованных лиц	Медиана	Размах (Min-Max)	95%ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
рРА	0,011	0,00-0,048	0,00-0,025	0,00-0,025	23
Здоровые лица	0,010	0,00-0,02	0,0090-0,012	0,0075-0,014	39

Таблица 3

Уровни удельной каталазной активности IgG у обследованных лиц

Группы обследованных лиц	Медиана	Размах (Min-Max)	95%ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
рРА	5,63	0,00-36,60	0,00-11,35	0,00-11,50	23
Здоровые лица	4,00	0,00-12,70	0,30-7,00	0,00-7,60	39

Не выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$) между уровнями удельной каталазной активности IgG у пациентов с рРА по сравнению с контрольными величинами.

Нами обнаружена взаимосвязь между удельной каталазной активностью и длительностью болезни ($r = -0,46$; $p < 0,05$), а также количеством CD8+ Т-лимфоцитов ($r = -0,82$; $p < 0,05$).

На примере каталазной абзимной активности можно продемонстрировать уникальные способности молекулы иммуноглобулинов совмещать защитные функции распознавания и киллинга. Молекулы иммуноглобулинов, независимо от их специфичности, способны катализировать превращение синглетного кислорода в перекись водорода, оказывая существенное влияние на протекание дыхательного взрыва в макрофагах. Антитела, обладающие способностью связывать высокоактивный синглетный кислород, обладают защитными свойствами в отношении собственных клеток, однако образование активных метаболитов кислорода под влиянием антител может приводить к тканевому повреждению. С учетом вышеизложенного не исключается, что оксидоредуктазные абзимы в определенных условиях могут играть как провоспалительную, так и протективную, защитную роль.

Протективный характер каталазной активности при рРА подтверждает выявленная нами обратная зависимость между ее уровнем и продолжительностью заболевания.

Доказанным фактом является присутствие на молекулах IgG, обладающих оксидоредуктазной активностью, нескольких каталитических центров [6]. Наиболее вероятна связь

данной активности с шарнирными областями молекул IgG, а также с Fc-фрагментами IgG [2]. Учитывая, что перечисленные области молекул IgG устроены идентично независимо от специфичности, можно объяснить отсутствие различий между уровнями абзимной каталазной активности у обследованных пациентов и здоровых лиц.

Уровни удельной СОД активности IgG у обследованных лиц представлены в таблице 4.

Уровни удельной СОД активности IgG у пациентов с рРА статистически высокозначимо ($p < 0,0001$) превышали контрольные величины в группе здоровых лиц.

Известно, что основное патогенетическое значение антител, обладающих СОД активностью, связано с их способностью являться акцептором свободных кислородных радикалов и осуществлять торможение перекисного окисления липидов и белков. Следовательно, данные абзимы способны защитить клетку от свободно радикального повреждения. При разнообразной патологии увеличение активности СОД может рассматриваться как защитный противовоспалительный механизм. При рРА СОД активность, по-видимому, также имеет протективное значение.

Заключение

1. У пациентов с ранним ревматоидным артритом уровни ДНКазной и супероксиддисмутазной активности поликлональных IgG статистически высокозначимо ($p < 0,001$) превышают контрольные величины у здоровых лиц.

2. Отсутствуют различия между величинами протеолитической (БАПНА-амидазной)

Таблица 4

Уровни удельной СОД активности IgG у обследованных лиц

Группы обследованных лиц	Медиана	Размах (Min-Max)	95%ДИ для медианы	Межквартильный интервал	Число наблюдений
рРА	13,65	2,00-24,00	9,22-17,26	9,00-17,28	23
Здоровые лица	0,00	0,00-16,00	0,00-2,23	0,00-1,6	39

и каталазной активностью IgG у обследованных пациентов и контрольной группой.

3. Обнаружены статистически значимые взаимосвязи между уровнями абзимной активности IgG, клиническими признаками и лабораторными данными при раннем ревматоидном артрите, что подтверждает клиническую и патогенетическую значимость абзимной активности IgG при данном заболевании, а именно протективный характер окислительно-восстановительной активности и участие ДНКазной активности в развитии аутоиммунного воспаления.

Литература

1. Биохимические подходы к стандартизации сывороточных препаратов / И. М. Петяев [и др.] // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. – 1984. – С. 107–109.
2. Генералов, И. И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И. И. Генералов. – Витебск, 2000. – 167 с.
3. Генералов, И. И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях / И. И. Генералов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 3. – С. 19–24.
4. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическое и клиническое значение / А. Н. Хитров [и др.] // Тер. арх. – 2005. – Т. 77. – С. 75–80.
5. Каталитические аутоантитела как новый молекулярный инструмент в ревматоидной практике / А.Н.Хитров [и др.] // Тер. арх. – 2006. – № 6. – С. 59–66.
6. Кульберг, А.Я. Каталитические свойства продуктов катаболического распада клеточных рецепторов (R-белков) / А.Я. Кульберг, И.М. Петяев, Н.Г. Замотаева // Иммунология. – 1988. – № 3. – С. 37.
7. Методические подходы к определению окислительно-восстановительной активности антител / И.И. Генералов [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2005. – №2. – С. 14–19.
8. Невинский, Г. А. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г.А. Невинский, Т.Г. Каньшкова, В.Н. Бунева // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 11. – С. 1245–1255.
9. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G: инструкция по применению / В.К. Окулич [и др.]; разработчик Витебск. гос. мед. ун-т. – утв. МЗ РБ 12.04.02; пер. № 6-0101.
10. Практическая химия белка: пер. с англ. / А. Дарбре [и др.]; под общ. ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
11. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии: пат. 3205 Респ. Беларусь, МПК 6G 01 N 33/48 / М. Р. Конорев, И. И. Генералов, И. В. Жильцов, А. Г. Генералова; заявитель Витебск. гос. мед. инст-т. – заявл. 05.02.96; опубл. 30.12.99 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 1999. – №3. – С. 121.
12. A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody / A. D. Napper [et al.] // Science. – Vol. 237, N 4818. – P. 1041–1043.
13. An unexpectedly efficient catalytic antibody operating by ping-pong and induced fit mechanisms / P. Wirsching [et al.] // Science. – 1991. – Vol. 252, N 5006. – P. 680–685.
14. Amidase and peptidase activities of polyclonal immunoglobulin G present in the sera of patients with rheumatoid arthritis / K. Matsuura [et al.] // Apl. Biochem. Biotechnol. – 2000. – Vol. 83, N 1–3. – P. 107–113.
15. Antibody catalysis in reverse micelles / C. N. Durfor [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1988. – Vol. 110. – P. 8713–8714.
16. Antibody catalysis of a reaction otherwise strongly disfavored in water / D. Shabat [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 374, N 6518. – P. 143–146.
17. Antibody catalyzed cationic cyclization / T. Li [et al.] // Science. – 1994. – Vol. 264, N 5163. – P. 1289–1293.
18. On roads not taken in the evolution of protein catalysts: antibody steroid isomerases that use an enamine mechanism / C.H. Lin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94, N 22. – P. 11773–11776.
19. Suchkov, S.V. Comparative study of catalytic (DNA-hydrolyzing) and cytotoxic properties of anti-DNA autoantibodies / S.V. Suchkov // Bull. Exp. Biol. Med. – 2001. – Vol. 131, № 4. – P. 353–354.
20. Suchkov, S.V. Phenomenon of DNA-abzyme cross-reactivity and its significance for the mechanisms of cytotoxicity and apoptosis / S.V. Suchkov, A.G. Gabivov, N.V. Gnuchev // Ontogenez. – 2001. – Vol. 32. – P. 348–352.
21. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2010. – Vol. 69 (9). – P. 1580–1588.

Поступила 25.03.2011 г.

Принята в печать 03.06.2011 г.