

На правах рукописи



ТОЛМАЧЕВА АННА СЕРГЕЕВНА

**ОКСИДОРЕДУКТАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ЧЕЛОВЕКА**

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Невинский Георгий Александрович, д.х.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией ферментов репарации

Официальные оппоненты:

Генералов Игорь Иванович, д.м.н., профессор

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, зав. кафедрой клинической микробиологии

Рубцов Николай Борисович, д.б.н., профессор

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, заведующий отделом биологии клетки

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией молекулярной микробиологии

Защита состоится «23» июня 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск-90, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «___» мая 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Около 5% потребляемого тканями кислорода в аэробном организме в результате многочисленных реакций превращается в активированные кислородные метаболиты (АКМ), в том числе такие, как, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 . Активированные кислородные метаболиты участвуют во многих физиологических процессах, но при высоких концентрациях они могут быть опасны, так как, благодаря своей высокой реакционной способности, являются сильными окислителями, способными повреждать макромолекулы. Если уровень образующихся АКМ достигает критической величины, возникает состояние, определяемое как окислительный стресс. Он приводит к опасным биохимическим процессам и является одной из причин множества заболеваний. Для защиты от гиперпродукции АКМ существуют ферментативная, а также неферментативная системы. Канонические ферменты антиоксидантной защиты организма, такие как, например, супероксиддисмутазы, каталаза и глутатионпероксидазы, препятствуют образованию окислительных модификаций макромолекул, однако в крови они быстро инактивируются.

В последние несколько десятилетий проведено множество исследований различных активностей природных каталитически активных антител: ДНК и РНК-гидролизующей, протеолитической, амилолитической, нуклеотидфосфатазной [Nevinsky G.A. et al., 2005-2020; Ermakov E.A. et al., 2020]. Ряд работ посвящен иммуноглобулинам с оксидоредуктазными активностями. Обнаружены супероксиддисмутазная [Smirnova L.P. et al., 2020] и каталазная [Ermakov E.A. et al., 2017; Жерулик С.В. и др., 2017] активности IgG человека. Показано, что поликлональные IgG крови здоровых крыс линии Wistar обладают зависимой от пероксида водорода пероксидазной и независимой от пероксида водорода оксидоредуктазной активностями [Ikhmyangan E.N. et al., 2005, 2006]. Ряд работ посвящен пероксидазной активности антител человека [Жильцов И.В. и др., 1998; Konogev M.R. et al., 1999; Коротина О.Л. и др., 2015], но ни в одной из них не приведено доказательств ее принадлежности антителам и не изучены их ферментативные свойства. Такое исследование является исключительно важным, так как изучение оксидоредуктазных активностей иммуноглобулинов в норме и при патологии позволяет выявить их возможную роль в регуляции уровня АКМ. Большинство известных на сегодня каталитических активностей антител обнаруживается при различных заболеваниях, в том числе аутоиммунных патологиях. В связи с этим представляется актуальным исследование уровня пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей антител у больных системной красной волчанкой и рассеянным склерозом.

Целью работы являлось исследование пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей природных иммуноглобулинов класса G человека в норме и при патологии.

В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1. Доказать, что пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG крови здоровых доноров, а также больных системной красной волчанкой (СКВ) и рассеянным склерозом (РС) являются собственным свойством антител.

2. Проанализировать влияние различных ионов металлов на ферментативные активности поликлональных иммуноглобулинов класса G здоровых доноров в сравнении с IgG крыс линии Wistar, как модели данного исследования.

3. Исследовать субстратную специфичность IgG крови здоровых доноров в реакциях окисления различных соединений.

4. Провести сравнение эффективности окисления различных субстратов антителами сыворотки крови здоровых доноров и больных СКВ и РС.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе впервые проведено исследование пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG здоровых доноров и больных СКВ и РС. С помощью ранее разработанных критериев доказано, что эти активности являются собственным свойством антител. Показано, что пероксидазной активностью обладают Fab- и F(ab)₂-фрагменты IgG. Исследована зависимость пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG крыс линии Wistar и человека от ионов различных металлов, и их сочетаний. Впервые показано, что IgG человека обладают широкой субстратной специфичностью и окисляют 3'-диаминобензидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоиклоту), α-нафтол, о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Выявлено, что уровень пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG в реакции окисления ряда исследуемых субстратов значительно отличается при РС и СКВ по сравнению со здоровыми донорами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Поликлональные IgG крови здоровых доноров обладают пероксидажной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, которые являются собственным свойством антител. Окисление 3,3'-диаминобензидаина иммуноглобулинами класса G здоровых доноров катализируют Fab- и F(ab)₂-фрагменты IgG.

2. Поликлональные IgG крыс линии Wistar не окисляют 3,3'-диаминобензидин в отсутствие ионов металлов. Их пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности являются зависимыми как от одного из ионов металлов с переменной валентностью Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , так и от их различных комбинаций друг с другом, а также с ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , и Zn^{2+} . Оптимальными для катализа являются пары $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$ и $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$.

3. Поликлональные IgG здоровых доноров обладают не только металл-зависимой, но и независимой от ионов металлов пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, которые возрастают в присутствии Cu^{2+} и Mn^{2+} .

4. Поликлональные IgG крови здоровых доноров обладают широкой субстратной специфичностью и окисляют с различной эффективностью классические субстраты пероксидазы хрена: 3,3'-диаминобензидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксислоту), α -нафтол, о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Субстратная специфичность IgG в случае пероксидазного окисления данных субстратов шире, по сравнению с их пероксид-независимой оксидоредуктазной специфичностью.

5. Поликлональные иммуноглобулины класса G сыворотки крови больных системной красной волчанкой и больных рассеянным склерозом обладают пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, которые являются собственным свойством антител. Уровень пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG в реакции окисления исследуемых субстратов значительно отличается при РС и СКВ по сравнению со здоровыми донорами.

Публикации и апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 5 статей, из которых 4 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Материалы диссертации представлены на конференциях: VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), Всероссийская мультиконференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 158 страницах, содержит 52 рисунка, 10 схем, 9 таблиц и приложение, включающее 6 таблиц. Библиография включает 289 литературных источников.

Вклад автора. Основные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Анализ содержания металлов в сыворотке крови и препаратах IgG проведен к.х.н. Н.П. Заксас (ИНХ СО РАН).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Оксидоредуктазные активности IgG сыворотки крови человека

Препараты IgG выделены из сыворотки крови здоровых доноров, больных системной красной волчанкой и рассеянным склерозом методом аффинной хроматографии на протеин G-сефарозе в условиях удаления неспецифически связавшихся с антителами белков и селективной элюции IgG согласно разработанному ранее методу, обеспечивающему удаление примесей [Polosukhina D.I. et al., 2004]. Гомогенность препаратов IgG во всех случаях подтверждена с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих (в присутствии 1,4-дителиотреита (ДТТ)), и невосстанавливающих (в отсутствие ДТТ) условиях (**рис. 1**).

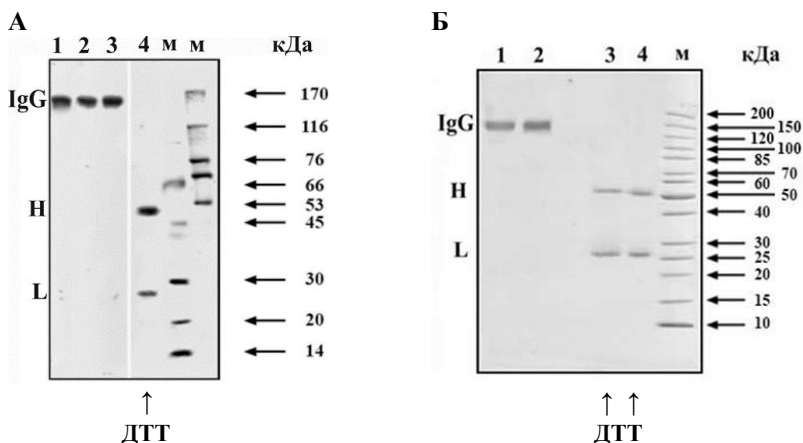


Рис. 1. Анализ гомогенности препаратов IgG крови здоровых доноров (А, дор. 1, 2, 3, 4), эквимольных смесей десяти препаратов IgG больных СКВ (Б, дор. 1, 3) и одиннадцати препаратов больных РС (Б, дор. 2, 4) в градиентном 4–18% SDS-PAGE до и после восстановления антител с помощью ДТТ. м – белковые маркеры. Белки окрашены нитратом серебра.

Для сравнения уровня пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными заболеваниями определены кажущиеся значения k_{cat} окисления субстрата пероксидазы хрена 3,3'-диаминобензидина (ДАВ) препаратами IgG здоровых доноров (IgG-ЗД), препаратами IgG пациентов с СКВ (IgG-СКВ), а также с РС (IgG-РС) в присутствии и в отсутствие

H_2O_2 . Согласно полученным данным (рис. 2), медианный уровень пероксидазной активности препаратов IgG-СКВ достоверно выше в 1,8 раза ($p < 0,05$), а пероксид-независимой оксидоредуктазной в 1,9 раза выше ($p < 0,05$), чем у здоровых доноров. При рассеянном склерозе медианный уровень пероксидазной активности IgG оказался статистически значимо ниже, чем у здоровых людей и больных СКВ в 1,6 и 2,9 раза соответственно ($p < 0,05$). Подобная закономерность наблюдалась и для пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG-РС, которая оказалась в 2,1 и 4,0 раза ниже ($p < 0,05$) активности IgG-ЗД и IgG-СКВ.

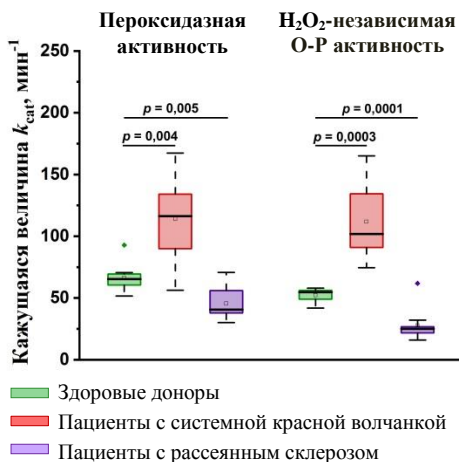


Рис. 2. Сравнение уровня активности IgG здоровых доноров, больных СКВ и больных РС при окислении DAB (0,93 мМ) в присутствии H_2O_2 (10 мМ) (пероксидазная активность) и в ее отсутствие (H_2O_2 -независимая О-Р активность).

Кажущиеся значения k_{cat} рассчитаны как $V_{max}/[IgG]$, где $[IgG]$ – общая концентрация белка в реакционной смеси.

Значимость различий между группами (p) оценена с помощью U-критерия Манна-Уитни, значения $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

2. Доказательство принадлежности каталитической активности иммуноглобулинов класса G

Для доказательства того, что обе как пероксидазная, так и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG являются собственным свойством антител, использовали ряд общепринятых критериев [Nevinsky G.A., et al., 2005].

Одним из критериев является *сохранение активности после гель-фильтрации иммуноглобулинов в кислой среде*. В этих условиях происходит диссоциация и последующее разделение нековалентных комплексов, в частности иммунокомплексов, состоящих из иммуноглобулинов разных классов, связанных с различными антигенами. Инкубация препаратов IgG при pH 3,0 и их последующая гель-фильтрация в этих же условиях не приводила к исчезновению пероксидазной активности IgG в реакции окисления DAB (рис. 3). Кроме того, для всех исследованных препаратов IgG профиль оптической плотности ($\lambda = 280$),

полученный в результате гель-фильтрации, совпадал с профилем пероксидазной активности, то есть каталитической активностью обладали только фракции IgG. Аналогичная картина наблюдалась и при анализе пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG.

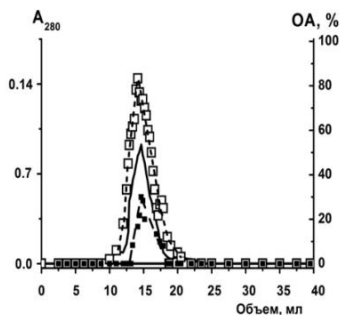


Рис. 3. Профиль гель-фильтрации на колонке Superdex-200 при pH 3,0:

(-) – оптическое поглощение элюата при $\lambda = 280$ нм;

(□) – профиль относительной пероксидазной активности IgG в реакции окисления DAB (0,93 мМ);

(■) – профиль относительной пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG в реакции окисления DAB (0,93 мМ);

ОА – относительная активность.

За 100% принят максимальный уровень активности IgG до гель-фильтрации.

Также одним из критериев является *полная адсорбция ферментативной активности IgG в результате специфического взаимодействия абзимов с аффинными сорбентами*. При проведении аффинной хроматографии препаратов IgG на сорбенте с иммобилизованными мышинными моноклональными антителами к легким цепям IgG человека, наблюдалось количественное связывание IgG с сорбентом и, как следствие, исчезновение ферментативной активности в растворе. Связавшиеся IgG элюировали при pH 2,6. Полученные фракции IgG выдерживали при нейтральных значениях pH, после чего оценивали пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности каждой из фракций (рис. 4).

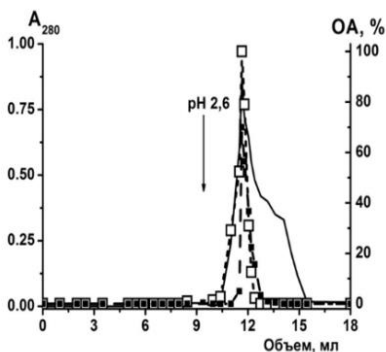


Рис. 4. Профиль аффинной хроматографии IgG на сорбенте с иммобилизованными мышинными моноклональными IgG против легких цепей IgG человека:

(-) – оптическое поглощение элюата при $\lambda = 280$ нм;

(□) – профиль относительной пероксидазной активности IgG в реакции окисления DAB (0,93 мМ);

(■) – профиль относительной пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG в реакции окисления DAB;

ОА – относительная активность. За 100% принят максимальный уровень активности IgG.

Как в случае препаратов антител крови здоровых доноров, так и больных СКВ и РС, профиль оптической плотности, полученный в результате аффинной хроматографии, совпадал с профилями тестируемых активностей, что свидетельствует о принадлежности каталитической активности непосредственно IgG.

Еще одним критерием является *каталитическая активность Fab- и F(ab)₂-фрагментов иммуноглобулинов*. Для анализа активности Fab-, F(ab)₂-фрагментов IgG здоровых доноров, определены кажущиеся k_{cat} реакции окисления 3,3'-диаминобензида Fab-, F(ab)₂- и их Fc-фрагментами эквимольной смеси 10 препаратов IgG (IgG_{mix}). Так как ранее показано, что оксидоредуктазные активности антител крыс линии Wistar являются металлозависимыми [Ikhmyangan E.N. et al., 2006], анализ активности фрагментов IgG проводили, в том числе, в присутствии ионов Mn²⁺ и после диализа антител против EDTA. Как Fab-, так и F(ab)₂-фрагменты IgG_{mix} обладали высокой пероксидазной активностью, значения их кажущихся k_{cat} составили 62 мин⁻¹ и 90 мин⁻¹ соответственно. В присутствии 3 мМ MnCl₂ активность Fab- и F(ab)₂-фрагментов увеличивалась (кажущиеся $k_{cat} = 155$ мин⁻¹ и 230 мин⁻¹ соответственно), а после диализа против EDTA уменьшалась (кажущиеся $k_{cat} = 26$ мин⁻¹ и 40 мин⁻¹, соответственно) (рис. 5). Пероксидазная активность недиализованых Fc-фрагментов IgG после отщепления F(ab)₂ ($k_{cat} = 4,5$ мин⁻¹) и Fab ($k_{cat} = 3,0$ мин⁻¹) была приблизительно в 20 и 21 раз ниже активности соответствующих им F(ab)₂ и Fab. Таким образом, Fab- и F(ab)₂-фрагменты IgG здоровых доноров катализируют окисление DAB.

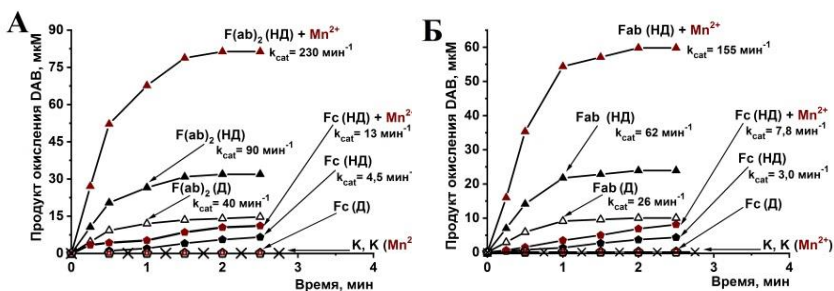


Рис. 5. Окисление DAB (0,93 мМ) препаратами Д- и НД-F(ab)₂ IgG_{mix} (450 нМ) и его Fc-фрагмента (450 нМ) (А), Fab IgG_{mix} (450 нМ) и его Fc-фрагмента (450 нМ) (Б) в присутствии и в отсутствие ионов Mn²⁺. К – окисление DAB в отсутствие IgG. Средняя ошибка определения количества образовавшегося продукта реакции в каждый момент времени не превышала 7–15%

Однозначным критерием отнесения активности непосредственно антителам является *метод определения активности IgG in situ и выявление активности у их изолированных цепей*. После SDS–

электрофоретического разделения IgG-ЗД, IgG-СКВ и IgG-РС их пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности выявляли с помощью инкубации геля в реакционной смеси, содержащей DAB и H₂O₂ (в случае пероксидазной активности). Полоса продукта окисления субстрата выявлялась только в тех участках геля, которые соответствовали расположению IgG (рис. 6). В качестве контроля использовали пероксидазу хрена (ПХ). Как легкие, так и тяжелые цепи IgG человека, полученные восстановлением антител с помощью ДТТ, обладали активностью, и окисляли DAB, подобно легким и тяжелым цепям IgG крыс [Khmyangan E.N. et al., 2005, 2006]. Так как в присутствии SDS происходит разрушение всех белковых комплексов, идентификация активностей в участках геля, соответствующих только интактным молекулам IgG и их разделенным цепям, и отсутствие других окрашенных полос, свидетельствующих о присутствии каких-либо белков со схожими активностями, является однозначным и достоверным доказательством того, что IgG обладают пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями.

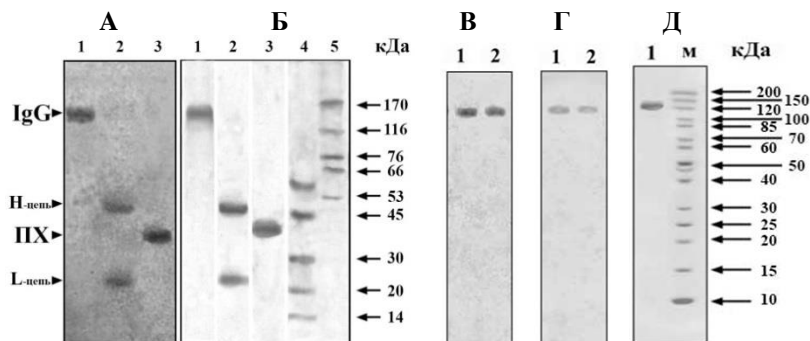


Рис. 6. *А, Б* – Анализ *in situ* пероксидазной активности IgG здоровых доноров с помощью градиентного 4–18% SDS–PAGE до (*А, дор. 1* и *Б, дор. 1*) и после (*А, дор. 2*, и *Б дор.2*) восстановления антител с помощью ДТТ.

В, Г, Д – Тестирование *in situ* пероксидазной (*В*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (*Г*) активности IgG больных СКВ (дор. *1 В, Г*) и РС (дор. *2 В, Г*) с помощью градиентного 4–18% SDS–PAGE.

А, В – гель, инкубированный в реакционной смеси с DAB и H₂O₂; *Г* – гель, инкубированный в реакционной смеси с DAB; *Б, Д* – гель, окрашенный серебром. ПХ – пероксидаза хрена, м – белковые маркеры.

Таким образом, на основании выполнения всех вышеперечисленных критериев показано, что пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности являются собственным свойством IgG здоровых доноров, больных системной красной волчанкой и больных рассеянным склерозом.

3. Влияние ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG

Ферментативная активность многих оксидоредуктаз часто зависит от ионов переходных металлов или их сочетания с металлом с постоянной валентностью. В связи с этим, важно проанализировать, как и какие ионы металлов и их сочетания влияют на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности антител человека. На первом этапе данного исследования в качестве модели использовали IgG сыворотки крови здоровых неиммунизированных крыс линии Wistar. В ряде работ показано, что оксидоредуктазные активности антител крыс являются металлозависимыми [Ikhtmyangan E.N. et al., 2006]. В тоже время, пулы IgG, выделенных из сывороток разных животных одной линии, содержащихся в одинаковых условиях, являются более близкими по составу, чем пулы антител сывороток различных людей. В связи с тем, что в работе использованы поликлональные препараты IgG, такой подход позволил на первом этапе получить статистически достоверные результаты по металлозависимости активностей IgG крыс, а на следующем этапе на основе данных результатов изучить металлозависимость препаратов IgG человека.

3.1. Анализ влияния ионов различных металлов на пероксидазную и оксидоредуктазную активности IgG крови крыс линии Wistar

Из крови крыс линии Wistar по стандартному протоколу выделения антител получены 9 препаратов IgG. Согласно данным SDS-электрофореза в ПААГ в восстанавливающих (в присутствии ДТТ) и невосстанавливающих (в отсутствие ДТТ) условиях, все препараты IgG являлись электрофоретически гомогенными. Так как исследуемые IgG крыс поликлональны и могут являться смесью различных подфракций антител, способных окислять субстраты, используя один или два иона металла как одинаковых, так и различных, проведено сравнение влияния ионов разных металлов (0,1–5,0 мМ) и их комбинаций на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности препаратов антител, как диализованных против ЭДТА (Д-IgG), так и недиализованных (НД-IgG).

После диализа все препараты IgG крыс полностью утрачивали как пероксидазную, так и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности, которые восстанавливались при добавлении ионов различных металлов и их сочетаний. Наиболее значимые результаты получены в присутствии ионов меди, марганца, цинка и их комбинаций.

При добавлении иона Cu^{2+} наблюдались двухфазные зависимости, характеризующие рост данных активностей при увеличении

концентрации ионов меди для всех НД-IgG, в то время как Д-IgG оставались неактивными в диапазоне концентраций CuCl_2 от 0 до 1,5–2,0 мМ (рис. 7 А, Б).

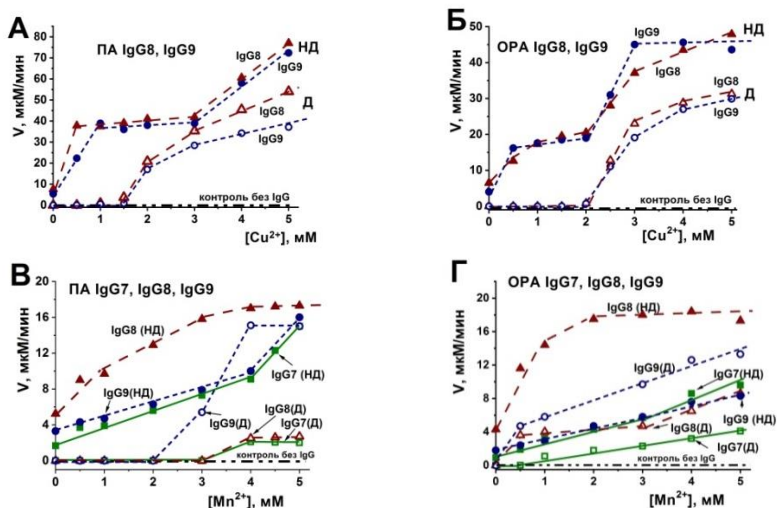


Рис. 7. Зависимость пероксидазной (А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (Б) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации CuCl_2 и от концентрации MnCl_2 . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции для каждой из концентраций Me^{2+} составляла 5–10%.

Обе активности препаратов недиализованных IgG крыс возросли и с увеличением концентраций Mn^{2+} . В отличие от Cu^{2+} , ионы Mn^{2+} при низких концентрациях (<2 мМ) приводили к появлению пероксид-независимой оксидоредуктазной активности диализованных препаратов IgG (рис. 7 Г), а пероксидазную активировали только при концентрации >3 мМ (рис. 7 В). При этом активность антител оставалась низкой. В присутствии эквимольной смеси ионов Cu^{2+} и Mn^{2+} появлялась активность диализованных препаратов, отсутствовавшая ранее, причем наблюдался ее резкий рост с увеличением концентрации металлов (рис. 8). В то время, как ионы Cu^{2+} только при высоких концентрациях активировали диализованные препараты антител (рис. 7 А, Б), а Zn^{2+} не активировал их совсем (рис. 9), в присутствии пары $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ появлялась активность диализованных препаратов при низких концентрациях металлов, и зависимости обеих активностей диализованных и недиализованных антител становились схожими (рис. 10).

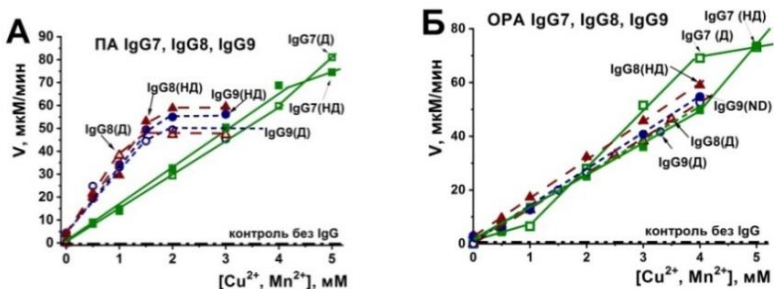


Рис. 8. Зависимость пероксидазной (*A*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (*B*) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси CuCl_2 и MnCl_2 . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции для каждой из концентраций CuCl_2 + MnCl_2 не превышала 5–10%.

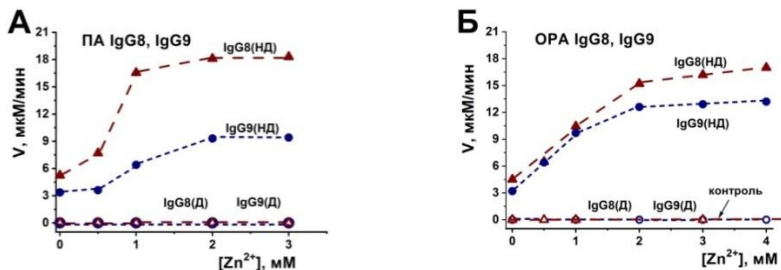


Рис. 9. Зависимость пероксидазной (*A*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (*B*) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации ZnCl_2 . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции для каждой из концентраций ZnCl_2 не превышала 5–10%.

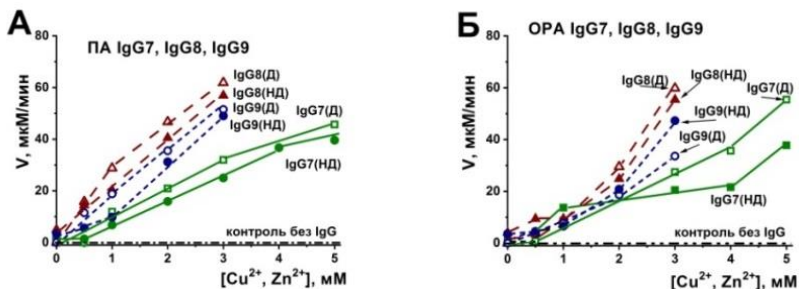


Рис. 10. Зависимость пероксидазной (*A*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (*B*) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси CuCl_2 и ZnCl_2 . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции для каждой из концентраций CuCl_2 + ZnCl_2 не превышала 5–10%.

Ионы меди, железа и их комбинации с ионами марганца и цинка увеличивали активность IgG в присутствии и в отсутствие пероксида водорода, в то время как ионы магния, кобальта и никеля выступали в качестве слабых активаторов окисления DAB. Ионы Ca^{2+} ингибировали окисление субстрата в присутствии ионов меди, возможно, вследствие конкуренции с ионами Cu^{2+} за связывание с молекулами антител или уменьшения окислительного потенциала меди в составе комплекса $\text{IgG}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{Ca}^{2+}$. В присутствии эквимольных смесей таких пар ионов, как $\text{Cu}^{2+} + \text{Co}^{2+}$ или $\text{Cu}^{2+} + \text{Ni}^{2+}$, кривые зависимости скорости реакции от концентрации ионов характеризовались слабым подъёмом при увеличении концентраций солей. Таким образом, ионные пары $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$ и $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ являлись оптимальными для катализа антителами пероксидазного и пероксид-независимого оксидоредуктазного окисления DAB.

3.2. Исследование влияния ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови здоровых доноров, пациентов с СКВ и пациентов с РС

Для изучения влияния ионов металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG здоровых доноров, препараты антител диализованы против 0,1 М EDTA и 0,1 М EGTA, после чего определены их относительные активности в реакции окисления DAB (0,93 мМ). В отличие от IgG крыс, как пероксидазная, так и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG человека после диализа значительно снижались, однако не исчезали полностью (**рис. 11**).

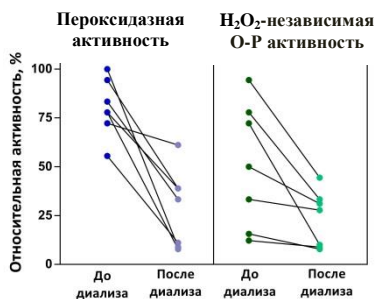


Рис. 11. Относительная пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности индивидуальных препаратов IgG крови здоровых доноров до и после диализа антител против EDTA и EGTA.

Каждая величина определена как среднее значение трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

Значение пероксидазной активности одного из недиализованых препаратов IgG принимали за 100%.

Относительная пероксидазная активность уменьшалась в зависимости от анализируемого препарата IgG в 1,2–11,2 раза, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная снижалась в 1,2–7,2 раза. С помощью атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров в двухструйном

дуговым плазмотроне показано, что диализованные антитела не содержали какие-либо ионы металлов, следовательно, IgG человека обладают как металл-зависимой, так и металл-независимой пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, причем их соотношение индивидуально и значительно отличается для каждого из препаратов поликлональных IgG.

Для анализа зависимости исследуемых активностей IgG человека от различных ионов металлов, использовали эквимоллярную смесь (IgG_{mix}) десяти индивидуальных препаратов антител здоровых доноров. Согласно полученным данным, относительная пероксидазная активность диализованного, не содержащего эндогенных ионов металлов препарата IgG_{mix}, возрастала в присутствии экзогенных ионов Cu²⁺ (в 1,8 раз) и Fe²⁺ (в 3,0 раза) (рис. 12 А). Относительная пероксид-независимая оксидоредуктазная активность диализованного IgG_{mix} увеличивалась после добавления ионов Mn²⁺ (в 1,1 раза), Cu²⁺ (в 2,1 раза) и Fe²⁺ (в 4,2 раза) (рис. 12 Б). Ионы Cu²⁺ и Mn²⁺ увеличивали в 1,5–1,6 раза и пероксид-независимую активность недиализованного препарата IgG_{mix}, а также являлись лучшими активаторами его пероксидазной активности.

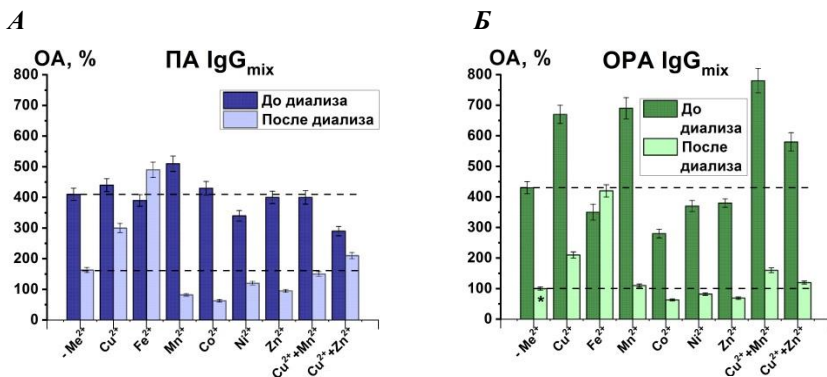


Рис. 12. Относительные пероксидазная (А) и пероксид-независимая оксидоредуктазная (Б) активности диализованного против EDTA и EGTA и недиализованного препарата IgG_{mix} в присутствии ионов двухвалентных металлов (1 мМ).

*Активность (%) диализованного препарата IgG_{mix} в реакции оксидоредуктазного окисления DAB (0,93 мМ) в отсутствие экзогенных ионов металлов принимали за 100%.

ОА – относительная активность, (–) – уровень ОА IgG_{mix} в отсутствие экзогенных ионов металлов.

В тоже время, в отличие от антител крыс линии Wistar, эквимоллярные ионные пары Cu²⁺ + Mn²⁺ и Cu²⁺ + Zn²⁺ активировали только пероксид-независимую оксидоредуктазную активность IgG здоровых доноров (рис. 12 Б). Полученные данные свидетельствуют о чрезвычайно сложных

зависимостях относительных пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG от различных ионов металлов, используемых как отдельно, так и в различных комбинациях.

С помощью хроматографии антител на сорбенте Chelex-100, хелатирующем ионы металлов, исследована гетерогенность средства абзимов с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями к ионам разных металлов. На сорбент Chelex-100 наносили эквимольную смесь препаратов IgG десяти здоровых доноров (IgG_{mix}). Сорбированные IgG элюировали с помощью буфера, содержащего 0,3–1,0 М NaCl и, в заключение, этим же буфером, содержащим 100 мМ EDTA. Аликвоты полученных фракций IgG_{mix} использовали для определения их относительных удельных пероксидазной или пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей при окисления DAB в присутствии и в отсутствие ионов Cu²⁺ (рис. 13). Максимальными удельными активностями обладали фракции антител, элюированные высокими концентрациями NaCl, обладавшие максимальным средством к сорбенту.

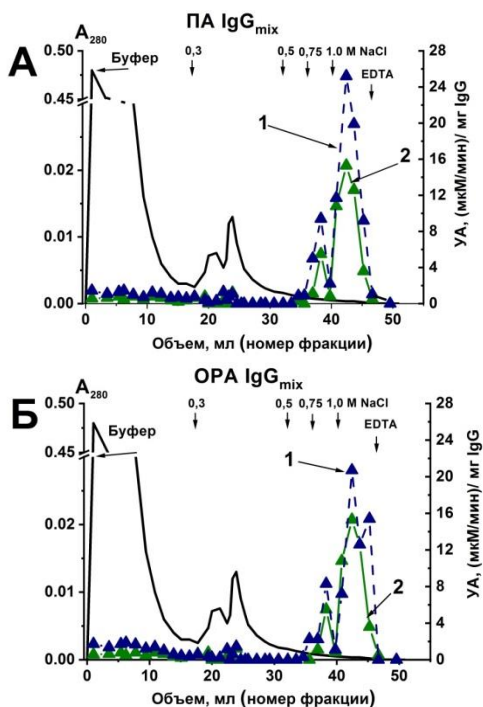


Рис. 13. Хроматография IgG_{mix} здоровых доноров на сорбенте Chelex-100:

(—) — оптическое поглощение элюата при 280 нм;

(А) — удельная пероксидазная активность (ПА) фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ CuCl₂;

(Б) — удельная пероксид-независимая оксидоредуктазная активность (ОПА) фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ CuCl₂.

Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из фракций IgG_{mix} не превышала 5–10%.

Для фракций IgG № 24 и № 43, полученных в результате разделения IgG_{mix} на сорбенте Chelex-100 и соответствующих 24 и 43 мл элюата, определены значения K_m , k_{cat} , характеризующие окисление DAB (табл. 1).

Таблица 1. Величины K_m и k_{cat} окисления DAB фракциями № 24 и № 43 после разделения IgG_{mix} на сорбенте Chelex-100 (рис. 13)

Условия	Фракция № 24		Фракция № 43	
	$K_m \times 10^4$ (М)*	$k_{cat} \times 10^{-2}$ (мин ⁻¹)	$K_m \times 10^4$ (М)	$k_{cat} \times 10^{-3}$ (мин ⁻¹)
Пероксидазная активность				
В отсутствие Cu²⁺	8,5 ± 1,2	3,3 ± 0,4	4,4 ± 0,5	2,0 ± 0,3
+ 5 мМ Cu²⁺	7,2 ± 1,0	2,8 ± 0,3	3,6 ± 0,4	2,8 ± 0,4
Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность				
В отсутствие Cu²⁺	–	~ 0	8,0 ± 1,0	1,9 ± 0,2
+ 5 мМ Cu²⁺	7,5 ± 1,0	4,1 ± 0,6	5,8 ± 0,7	2,7 ± 0,3

*Величины K_m и k_{cat} оценивали с помощью двойных обратных координат Лайнуивера–Берка. Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %

Показано, что для фракции IgG, элюированной раствором 0,3 М NaCl (фракция № 24), и фракции, элюированной раствором 1 М NaCl (фракция № 43), значения K_m при окислении DAB близки с учетом погрешности. В то же время, каталитическая активность IgG, относящихся к фракции № 43 при окислении DAB была как в присутствии, так и в отсутствие ионов меди, на порядок выше активностей фракции № 24, элюированной низкой концентрацией соли. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе хроматографии происходит специфическое разделение отдельных фракций антител, имеющих различное сродство к сорбенту, и эти фракции отличаются по эффективности окисления DAB.

Таким образом, в общем пуле поликлональных абзимов человека присутствует множество специфических моноклональных IgG с пероксидазной и оксидоредуктазной активностями, являющихся как металл-зависимыми, так и металл-независимыми и обладающих разной степенью сродства к ионам металлов. Эти результаты согласуются с данными по гетерогенности IgG с каталазой [Ermakov E.A. et al., 2017] и супероксиддисмутазной [Smirnova L.P. et al., 2020] активностями, а также с общей картиной чрезвычайного разнообразия поликлональных абзимов человека [Nevinsky G.A. et al., 1998-2020].

4. Субстратная специфичность IgG крови здоровых доноров, пациентов с СКВ и пациентов с РС при окислении различных соединений

Пероксидазы и оксидоредуктазы растений и млекопитающих

характеризуются широкой субстратной специфичностью и окисляют различные органические соединения, такие как ароматические амины, фенолы, нафтолы и катехоламины [Ferrari R.P. et al., 1993; Monzani E. et al., 1997]. Поэтому для анализа субстратной специфичности иммуноглобулинов класса G здоровых доноров, а так же больных системной красной волчанкой и рассеянным склерозом, проведено исследование кинетических параметров, характеризующих окисление антителами ароматических соединений различной структуры: 3,3'-диаминобензидина (DAB), *o*-фенилендиамина (OPD), 3-амино-9-этилкарбазола (AEC), α -нафтола, гидрохинона, гомованилиновой кислоты (HVA) и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонокислоты) (ABTS). Кроме того, известно, что пероксидазы млекопитающих способны окислять функционально активные органические субстраты [Singh A.K. et al., 2009], поэтому в качестве субстратов также использовали 5-аминосалициловую кислоту (5-AS) и адреналин (рис. 14).

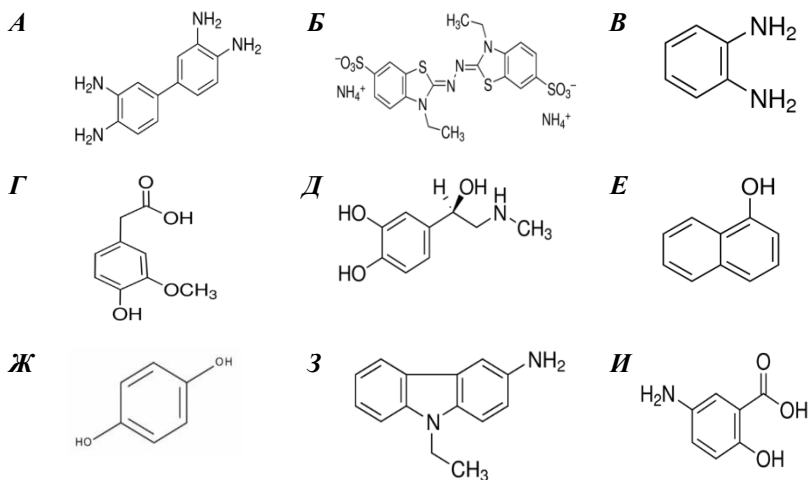


Рис. 14. Структурные формулы субстратов: DAB (А), ABTS (Б), OPD (В), HVA (Г), адреналин (Д), α -нафтол (Е), гидрохинон (Ж), AEC (З), 5-AS (И).

Препараты антител здоровых доноров, больных СКВ и больных РС обладали схожей субстратной специфичностью и в присутствии пероксида водорода окисляли все представленные субстраты кроме адреналина, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная активность IgG выявлена только при окислении трех соединений: DAB, ABTS и OPD. Исключением являлся только гидрохинон, так как окислялся всеми препаратами антител крови больных СКВ и РС, и только двумя препаратами антител здоровых доноров.

Определены значения K_m и k_{cat} , характеризующие окисление DAB, ABTS, OPD и АЕС IgG сыворотки крови здорового донора, больного СКВ, больного РС и пероксидазой хрена (ПХ). Средство к исследуемым субстратам для препаратов антител оказалось с учетом погрешности близким друг к другу и сопоставимым со средством для данных субстратов для пероксидазы хрена. В то время как активность IgG по сравнению с ферментом была на 2–3 порядка ниже (**табл. 2**).

Таблица 2. Величины K_m и k_{cat} , характеризующие окисление DAB, ABTS, OPD и АЕС препаратами IgG крови здорового донора, пациента с СКВ, пациента с РС и пероксидазой хрена (ПХ) в присутствии и в отсутствие H_2O_2 .

Субстрат	IgG-ЗД		IgG-СКВ		IgG-РС		ПХ	
	$K_m \times 10^4$ (М)	k_{cat} (мин ⁻¹)	$K_m \times 10^4$ (М)	k_{cat} (мин ⁻¹)	$K_m \times 10^4$ (М)	k_{cat} (мин ⁻¹)	$K_m \times 10^4$ (М)	k_{cat} (мин ⁻¹)
DAB +H ₂ O ₂	9,3 ± 0,8	57,0 ± 5,0	10 ± 1,0	62,0 ± 5,8	9,6 ± 0,8	45,4 ± 5,0	0,7 ± 0,1*	11000 ± 300*
DAB -H ₂ O ₂	8,5 ± 0,7	44,0 ± 4,0	8,4 ± 0,8	51,0 ± 4,9	7,4 ± 0,6	30,3 ± 2,9	10,0 ± 2,5*	450 ± 20*
ABTS +H ₂ O ₂	5,3 ± 0,4	64,0 ± 6,1	5,0 ± 0,4	321,0 ± 25,0	4,7 ± 0,4	169,0 ± 14,0	2,9 ± 0,3	10520 ± 740
ABTS -H ₂ O ₂	8,9 ± 0,6	41,6 ± 3,5	6,0 ± 0,5	385,0 ± 31,0	5,9 ± 0,5	68,0 ± 5,2	4,7 ± 0,6	9302 ± 560
OPD +H ₂ O ₂	18,0 ± 1,5	0,78 ± 0,06	17,0 ± 2,0	1,2 ± 0,2	9,3 ± 0,8	1,6 ± 0,2	5,4 ± 1,3	21000 ± 300
АЕС +H ₂ O ₂	2,7 ± 0,3	153,0 ± 15,0	–	–	–	–	0,86 ± 0,07	6250 ± 750

Величины K_m и k_{cat} оценивали с помощью двойных обратных координат Лайнуивера–Берка. *-данные значения определены в работах [Ikhtmyangan E.N. et al., 2005, 2006].

Для всех препаратов IgG здоровых доноров, пациентов с СКВ и пациентов с РС определены значения кажущихся k_{cat} характеризующие окисление исследуемых субстратов при их фиксированной концентрации в присутствии пероксида водорода – пероксидазная активность и в его отсутствие – пероксид-независимая оксидоредуктазная активность. Кажущиеся величины k_{cat} рассчитаны как $V_{max}/[IgG]$, где $[IgG]$ – общая концентрация белка в реакционной смеси.

Сравнительный анализ каталитической активности IgG показал, что для всех исследуемых субстратов медианный уровень обеих активностей антител при СКВ достоверно выше, чем у здоровых доноров (**рис. 15**). Максимальное отличие скорости окисления субстрата антителами при СКВ по сравнению со здоровыми донорами наблюдалось при окислении

таких соединений, как гидрохинон, 5-AS и ABTS. Пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности препаратов IgG-СКВ при окислении ABTS в 3,8 и 4,8 раз соответственно выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$). Медианный уровень пероксидазной активности препаратов IgG-СКВ для ряда субстратов достоверно выше активности IgG-ЗД: в 23,5 раз для 5-AS; в 3,2 раза для α -нафтола; в 2,2 раза для АЕС ($p < 0,05$ для всех значений).

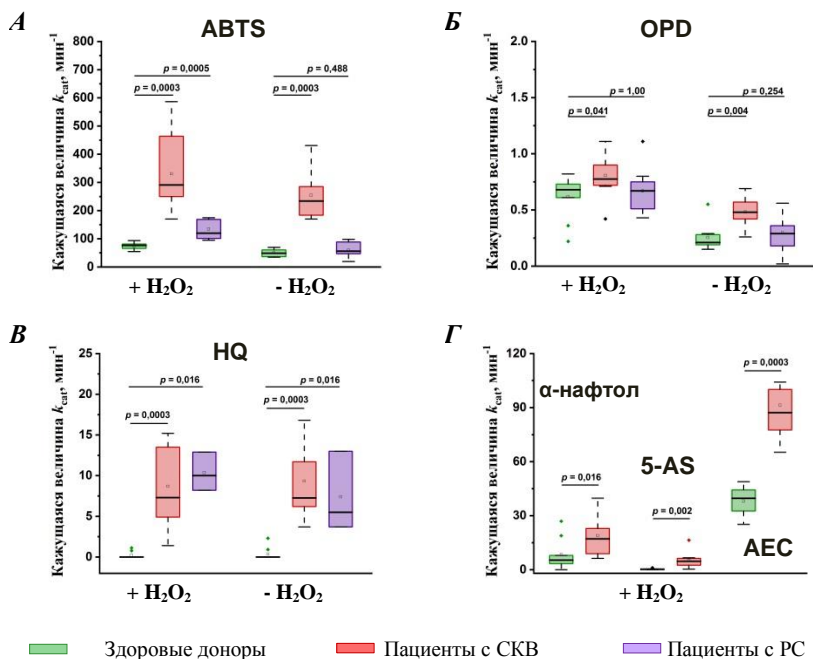


Рис. 15. Сравнение уровня активности IgG здоровых доноров, больных СКВ и больных РС при окислении ABTS (0,36 мМ) (А); OPD (0,19 мМ) (Б); HQ (0,12 мМ) (В); α -нафтола (0,07 мМ), 5-AS (0,38 мМ) и АЕС (0,19 мМ) (Г) в присутствии H_2O_2 (пероксидазная активность) и в ее отсутствие (H_2O_2 -независимая О-Р активность).

Кажущиеся значения k_{cat} рассчитаны как $V_{max}/[\text{IgG}]$, где $[\text{IgG}]$ – общая концентрация белка в реакционной смеси. Значимость различий между группами (p) оценена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Минимальное достоверное отличие скорости окисления субстрата антителами при СКВ по сравнению со здоровыми донорами, как в присутствии (в 1,2 раза), так и в отсутствие пероксида водорода (в 1,8 раз) наблюдалось в случае OPD. Стоит отметить, что значения k_{cat} реакции окисления OPD препаратами IgG пациентов с РС, СКВ и здоровых людей

были относительно низкими, следовательно, данный субстрат все препараты антител окисляли с наименьшей эффективностью.

Значимое отличие уровня активностей антител больных рассеянным склерозом от здоровых доноров в случае исследуемых субстратов наблюдалось при окислении DAB и ABTS. Согласно полученным данным, при окислении DAB обе активности IgG-PC ниже, чем у здоровых доноров (**рис. 2**). При окислении ABTS медианный уровень пероксидазной активности IgG-PC оказался статистически значимо выше, чем у здоровых людей в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, уровень пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG в реакции окисления данных субстратов отличается при рассеянном склерозе и системной красной волчанке по сравнению со здоровыми донорами.

Заключение

В данной работе впервые проведено исследование пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG здоровых доноров, а также больных системной красной волчанкой и больных рассеянным склерозом. Применение ранее разработанных строгих критериев позволило однозначно доказать принадлежность данных активностей иммуноглобулинам класса G. Впервые продемонстрировано, что IgG человека могут эффективно окислять различные соединения, причем при СКВ происходит увеличение активности антител при окислении большинства исследуемых субстратов. В настоящее время биологическая роль IgG с оксидоредуктазными активностями в организме человека окончательно не определена. Согласно полученным в работе результатам, антитела с окислительно-восстановительными функциями, подобно другим абзимам, обладают гораздо более низкой активностью по сравнению с классическими ферментами. Однако, в отличие от канонических ферментов, концентрация иммуноглобулинов в крови очень высокая (до 10 мг/мл), и они могут циркулировать там относительно долго. Соответственно нельзя исключить, что IgG с оксидоредуктазными активностями могут выступать в качестве дополнительной природной системы детоксикации активных форм кислорода и играть важную роль в регуляции уровня АКМ.

ВЫВОДЫ

1. На основании выполнения ряда общепринятых критериев доказано, что пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности поликлональных иммуноглобулинов класса G сыворотки крови здоровых доноров являются собственным свойством антител. На примере окисления 3,3'-диаминобензидина показано, что каталитическая активность IgG здоровых доноров ассоциирована с Fab- и F(ab)₂-фрагментами.

2. Пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности препаратов поликлональных IgG крыс линии Wistar являются зависимыми как от одного из ионов металлов с переменной валентностью Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , так и от их различных комбинаций друг с другом, а также с ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , и Zn^{2+} . Оптимальными для катализа являются пары $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$ и $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$.

3. Поликлональные IgG здоровых доноров обладают не только металл-зависимой, но и независимой от ионов металлов пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, которые возрастают в присутствии Cu^{2+} и Mn^{2+} .

4. Поликлональные IgG крови здоровых доноров обладают широкой субстратной специфичностью и с различной эффективностью окисляют 3,3'-диаминобензидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоиклоту), о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, α -нафтол, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Субстратная специфичность IgG в случае пероксидазного окисления данных субстратов шире по сравнению с их пероксид-независимой оксидоредуктазной специфичностью.

5. Поликлональные иммуноглобулины класса G сыворотки крови больных системной красной волчанкой и больных рассеянным склерозом обладают пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, которые являются собственным свойством антител.

- Пероксидазная активность IgG больных системной красной волчанкой по сравнению со здоровыми донорами выше при окислении таких субстратов, как о-фенилендиамин, 3,3'-диаминобензидин, α -нафтол, 3-амино-9-этилкарбазол, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоиклоты) и 5-аминосалициловая кислота, а пероксид-независимая оксидоредуктазная выше при окислении о-фенилендиамина, 3,3'-диаминобензидина и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоиклоты).
- Уровень пероксидазной активности IgG больных рассеянным склерозом выше по сравнению со здоровыми донорами при окислении 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоиклоты) и

ниже при окислении 3,3'-диаминобензидина. Peroxidase-независимая оксидоредуктазная активность IgG больных рассеянным склерозом ниже по сравнению со здоровыми донорами при окислении 3,3'-диаминобензидина.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. **Tolmacheva A. S.**, Zaksas N. P., Buneva V. N., Vasilenko N. L., Nevinsky G. A. Oxidoreductase activities of polyclonal IgG from the sera of Wistar rats are better activated by combinations of different metal ions // Journal of Molecular Recognition. – 2009. – V. 22. – №. 1. – P. 26-37.
2. **Толмачева А. С.**, Василенко Н. Л., Заксас Н. П., Синицина О. И., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Иммуноглобулины класса G из крови здоровых крыс Wistar окисляют амины // Российский иммунологический журнал. – 2009. – Т. 3. – №. 1. – С. 39-49.
3. **Tolmacheva A. S.**, Blinova E. A., Ermakov E. A., Buneva V. N., Vasilenko N. L., Nevinsky G. A. IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans // Journal of Molecular Recognition. – 2015. – V. 28. – №. 9. – P. 565-580.
4. **Tolmacheva A. S.**, Ermakov E. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Substrate specificity of healthy human sera IgG antibodies with peroxidase and oxidoreductase activities // Royal Society Open Science. – 2018. – V. 5. – №. 1. – P. 171097.
5. **Tolmacheva A. S.**, Buneva V. N., Nevinsky G. A. Substrate specificity of IgGs with peroxidase and oxidoreductase activities from sera of patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis // Journal of Molecular Recognition. – 2019. – V. 32. – №. 12. – P. e2807.