

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Толмачева Анна Сергеевна**

**Оксидоредуктазные активности иммуноглобулинов  
класса G человека**

03.01.04 – БИОХИМИЯ

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.х.н., профессор Невинский Г.А.

Новосибирск – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Активированные кислородные метаболиты и ферментативная система их детоксификации.....	12
1.1.1. Супероксиддисмутаза.....	16
1.1.2. Каталаза.....	19
1.1.3. Глутатионпероксидаза.....	21
1.1.4. Глутатион-S-трансфераза.....	25
1.1.5. Пероксидазы.....	25
1.1.6. Антиоксиданты неферментативной природы.....	28
1.2. Каталитически активные антитела.....	29
1.2.1. Многообразие каталитически активных антител.....	29
1.2.2. Возможные механизмы образования природных каталитически активных антител.....	32
1.2.3. Биологическая роль природных каталитически активных антител.....	33
1.2.4. Искусственные каталитически активные антитела с оксидоредуктазными активностями.....	35
1.2.5. Природные каталитически активные антитела с оксидоредуктазными активностями.....	39
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	46
2.1 Реактивы и материалы.....	46
2.2. Методы исследования.....	48
2.2.1. Приготовление препаратов сыворотки крови крыс.....	48
2.2.2. Выделение иммуноглобулинов из крови крыс.....	48
2.2.3. Выделение иммуноглобулинов G из сыворотки крови человека.....	48
2.2.4. Очистка препаратов IgG.....	49
2.2.5. Определение концентрации белка.....	49
2.2.6. Электрофоретический анализ белков.....	50
2.2.8. Определение оксидоредуктазных активностей антител.....	50
2.2.9. Исследование влияния ионов $K^+$ на оксидоредуктазные активности антител.....	51
2.2.10. Исследование влияния ионов двухвалентных металлов на оксидоредуктазные активности антител.....	52
2.2.11. Анализ оксидоредуктазных активностей антител <i>in situ</i> .....	52

2.2.12. Гель-фильтрация антител в условиях „кислого шока” .....	52
2.2.13. Аффинная хроматография антител на колонке с анти-L-сефарозой .....	53
2.2.14. Получение и очистка Fab и F(ab) <sub>2</sub> -фрагментов иммуноглобулинов класса G .....	53
2.2.15. Определение и статистическая обработка кинетических параметров реакций окисления субстратов антителами .....	54
2.2.16. Анализ содержания металлов в сыворотке крови и препаратах антител .....	55
2.2.17. Диализ препаратов антител против агентов, хелатирующих ионы металлов .....	55
2.2.18. Хроматография IgG на хелатирующем сорбенте Chelex-100 .....	56
2.2.19. Анализ содержания селена в препаратах антител .....	56
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	57
3.1. Выделение иммуноглобулинов класса G из крови здоровых доноров, больных системной красной волчанкой и рассеянным склерозом .....	58
3.2. Peroксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности иммуноглобулинов класса G здоровых доноров .....	59
3.3. Доказательство принадлежности каталитической активности антителам .....	61
3.4. Влияние ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG .....	68
3.4.1. Влияние ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови крыс линии Wistar .....	69
3.4.1.1. Анализ содержания металлов в крови крыс линии Wistar и в препаратах иммуноглобулинов G .....	69
3.4.1.2. Влияние ионов K <sup>+</sup> на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG из сыворотки крови крыс линии Wistar .....	73
3.4.1.3. Влияние ионов двухвалентных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови крыс линии Wistar .....	75
3.4.1.4. Peroксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности иммуноглобулинов G из крови крыс линии Wistar в присутствии двух различных ионов металлов .....	82
3.4.2. Анализ влияния ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови здоровых доноров .....	90
3.4.2.1. Влияние ионов двухвалентных металлов на оксидоредуктазные активности IgG крови здоровых доноров .....	93
3.4.2.2. Хроматография антител на сорбентах, хелатирующих ионы металлов .....	96

3.5. Субстратная специфичность иммуноглобулинов класса G сыворотки крови здоровых доноров при окислении различных соединений.....	104
3.6. Субстратная специфичность иммуноглобулинов класса G сыворотки крови больных рассеянным склерозом и системной красной волчанкой при окислении различных соединений.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИЗ	аутоиммунные заболевания
АКМ	активированные кислородные метаболиты
АТ	антитела
АТР	аденозин трифосфат
АФК	активные формы кислорода
ВИП	вазоактивный интестинальный пептид
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ИФА	иммуноферментный анализ
МРО	миелопероксидаза
ОБМ	основной белок миелина
ПААГ	полиакриламидный гель
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПХ	пероксидаза хрена
РС	рассеянный склероз
САЭМ	спектральный атомно-эмиссионный метод
СКВ	системная красная волчанка
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
ЭДТА	натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
5-AS	5-аминосалициловая кислота
ABTS	2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота)
АЕС	3-амино-9-этилкарбазол
АIP	аутоиммунный панкреатит
CDR	участки, определяющие комплементарность
CysGPxs	цистеинсодержащие глутатионпероксидазы
DAВ	3,3'-диаминобензидин
ДТТ	1,4-дителиотреит
EGTA	этиленгликольтетрауксусная кислота динатриевая соль
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль
ЕРО	эозинофильная пероксидаза
Fab-фрагмент	участок связывания антигена иммуноглобулином
Fc-фрагмент	кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина
FcRn	Fc-рецептор новорожденных
GPx	глутатионпероксидаза
GSH	восстановленный глутатион

GSSG	окисленный глутатион		
HNE	4-гидрокси-2-ноненаль		
HQ	гидрохинон		
HVA	гомованилиновая кислота		
IgG-ЗД	препарат IgG крови здорового донора		
IgG-PC	препарат IgG крови больного рассеянным склерозом		
IgG-СКВ	препарат IgG крови больного системной красной волчанкой		
LDH	лактатдегидрогеназа		
LPO	лактопероксидаза		
NADPH	никотинамидадениндинулеотид, восстановленный		
NDP	нуклеозиддифосфат		
NMP	нуклеозидмонофосфат		
NPGPx	неселеноцистеиновая	глутатионпероксидаза	гидроперекисей
	фосфолипидов		
NTP	нуклеозидтрифосфат		
OPD	о-фенилендиамин		
PSA	персульфат аммония		
SDS	додецилсульфат натрия		
SDS PAGE	полиакриламидный гель-электрофорез в присутствии SDS		
SecGPxs	селенсодержащие глутатионпероксидазы		
SOD	супероксиддисмутаза		
TG	тиреоглобулин		
TPO	тиреоидная пероксидаза		

## ВВЕДЕНИЕ

В аэробном организме около 5% потребляемого тканями кислорода в результате многочисленных реакций превращается в активированные кислородные метаболиты (АКМ), в том числе такие, как,  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В нормально функционирующих клетках АКМ участвуют в процессах, необходимых для жизнедеятельности, но при высоких концентрациях они могут быть опасны, так как благодаря своей реакционной способности являются сильными окислителями и вступают в реакции с различными компонентами клеток, приводя к их повреждению [1]. Если количество образующихся АКМ в клетке достигает критической величины, возникает состояние, определяемое как окислительный стресс. Данное состояние приводит к опасным для клетки биохимическим реакциям и является одной из причин множества заболеваний. В настоящее время гиперпродукцию АКМ связывают с онкологическими, нейродегенеративными, сосудистыми заболеваниями, эндокринными нарушениями, иммунологическими расстройствами, процессом старения и др. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Для защиты от окислительных повреждений в процессе эволюции в аэробных клетках сформировались ферментативная и неферментативная системы. К ферментативной системе относятся супероксиддисмутаза, катализирующая реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в молекулярный кислород и пероксид водорода, глутатионпероксидаза и глутатион-S-трансфераза, удаляющие органические перекиси, и каталаза, осуществляющая разложение пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды.

Согласно опубликованным в конце XX века данным, иммуноглобулины, единственной функцией которых являлось, как полагали прежде, взаимодействие с антигенами для нейтрализации различных компонентов чужеродных микроорганизмов и токсинов, могут обладать каталитической активностью и осуществлять множество химических реакций. Описаны ДНК и РНК-гидролизующие [11, 12], протеолитическая [13], амилолитическая [14] и нуклеотидфосфатазная [15] активности иммуноглобулинов человека.

Последние два десятилетия активно изучаются иммуноглобулины с оксидоредуктазными активностями. В 2000 году показано, что антитела человека и животных обладают супероксиддисмутазной активностью [16]. Эти данные впервые поставили вопрос о возможности участия иммуноглобулинов в защите организма от гиперпродукции АКМ. В 2005 году показано, что поликлональные IgG крови здоровых крыс линии Wistar обладают пероксидазной (зависимой от пероксида водорода) и независимой от пероксида водорода оксидоредуктазной активностью, окисляя 3,3'-

диаминобензидин [17]. Отличительной чертой этого исследования стало доказательство того, что обе наблюдаемые активности IgG являются собственной функцией антител, а не следствием загрязнения препаратов иммуноглобулинов совыделяющимися микропримесями ферментов с окислительно-восстановительными функциями. В работах [18, 19, 20, 21] описаны IgG и IgA человека с каталазной активностью у больных реактивным артритом, недифференцированным артритом, а также пациенток с новообразованиями молочной железы. В 2017 году Ермаков Е.А. с соавторами впервые доказали, что каталазная активность принадлежит непосредственно поликлональным иммуноглобулинам класса G человека [22].

В 1998 году группой Генералова проведено исследование ферментативных активностей препаратов различных подклассов IgG человека, выделенных из крови пациентов с вирусным гепатитом В, хроническим вирусным гепатитом С, а также здоровых доноров [23]. Согласно полученным данным, препараты антител обладали достоверно тестируемой пероксидазной активностью. Позднее появился еще ряд работ, в которых сообщалось о регистрируемой пероксидазной активности препаратов поликлональных иммуноглобулинов человека [24, 25], но ни в одной из них не было приведено доказательств отнесения пероксидазной активности непосредственно к антителам и не было проведено изучения их ферментативных свойств и субстратной специфичности.

В большинстве случаев антитела с различными каталитическими активностями, например, ДНК и РНК-гидролизующей или протеолитической, обнаруживаются в крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в то время как иммуноглобулины крови здоровых доноров обычно не проявляют достоверно тестируемых активностей [26, 27]. Кроме того, известно, что ферментативная активность многих оксидоредуктаз определяется одним или несколькими ионами переходных металлов или их сочетанием с металлом с постоянной валентностью. В связи с этим, важно проанализировать, какие ионы металлов и как влияют на оксидоредуктазные активности иммуноглобулинов класса G, а так же исследовать, как развитие аутоиммунных заболеваний может влиять на изучаемые активности антител.

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

В процессе 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 значимость работы**

В настоящей работе впервые проведено исследование пероксидажной 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 пероксидажной активностью обладают Fab- и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты IgG. Исследована зависимость пероксидажной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей иммуноглобулинов класса G 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-сульфо кислоту), α-нафтол, о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Выявлено, что уровень пероксидажной 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'-диаминобензидина иммуноглобулинами класса G здоровых доноров катализируют Fab- и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты IgG.
2. Поликлональные IgG крыс линии Wistar не окисляют 3,3'-диаминобензидин в отсутствие ионов металлов. Их пероксидажная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности являются зависимыми как от одного из ионов металлов с

переменной валентностью  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , так и от их различных комбинаций друг с другом, а также с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , и  $\text{Zn}^{2+}$ . 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  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ .

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-сульфоиклоту),  $\alpha$ -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 (СКВ) и больных рассеянным склерозом (РС) 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.

#### **Апробация работы и публикации.**

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).

**Вклад автора.** Основные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Определение содержания металлов в сыворотке крови и препаратах IgG проведено с помощью атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров (САЭМ) в двухструйном дуговом плазматроне в ИНХ СО РАН к.х.н. Н. П. Закас. Анализ содержания селена в препаратах IgG проведен Н. П. Закас с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения.

**Структура и объем диссертации.** 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.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Активированные кислородные метаболиты и ферментативная система их детоксификации

В процессе жизнедеятельности аэробного организма около 5% потребляемого тканями кислорода в результате многочисленных реакций превращается в активированные кислородные метаболиты (АКМ), такие как: синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), супероксидный анион-радикал ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), нитроксильный радикал ( $\text{R}_2\text{NO}\cdot$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), оксид азота ( $\text{NO}$ ) перекисный радикал ( $\text{RO}\cdot$ ), и др., обладающие высокой реакционной способностью [28, 29].

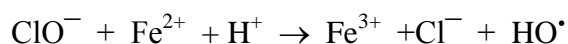
Наиболее значимыми источниками активных форм кислорода (АФК), в эукариотических клетках являются дыхательная цепь митохондрий, микросомальная система цитохромов P450 и метаболизм жирных кислот в пероксисомах [30, 31]. Впервые о генерации супероксидного радикала в митохондриях сообщено более четырех десятилетий назад [32]. Кроме митохондрий есть и другие клеточные источники супероксидного анион-радикала, например, ксантиноксидаза – молибденсодержащий фермент, широко представленный в различных тканях млекопитающих. Ксантиноксидаза катализирует окисление гипоксантина в ксантин, а ксантина в мочевую кислоту, сопровождающееся образованием супероксидного анион-радикала и пероксида водорода [33]. Как  $\text{O}_2^-$ , так и  $^1\text{O}_2$ , несмотря на малое время жизни,  $10^{-6}$  с, обладают большим радиусом действия, сравнимым с размером клетки. Дополнительными эндогенными источниками АКМ являются нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Активированные макрофаги инициируют увеличение поглощения кислорода, что приводит к появлению разнообразных активных форм кислорода, включая  $\text{O}_2^-$ , оксид азота и пероксид водорода [34].

Микросомы и пероксисомы, содержащие ряд генерирующих пероксид водорода оксидаз, являются важным источником пероксида водорода в клетке. Стоит отметить, что молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$ , являясь электростатически нейтральной, свободно проникает сквозь мембраны в клетки и ткани [29].

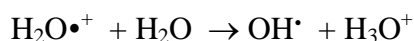
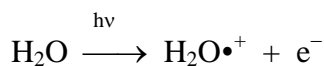
В присутствии ионов восстановленных переходных металлов, пероксид водорода может превращаться в чрезвычайно реакционноспособный гидроксильный радикал  $\text{OH}\cdot$  (реакция Фентона) [35]:



Кроме того,  $\cdot\text{OH}$  также образуется при взаимодействии ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) с гипохлоритом:

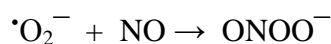


Еще одним источником гидроксильного радикала является ионизирующее излучение. Его цитотоксическое и канцерогенное действие на организм напрямую связано с  $\text{HO}\cdot$  радикалом.



В конце 1980-х годов в ходе определения механизмов эндотелиального контроля сосудистого кровотока, описан еще один вид АКМ – оксид азота (NO). Оксид азота образуется в клетках млекопитающих путем ферментативного окисления аминокислоты L-аргинина в цитруллин NO синтазами [36]. Молекулы оксида азота являются достаточно долгоживущими и свободно диффундируют в биологических средах.

Оксид азота может реагировать с супероксидным анион-радикалом с образованием высокотоксичного пероксинитрита  $\text{ONOO}^-$  [37]:



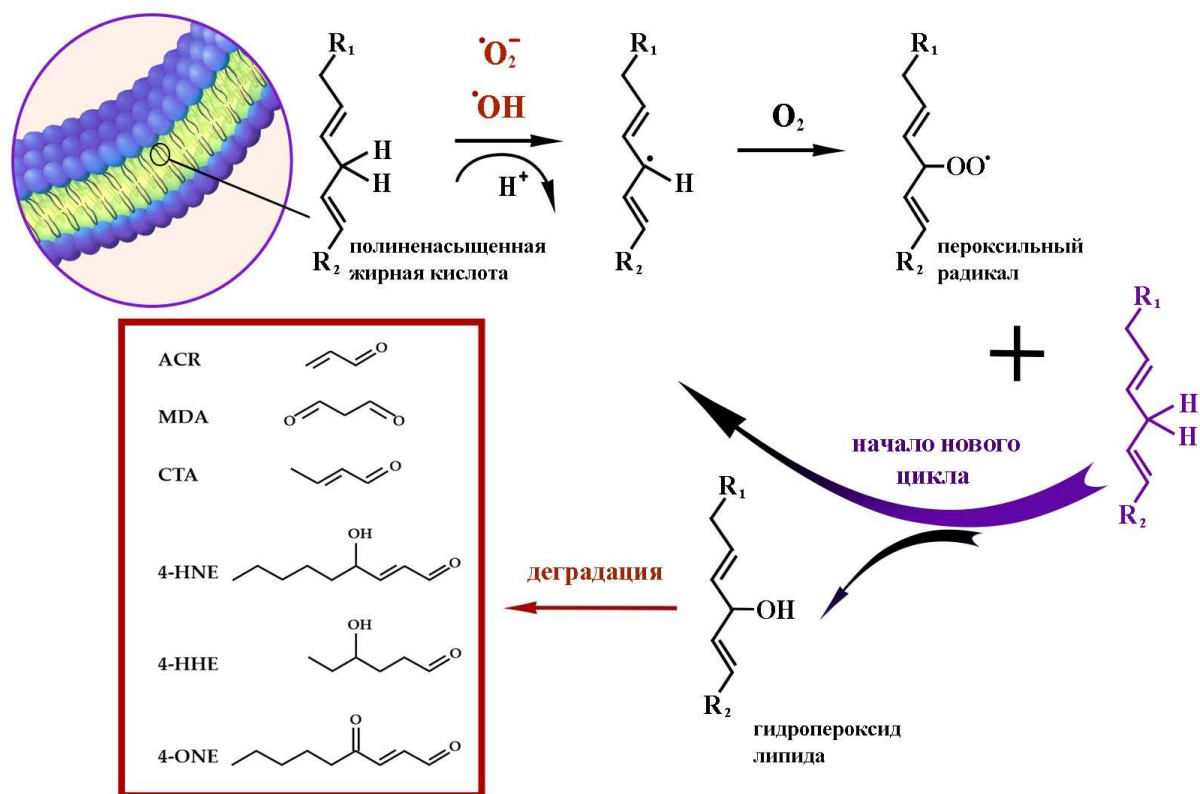
В нормально функционирующих клетках АКМ участвуют в процессах, необходимых для жизнедеятельности организма, таких, как синтез биологически активных веществ, обмен коллагена, регуляция проницаемости мембран, образование  $\cdot\text{O}_2^-$  в активированных макрофагах и нейтрофилах для уничтожения микроорганизмов в очаге воспаления [38], в процессах сигнальной нейротрансдукции и активации ферментов, необходимых для реализации апоптоза. Оксид азота, например, является важным медиатором разнообразных физиологических процессов, в том числе нейротрансмиссии, регуляции артериального давления, торможения агрегации тромбоцитов, а также выступает в качестве эффектора иммунных ответов [36]. Однако АКМ могут быть опасны, так как благодаря своей высокой реакционной способности являются сильными окислителями и вступают в реакции с различными компонентами клетки, приводя к их повреждению [1].

Одной из мишеней для АФК является ДНК. Свободные радикалы, в основном  $\cdot\text{OH}$ , вносят различные повреждения в ее структуру, такие как модификация оснований и сахарофосфатного остова; разрывы цепей и образование сшивок ДНК–ДНК и ДНК–белок, образование экзо- и эндоциклических аддуктов [39, 40]. Подобные повреждения, называемые «окислительными повреждениями ДНК», могут привести к

возникновению мутаций, а также являются одной из причин канцерогенеза и старения [41].

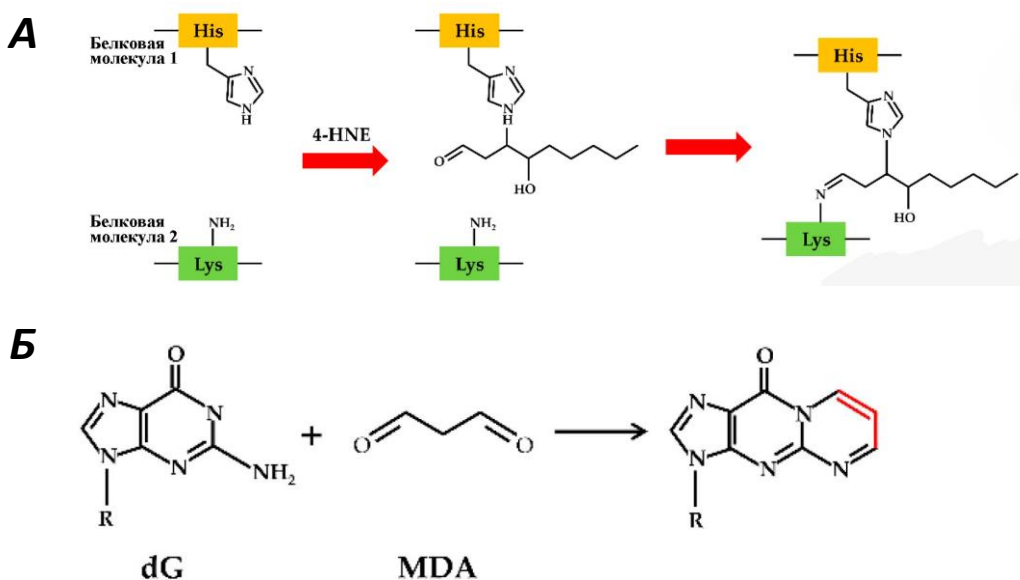
Окисление белковых молекул с помощью АКМ приводит к множеству различных видов внутри- и межмолекулярных сшивок, вследствие окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина ( $-S-S-$  сшивки) [42]. Пероксинитрит способен взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков, нитрировать аминокислотные остатки тирозина и триптофана и окислять метионин с образованием метионинсульфоксида. Этот модифицированный продукт тирозина обнаружен при болезнях Альцгеймера, Паркинсона и у больных амиотрофическим склерозом [43].

Свободнорадикальное окисление жирных кислот, или так называемое перекисное окисление липидов (ПОЛ) приводит к образованию множества высокотоксичных для клетки продуктов. Показано, что процесс ПОЛ начинается с реакции инициирования цепи и формирования супероксидного и гидроксильного радикалов [44, 45]. Если такой радикал образуется вблизи клеточной мембраны, он может вступить в реакцию с полиненасыщенными жирными кислотами боковых цепей липидов с образованием свободного радикала углерода в мембране (рис. 1).



**Рис. 1.** Схема ПОЛ (А) и химические структуры основных реакционноспособных альдегидов (Б), образующихся в результате ПОЛ: АСR (акролеин); МDА (малоновый диальдегид); СТА (кротоновый альдегид); 4-НNE (4-гидрокси-2-ноненаль); 4-НNE (4-гидроксигексаналь); 4-ONE (4-оксо-2-ноненаль). Рисунок адаптирован из Gallelli C. A. et al., 2018 [44].

Последний, реагируя с молекулярным кислородом, образует пероксильный радикал. В случае отсутствия соответствующего антиоксиданта, пероксильный радикал взаимодействует с водородом другой ближайшей полиненасыщенной жирной кислоты, в результате чего возникает гидропероксид липида и новый углеродный радикал. Так начинается новый этап свободнорадикального цепного процесса, когда гидроперекиси разлагаются, инициируя, тем самым, новые цепи. Не все радикалы продолжают цепь. Часть их взаимодействует друг с другом, образуются неактивные продукты, что приводит к обрыву цепи. Помимо спонтанного обрыва цепей прерывание возможно при взаимодействии с антиоксидантами [44]. В результате самоускоряющейся реакции свободнорадикального окисления образуется множество продуктов ПОЛ: гидроперекиси липидов, альдегиды, кетоны, эпоксиды, диеновые конъюгаты и перекисные радикалы. В процессе окислительной деструкции липидов происходит образование таких продуктов, как малоновый диальдегид (MDA) и 4-гидрокси-2-ноненаль (4-HNE), являющихся мутагенами (рис. 1) [45]. Так, например, 4-HNE сшивает белковые молекулы, взаимодействуя с аминокислотными остатками лизина, сульфгидрильными группами цистеина и имидазольной группой гистидина, вызывая, тем самым, нарушение структуры различных белков и ферментов (рис. 2А) [44, 46]. MDA и 4-HNE соединения могут реагировать и с азотистыми основаниями, приводя к формированию экзоциклических аддуктов (рис. 2Б) [44, 47].



**Рис. 2.** Пример образования межмолекулярных белковых сшивок (А) и ДНК-аддуктов (Б) в результате взаимодействия 4-HNE и MDA с аминокислотными остатками белков и азотистыми основаниями нуклеиновых кислот. Рисунок адаптирован из Gallelli C. A. et al., 2018 [44].

Если количество образующихся АКМ в клетке достигает критической величины, возникает состояние, определяемое как окислительный стресс. Данное состояние

приводит к опасным для клетки биохимическим процессам и является одной из причин множества заболеваний. В настоящее время гиперпродукцию АКМ связывают с онкологическими, нейродегенеративными, сосудистыми заболеваниями, диабетом второго типа, иммунологическими расстройствами, процессом старения, атеросклерозом, остеопорозом, астмой [2-10, 31, 48]. Для защиты от гиперпродукции АКМ в процессе эволюции в аэробных клетках сформировались ферментативная и неферментативная системы. Неферментативная антиоксидантная система включает в себя различные соединения, такие как витамин Е, коэнзим Q<sub>10</sub>, глутатион, трансферрины, ферритин, церулоплазмин, металлотионеин-подобные белки, мочевую кислоту и многие другие [29, 37, 49, 50, 51, 52, 53]. Наиболее важными представителями ферментативной системы являются глутатионпероксидазы (GPxx), глутатион-S-трансферазы, каталаза, супероксиддисмутазы (SODs), семейство тиоредоксинов (Trxs) (для обзора см. [54, 55, 56, 57] и семейство пероксиредоксинов (Prxs) (для обзора см. [58, 59, 60], 61, 62, 63).

### 1.1.1. Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) является одним из важнейших ферментов, защищающих клетки от чрезвычайно активного окислителя – супероксидного анион-радикала ( $\text{O}_2^-$ ) [64, 65]. Избыточное количество  $\text{O}_2^-$  вызывает повреждение биологических макромолекул, таких как ДНК, белки и липиды, что приводит к развитию онкологических заболеваний, сердечно-сосудистых расстройств и нейродегенеративных патологий [66, 67]. Ферментативная активность супероксиддисмутазы заключается в превращении супероксидного анион-радикала в молекулярный кислород и пероксид водорода в процессе циклической реакции восстановления и окисления металла в активном центре фермента.

Супероксиддисмутаза имеет несколько изоформ, содержащих в своем каталитическом центре различные ионы металлов, и отличающихся друг от друга локализацией, строением активного центра и структурной организацией молекул.

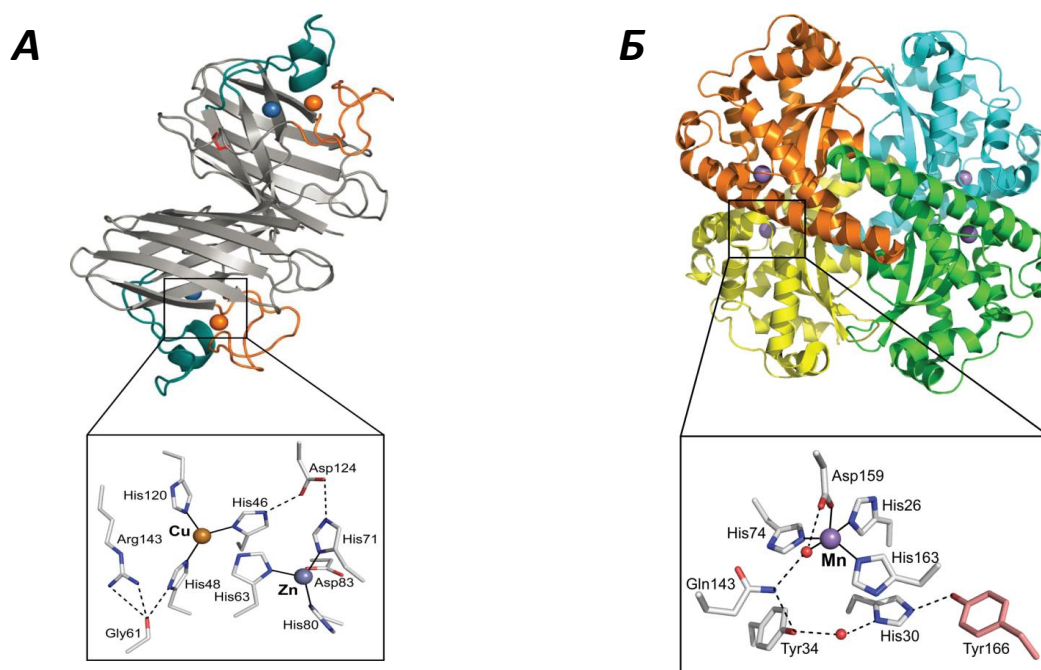
Медь, цинк-содержащая супероксиддисмутаза (CuZn-SOD) встречается в периплазме бактерий, в хлоропластах и пероксисомах растений. Марганец-содержащий фермент (Mn-SOD) идентифицирован в цитозоле архей и бактерий. Эукариотические клетки обычно содержат этот фермент в матриксе митохондрий и хлоропластов. Железо-содержащая изоформа супероксиддисмутазы (Fe-SOD) первоначально считалась цитозольным бактериальным ферментом, однако показано, что она также присутствует у архей, в хлоропластах растений, а также в цитозоле и митохондриях протистов. Никель-



содержащий фермент (Ni-SOD) обнаружен в цитозоле *Streptomyces*, у цианобактерий, а также у некоторых зеленых водорослей [68].

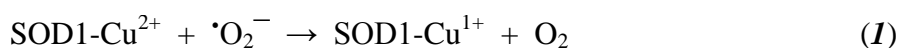
В организмах млекопитающих присутствуют три типа SOD: цитозольная Cu,Zn-SOD (SOD1), митохондриальная Mn-SOD и внеклеточная SOD (EC-SOD или SOD3) [69].

Cu,Zn-SOD (SOD1), являясь основной цитозольной изоформой SOD, встречается также в межмембранном пространстве митохондрий и ядре. SOD1 представляет собой гомодимер с молекулярной массой около 32 кДа, состоящий из двух субъединиц, каждая из которых содержит один ион  $\text{Cu}^{2+}$ , окруженный остатками гистидина и, связанный с ним с помощью His61, ион  $\text{Zn}^{2+}$ , координированный остатками аспарагина и гистидина (рис. 3А). Предполагается, что во время реакции катализа ион меди выступает в качестве окислителя, в то время как цинк является электрофильным агентом, взаимодействующим с имидазольным кольцом остатка гистидина, связанным с ионом меди. Кроме того, ион  $\text{Zn}^{2+}$  необходим для стабилизации субъединиц фермента [70].



**Рис. 3.** Трехмерная структура и строение активного центра SOD1 (А) и Mn-SOD (Б) человека. Рисунок адаптирован из Sheng Y. et al., 2014 [68].

Реакция дисмутации супероксидного анион-радикала начинается со связывания  $\cdot\text{O}_2^-$  с ионом  $\text{Cu}^{2+}$  в активном центре фермента,  $\text{Cu}^{2+}$  восстанавливается до  $\text{Cu}^{1+}$ , окисляя  $\cdot\text{O}_2^-$  до молекулярного кислорода ( $\text{O}_2$ ) (Схема 1 (1)). При этом связь Cu с одним из гистидиновых остатков нарушается, вследствие чего His63 Nε1 протонируется. Далее, протон His63 Nε1 и электрон с  $\text{Cu}^{1+}$  переносятся на вторую молекулу  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{Cu}^{1+}$  окисляется до  $\text{Cu}^{2+}$ , а  $\cdot\text{O}_2^-$  восстанавливается до пероксида водорода (Схема 1 (2)), а связь меди с гистидином восстанавливается [70].

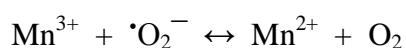


**Схема 1.** Дисмутация супероксидного анион-радикала SOD1.

Внеклеточная супероксиддисмутаза (EC-SOD или SOD3) является секреторным, тетрамерным гликопротеином массой 135 кДа, состоящим из двух димеров, аналогичных димерам SOD1 человека, соединенных дисульфидной связью. Каждая субъединица EC-SOD содержит по одному атому цинка и меди и катализирует ту же реакцию, что и фермент, кодируемый SOD1. Однако в отличие от SOD1, каждая субъединица внеклеточной супероксиддисмутазы имеет дополнительные неупорядоченные N-концевые остатки, более длинные петли в положениях  $\beta 1/\beta 2$  и GK1 и дополнительную C-концевую  $\alpha$ -спираль. EC-SOD стабилизирован дополнительной внутрисубъединичной дисульфидной связью, не обнаруженной в SOD1 [71].

EC-SOD присутствует во внеклеточных жидкостях, в интерстициальных пространствах тканей, а также в молоке, плазме, синовиальной жидкости и лимфе. Кроме того, она обнаруживается в ядрах клеток, связанной с хроматином. Таким образом, несмотря на то, что EC-SOD, как следует из названия, в основном находится во внеклеточном пространстве, этот фермент имеет и внутриклеточную локализацию [72]. Внеклеточная супероксиддисмутаза, в отличие от SOD1, не индуцируется субстратом. Ее регуляция в тканях млекопитающих осуществляется в основном цитокинами в виде ответа отдельных клеток на действие окислителя [73].

Митохондриальная Mn-SOD (SOD2) (рис. 3Б), содержащая в активном центре атом марганца, является критически необходимым ферментом для функционирования клеток, так как большая часть активных форм кислорода образуются в этих органеллах, а митохондриальная ДНК особо чувствительна к окислительным повреждениям вследствие относительно неэффективной репарации [74]. В процессе катализа двуступенчатой дисмутации супероксидного анион-радикала,  $\text{Mn}^{3+}$  в составе фермента восстанавливается до  $\text{Mn}^{2+}$  (Схема 2), а затем окисляется при взаимодействии со второй молекулой  $\cdot\text{O}_2^-$  (более детально механизм см. [75]).



**Схема 2.** Дисмутация супероксидного анион-радикала Mn-SOD.

Известные марганец-содержащие супероксиддисмутазы существуют как в форме гомодимеров, так и гомотетрамеров. Большинство Mn-SOD, обнаруженных в бактериях

или у других прокариот, являются димерами, а те, которые встречаются в матриксе хлоропластов эукариот, а также в митохондриях млекопитающих, включая человека, являются тетрамерами [76].

Еще одним свойством, характерным для некоторых эукариотических, но не прокариотических CuZn-SOD [77], и большинства FeSOD, является способность их восстановленных форм реагировать с пероксидом водорода. В процессе реакции восстановленный ион металла в активном центре фермента взаимодействует с  $H_2O_2$ , в результате чего образуется гидроксильный радикал, который в свою очередь реагирует с аминокислотными остатками, расположенными поблизости, что приводит к необратимой инактивации фермента [68].

### 1.1.2. Каталаза

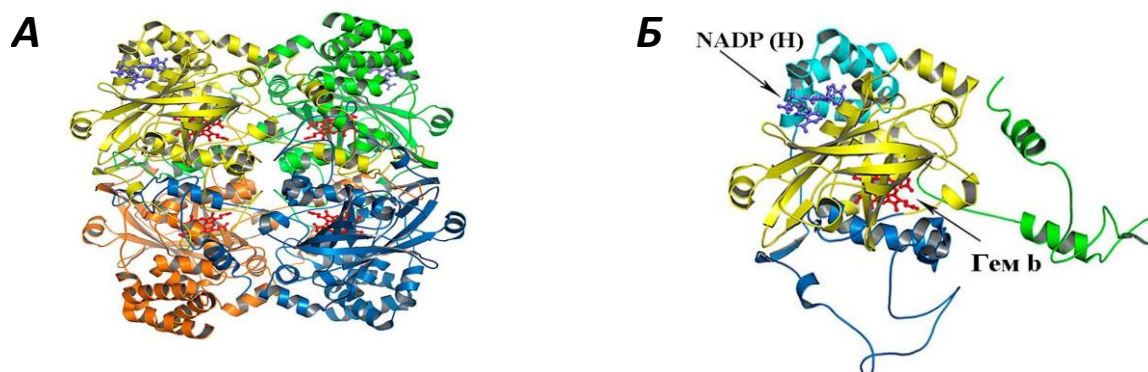
Каталаза (EC 1.11.1.6) представляет собой фермент, способный с очень высокой эффективностью катализировать реакцию разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Одна молекула каталазы в минуту может преобразовать около 6 миллионов молекул  $H_2O_2$  [78].

Каталаза является, прежде всего, внутриклеточным ферментом. В клетках она локализована преимущественно в пероксисомах, в цитозоле содержится лишь незначительное ее количество [79]. Самая высокая концентрация каталазы наблюдается у млекопитающих в эритроцитах печени, а также в клетках печени и почек [80].

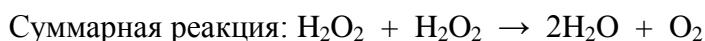
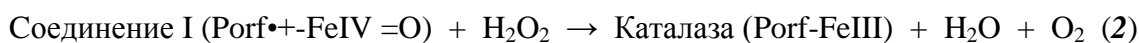
Каталазы встречаются во всех аэробных организмах. Большинство из них являются гомотетрамерами размером от 200 до 340 кДа и содержат четыре простетические группы – гем. В активном центре фермента обнаружен содержащий трехвалентный ион железа протопорфирин IX, называемый гемом b. Каталазы бактерий, водорослей и растений, характеризуются небольшим размером субъединиц (55–69 кДа); каталазы грибов и бактерий имеют больший размер субъединиц (75–84 кДа) и содержат гем d в качестве простетической группы [81].

Каталаза человека состоит из четырех идентичных субъединиц массой 62 кДа, каждая из которых содержит следующие элементы: дистальный гистидин, необходимый для осуществления каталазной реакции; домен из 8  $\beta$ -складок, расположенных антипараллельно с 6  $\alpha$ -спиральными вставками, формирующий гидрофобное ядро белка, необходимое для создания трехмерной структуры фермента; домен, связывающий группу гема, содержащий остаток тирозина;  $\alpha$ -спиральные домены, необходимые для связывания NADPH, предохраняющий фермент от инактивации (**рис. 4**) [82, 83].

В процессе ферментативной реакции, приводящей к разрушению  $\text{H}_2\text{O}_2$ , железо, входящее в состав фермента, сначала окисляется, а затем восстанавливается второй молекулой пероксида водорода (Схема 3).



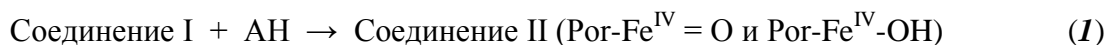
**Рис. 4.** Трехмерная структура тетрамера (А) и одной из субъединиц (Б) эритроцитарной каталазы человека. Рисунок адаптирован из Díaz A. et al., 2012 [84].



**Схема 3.** Разложение пероксида водорода каталазой.

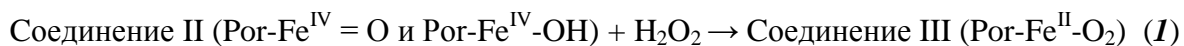
Во время первой реакции происходит окисление железа, входящего в состав гема, одной молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что приводит к формированию соединения I, оксоферрил порфирин катион-радикала (Схема 3 (1)) [85]. Далее соединение I немедленно реагирует со второй молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в процессе чего образуется  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$  в процессе двухэлектронной окислительно-восстановительной реакции (Схема 3 (2)). Исследования показали, что молекулы как  $\text{H}_2\text{O}$ , так и  $\text{O}_2$ , формируются из одной и той же молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$  [86].

В окисленном состоянии (соединение I), при низких концентрациях пероксида водорода, каталаза может работать как пероксидаза, катализируя окисление одноэлектронных доноров (АН): фенолов, альдегидов, а также короткоцепочечных алифатических спиртов (Схема 4 (1)) [87]. Повторное взаимодействие соединения II с донором электронов приводит к восстановлению нативной формы фермента (Схема 4 (2)) [88].



**Схема 4.** Окисление одноэлектронных доноров каталазой.

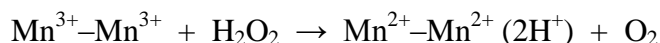
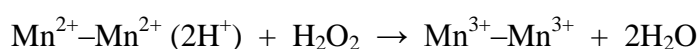
При высоких концентрациях пероксида водорода соединение II превращается в неактивное промежуточное соединение III (Por-Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>) (Схема 5 (1)), которое способно снова спонтанно переходить в активную форму каталазы, однако при продолжительном взаимодействии с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оно необратимо инактивируется (Схема 5 (2)) [89].



**Схема 5.** Разложение каталазой пероксида водорода при высокой концентрации.

В клетках млекопитающих каталазная активность фермента на несколько порядков выше, чем пероксидазная, однако, у бактерий пероксидазная активность может преобладать, поэтому данный фермент микроорганизмов называют «каталаза-пероксидаза».

У бактерий *Lactobacillus plantarum* обнаружена негемовая марганец-содержащая форма каталазы [90]. В ее активном центре содержатся два иона марганца. Механизм реакции, осуществляемый этим ферментом, полностью отличается от других типов каталаз [91].



**Схема 6.** Разложение пероксида водорода негемовой марганец-содержащей формой каталазы.

### 1.1.3. Глутатионпероксидаза

Семейство глутатионпероксидаз (GPxx) содержит большое количество изоферментов, катализирующих восстановление различных органических гидроперекисей (ROOH) и пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

В настоящее время идентифицировано восемь изоферментов глутатионпероксидаз млекопитающих (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7, GPx8), кодирующихся генами GPX1-8 соответственно. Несмотря на то, что присутствие этого фермента в организме является повсеместным, уровень экспрессии каждой изоформы варьирует в зависимости от типа ткани.

Классическая клеточная глутатионпероксидаза (GPx1 или cGPx), содержащаяся в цитозоле и митохондриях, представляет собой гомотетрамер, взаимодействующий с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и с растворимыми гидроперекисями с низкой молекулярной массой, такими как трет-бутилгидропероксид, гидропероксидами жирных кислот [92], а также с гидропероксидами

лизофосфатидов [93]. Каждая субъединица фермента содержит по одному атому селена, входящему в состав селеноцистеиновых остатков в активном центре [94]. GPx1 катализирует реакцию восстановления перекисей в присутствии глутатиона (GSH) (механизм детально будет рассмотрен ниже). В митохондриях головного мозга, в которых не экспрессируется GSS (глутатион синтетаза), GPx1 может использовать в качестве кофактора и  $\gamma$ -глутамилцистеин (предшественник GSH) [95].

GPx2 (или giGPx), также, как и GPx1, является гомотетрамером, структура его активного центра отличается от GPx1 только двумя аминокислотными остатками в GSH-связывающей области: Lys 91 заменен глутамином, а Arg185 – треонином. Эти два фермента обладают сходной субстратной специфичностью – GPx2 участвует в восстановлении пероксида водорода и гидропероксидов жирных кислот. GPx2 в основном экспрессируется в клетках желудочно-кишечного тракта, клетках эпителия пищевода, а также в печени [96, 97]. В тканях других органов фермент присутствует в достаточно низких концентрациях, например, в легких активность GPx2 составляет не более 10% от общей глутатионпероксидазной активности. Самое высокое содержание этого фермента обнаружено в основаниях ворсинок толстого и тонкого кишечника [98].

GPx3 - основной внеклеточный изофермент семейства GPx [99]. Данная глутатионпероксидаза обнаруживается в различных биологических жидкостях, таких как водянистая влага глаза, коллоидная жидкость щитовидной железы [100], амниотическая жидкость [101], бронхоавеолярная жидкость [102] и в жировой ткани [103]. Также обнаружено, что GPx3 содержится в базальных мембранах клеток проксимальных канальцев почек [104], мембранах эпителиальных клеток кишечника, бронхов и пневмоцитов II типа [105].

GPx4 представляет собой мономер и существенно отличается от других изоформ GPx, которые являются тетрамерами. GPx4 существует в трех различных изоформах: цитозольной (cGPx4), митохондриальной (mGPx4) и ядерной GPx спермы (snGPx4). Этот фермент присутствует в большинстве тканей и содержится как в цитозоле, так и в мембранной фракции. GPx4 обладает уникальным свойством восстанавливать не только  $H_2O_2$ , но и гидропероксиды сложных липидов, таких, например, как фосфолипиды и холестерин, даже когда они находятся в составе биомембран или липопротеинов [106, 107]. В отсутствие GSH, GPx4 способен использовать тиольные группы белков в качестве восстановителя. Таким образом, в зависимости от доступности глутатиона, GPx4 может действовать как глутатионпероксидаза и как тиолоксидаза [108].

GPx5 является цистеин-содержащей глутатионпероксидазой, специфичной для придатков мышей, крыс, свиней, обезьян и людей. Белок обнаружен в эпителиальных

клетках и в просвете придатков семенников [109].

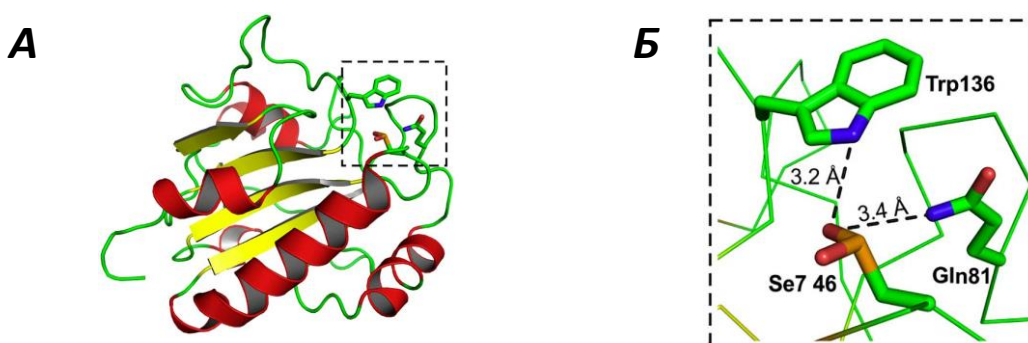
GPx6 является селеноцистеин-содержащим ферментом у людей и цистеин-содержащим у грызунов [110]. Данные об этой глутатионпероксидазе очень ограничены.

GPx7, очень похожая по структуре на GPx4, впервые описана в 2004 году как глутатионпероксидаза, содержащая в активном центре цистеин вместо селеноцистеина. Фермент назван неселеноцистеиновой глутатионпероксидазой гидропероксидов фосфолипидов (NPGPx – non selenocysteine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase). GPx7 выявлена в почках, легких, яйцках, молочных железах и жировой ткани [110]. Авторы обнаружили, что экспрессия GPx7 отсутствует в большинстве протестированных клеточных линиях рака молочной железы. На основании этих данных сделано предположение, что данная глутатионпероксидаза препятствует трансформации клеток, защищая их от окислительного стресса.

GPx8, еще один член семейства GPx, обнаружена в процессе филогенетического анализа у млекопитающих и амфибий [111]. Этот фермент представляет собой мембранный белок эндоплазматического ретикулула [112].

Из восьми изоферментов GPx, пять (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 и GPx6) содержат остаток селеноцистеина в активном центре, а три (GPx5, GPx7 и GPx8) используют в активном центре цистеин [113, 114].

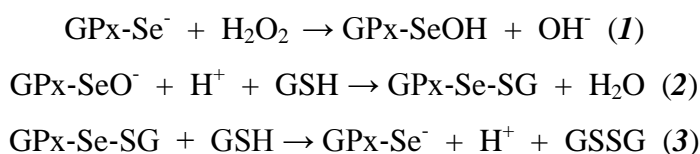
С помощью рентгеноструктурного анализа выявлено наличие в активном центре глутатионпероксидаз каталитической триады, состоящей из аминокислотных остатков селеноцистеина, глутамина и триптофана (**рис. 5**) [115]. Атомы азота боковых цепей Gln81 и Trp136 связаны с атомом Se посредством водородных связей.



**Рис. 5.** Трехмерная структура GPx4 человека (PDB запись 6ELW):  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складки и петли вторичной структуры фермента обозначены красным, желтым и зеленым соответственно (**А**). Каталитическая триада GPx4 (Sec-46, Gln-81, Trp-136) (**Б**). Селеноцистеин представлен в виде селениновой кислоты. Рисунок адаптирован из Borchert A. et al., 2018 [116].

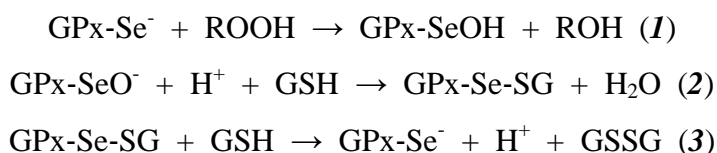
Как правило, восстановление пероксидов ферментами GPx включает в себя следующие стадии (**Схема 7**). В процессе восстановительной реакции остаток

селеноцистеина селенолат ( $\text{GPx-Se}^-$ ) в активном центре фермента сначала превращается в промежуточное соединение – селеноновую кислоту ( $\text{GPx-Se-OH}$ ) (**Схема 7 (1)**), которая затем восстанавливается одной молекулой GSH, что приводит к образованию глутатионилированного селенола ( $\text{GPx-Se-SG}$ ) (**Схема 7 (2)**). Он, в свою очередь, реагирует со второй молекулой GSH, происходит восстановление селеноцистеина и образование молекулы окисленного глутатиона (GSSG) (**Схема 7 (3)**) [117].



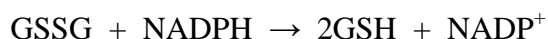
**Схема 7.** Восстановление пероксидов селеноцистеин-содержащей глутатионпероксидазой.

Восстановление органических гидропероксидов (ROOH) осуществляется аналогичным образом (**Схема 8 (1, 2, 3)**):



**Схема 8.** Восстановление органических гидропероксидов селеноцистеин-содержащей глутатионпероксидазой.

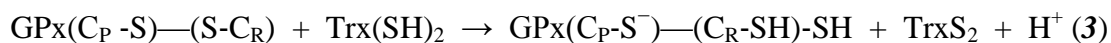
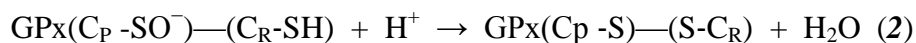
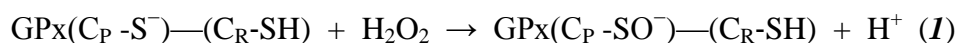
Восстановление окисленного глутатиона происходит в реакции, катализируемой ферментом глутатионредуктазой:



Цистеин активного центра цистеин-содержащих глутатионпероксидаз (CysGPxs), как и селеноцистеин (Sec) в SecGPxs, расположен в мотиве NVAxxC (Sec)G в N концевой области полипептидной цепи. Он окисляется гидропероксидом до сульфоновой кислоты и поэтому называется пероксидным Cys ( $\text{C}_P$ ) (**Схема 9 (1)**). На второй стадии CysGPxs  $\text{C}_P\text{-SOH}$  взаимодействует со вторым цистеином, приводя к образованию внутримолекулярного дисульфида (**Схема 9 (2)**). Вторым цистеином необходим для завершения каталитического цикла и, таким образом, называется «разрешающим» (resolving) цистеином ( $\text{C}_R$ ). Дисульфид восстанавливается редоксином, чаще всего тиоредоксином (Trx), который в свою очередь окисляется с образованием окисленного Trx ( $\text{TrxS}_2$ ) (**Схема 9 (3)**).

Таким образом, цистеин-содержащие глутатионпероксидазы представляют собой тиоредоксиновые пероксидазы [118].





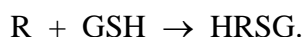
**Схема 9.** Восстановление пероксидов цистеин-содержащей глутатионпероксидазой.

Глутатионпероксидаза так же, как и супероксиддисмутаза относится к «адаптивным» ферментам. Ее активность может резко возрасть в условиях окислительного стресса, вследствие чего ограничиваются и ликвидируются очаги интенсивной липопероксидации в клетке. Повышение каталитической активности GPx, как правило, влечет за собой увеличение активности супероксиддисмутазы и наоборот. Принимая участие в долговременной регуляции перекисного окисления липидов, оба эти фермента являются важнейшими участниками антиоксидантно-антирадикальной системы защиты организма.

#### 1.1.4. Глутатион-S-трансфераза

Еще одним ферментом, относящимся к ферментативным антиоксидантам, является глутатион-S-трансфераза. Важно отметить, что, в отличие от супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаз или каталазы, данный фермент не относится к классу оксидоредуктаз.

Глутатион-S-трансферазы не взаимодействуют с пероксидом водорода. Их основным субстратом являются либо гидроперекиси с большим объемом молекул, к которым фермент присоединяет глутатион, либо различные ксенобиотики:



Различают три основных семейства данного фермента: цитозольные, микросомальные и митохондриальные глутатион-S-трансферазы [119].

#### 1.1.5. Пероксидазы

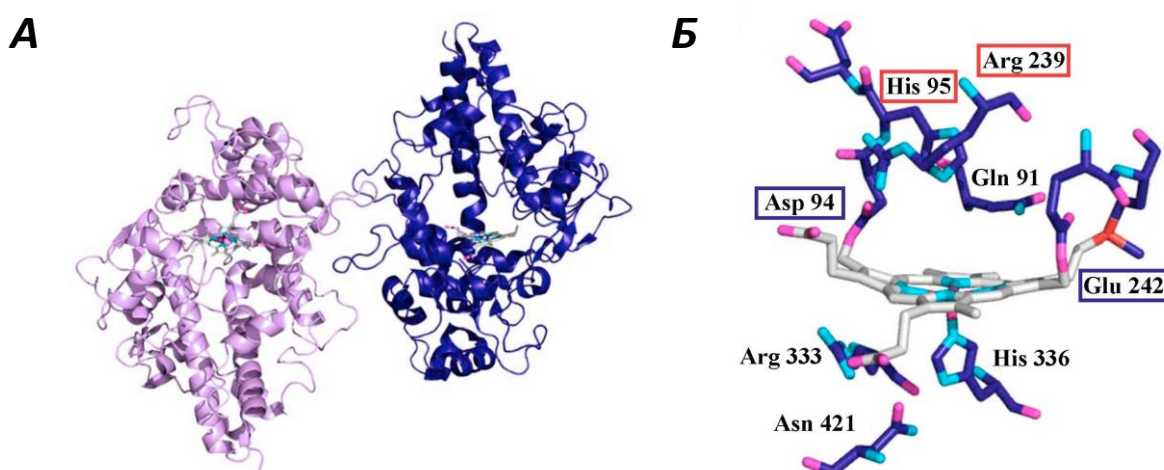
Пероксидазы (КФ 1.11.1.7) являются широко распространенными в биологических системах ферментами, основная функция которых заключается в окислении различных органических и неорганических электрон-донорных субстратов в присутствии пероксида водорода.

Простетической группой пероксидаз является гем – производное протопорфирина IX. Существует два типа суперсемейств гем-содержащих пероксидаз: пероксидазы

растений, грибов и бактерий, и пероксидазы млекопитающих. К первому семейству, например, относится активно исследуемая в настоящее время классическая секретируемая растительная пероксидаза – пероксидаза хрена (ПХ).

К семейству гем-содержащих пероксидаз млекопитающих относятся следующие ферменты: миелопероксидаза (МРО), экспрессирующаяся в нейтрофилах [120]; эозинофильная пероксидаза (ЕРО), обнаруживаемая в эозинофилах [121]; тиреоидная пероксидаза (ТРО), в основном локализованная в щитовидной железе [122] и лактопероксидаза (ЛРО), содержащаяся в молоке, слюне, слезах и других экзокринных жидкостях [123]. МРО и ЕРО являются гетеродимерными гликопротеинами, массой 146 и 68.9 кДа соответственно [124, 125]. ЛРО (80 кДа) и ТРО (100 кДа) существуют в форме мономеров [126].

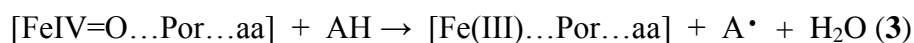
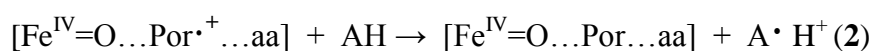
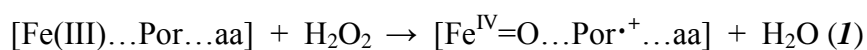
Члены этого семейства обладают схожими функциями с пероксидазами грибов и растений [126], однако отличаются от них строением, в том числе характером связи кофермента с апоферментом. У пероксидаз млекопитающих гем ковалентно связан с белковой молекулой двумя сложноэфирными связями, образованными 1- и 5-метильной группами пиррольных колец А и С, а также консервативными остатками Glu258 и Asp108 для ЛРО и Glu242 и Asp94 в случае МРО соответственно [127] (**рис. 6**). Третьей связью, в случае миелопероксидазы, является сульфониевая ионная связь между атомом серы остатка метионина и  $\beta$ -углеродом винильной группы пиррольного кольца А. Эти ковалентные связи необходимы для увеличения окислительно-восстановительного потенциала гема, стабилизации его положения в составе фермента и для формирования правильной структуры сайта связывания с субстратом [128].



**Рис. 6.** Трехмерная структура (А) и активный центр (Б) МРО человека. Рисунок адаптирован из Nicolussi A. et al., 2018 [129]. Аминокислотные остатки, необходимые для стабилизации гема и участвующие в связывании пероксида водорода, обозначены синим и красным цветом соответственно.

Показано, что LPO, MPO, EPO и TPO на 46%–57% идентичны по последовательности аминокислотных остатков. Например, в участке взаимодействия с субстратом на дистальной стороне гема у LPO и MPO располагаются высоко консервативные последовательности аминокислот, придающие участкам связывания схожую структуру, предполагающую сходный механизм взаимодействия пероксидазы с субстратом [128].

Каталитический цикл пероксидазы (**Схема 10**) начинается с взаимодействия с пероксидом водорода, далее происходит отщепление двух электронов от молекулы фермента, в результате чего Fe(III) в составе гема формирует промежуточное соединение оксиферрил-гем ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ), а также образуется  $\pi$ -катион-радикал порфирина. Таким образом, происходит формирование соединения I [ $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}\dots\text{Por}\cdot^+\dots\text{aa}$ ], содержащего на два окислительных эквивалента больше, чем нативная форма пероксидазы (**Схема 10 (I)**).



**Схема 10.** Каталитический цикл пероксидазы.

Механизм образования соединения I имеет схожие черты у многих пероксидаз. His95 (261) и Arg239 (405) (нумерация дана для фермента MPO), также, как и аминокислотные остатки His42 и Arg38 пероксидазы хрена, играют решающую роль в связывании пероксида водорода, способствуя его правильной ориентации в активном центре фермента и последующему гетеролитическому расщеплению. В процессе формирования соединения I происходит протонирование гистидина и образование комплекса пероксианиона с Fe(III). Далее протон с гистидина переносится на гидроксильную группу, происходит отщепление молекулы воды, вследствие чего образуется оксиферрил-гем и  $\pi$ -катион-радикал порфирина. Таким образом, остаток His95 (261) миелопероксидазы, также, как и His42 пероксидазы хрена, в процессе катализа реакции расщепления перекиси является с одной стороны акцептором протона от одного из атомов кислорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  и, в то же время, выступает его донором для другого (**рис. 7**).

Аргинин участвует в связывании пероксида водорода в активном сайте фермента и поляризации его O–O связи, а также способствует ионизации гистидина, облегчая тем самым перенос к нему протона от молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Соединение I восстанавливается до исходного железо-фермента в процессе двух последовательных одноэлектронных стадий с образованием промежуточного

соединения II [FeIV=O...Por...aa] (Схема 10 (2, 3)). В процессе этих одноэлектронных реакций происходит окисление многочисленных субстратов (AH) [126, 130].

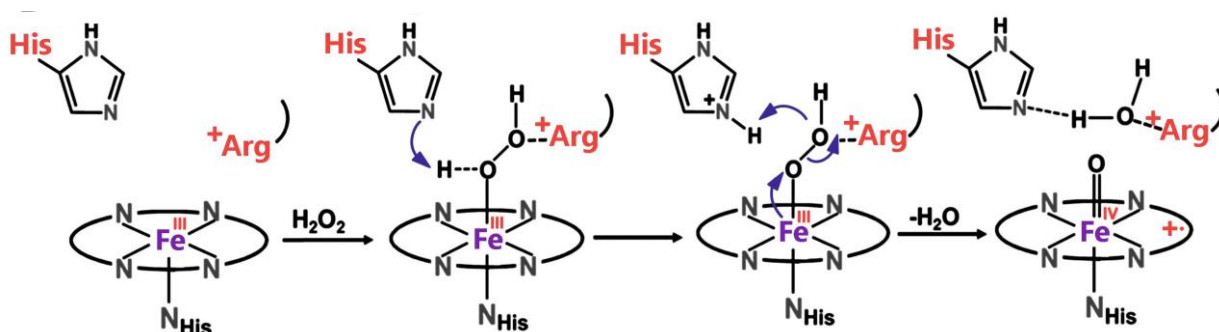


Рис. 7. Механизм образования промежуточного соединения I в пероксидазах. Рисунок адаптирован из Bhunia S. et al., 2020 [131].

Пероксидазы млекопитающих способны окислять неорганические субстраты, такие как  $\text{SCN}^-$  [132],  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{Cl}^-$  [133], катализировать одноэлектронное окисление различных функционально активных органических субстратов: фенолов [134], ароматических аминов, катехоламинов, катехинов [135], адреналина, ацетилсалициловой кислоты [136] и стероидных гормонов [137].

### 1.1.6. Антиоксиданты неферментативной природы

К антиоксидантам неферментативной природы относят соединения, имеющие достаточно низкую специфическую антиоксидантную активность. Тем не менее, присутствуя в высоких концентрациях в водных и липидных фазах организма, они способны вносить существенный вклад в общую антиоксидантную активность [53].

В качестве одного из примеров таких антиоксидантов можно привести витамин Е. Он эффективно взаимодействует с пероксидными радикалами основных жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран [50, 138, 139], супероксидным анион-радикалом, а также способен защищать клетки от повреждений, вызванных NO-радикалом [140].

Коэнзим  $\text{Q}_{10}$  реагирует с кислородными радикалами  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}\bullet$ ,  $\text{RO}\bullet$ ,  $\text{RO}_2\bullet$  и является основным липофильным антиоксидантом в митохондриях и тромбоцитах. Следует отметить, что коэнзим  $\text{Q}_{10}$  в ряде случаев выступает и в качестве прооксиданта: окисляясь и восстанавливаясь в процессе транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий, коэнзим  $\text{Q}_{10}$  и его радикал могут переносить электроны на  $\text{O}_2$  с образованием  $\bullet\text{O}_2^-$  [52, 141].

Важным компонентом поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в организме являются SH-содержащие соединения – белки и пептиды, в состав которых входят цистеин и метионин. Им принадлежит главная роль в защите клеток от

гидроксильного радикала. В крови млекопитающих основными носителями SH-групп являются альбумины, на долю которых приходится до 76% суммарной массы белков сыворотки крови [142]. Особое место среди SH-соединений занимает глутатион [49, 143].

Также к антиоксидантам неферментативной природы относят хелаторы ионов переменной валентности, такие как трансферрины (сывороточный трансферрин, лактоферрин, овотрансферрин, меланотрансферрин), ферритин, церулоплазмин, металлотионеин-подобные белки, мочевую кислоту. Все эти соединения способны связывать ионы металлов переменной валентности и тем самым препятствовать их участию в реакциях разложения перекисей с образованием реакционноспособного гидроксильного радикала [144].

Таким образом, гиперпродукцию активированных кислородных метаболитов предотвращает сложная система антиокислительной защиты, состоящая из антиоксидантов как ферментативной, так и неферментативной природы. В последние несколько десятков лет появились данные, согласно которым каталитически активные антитела (абзимы), наряду с множеством осуществляемых ими различных реакций, могут катализировать и окислительно-восстановительные процессы. Это позволяет предположить возможную роль абзимов в регуляции уровня АКМ. Многообразие каталитически активных антител, возможным механизмам их образования и непосредственно абзимам с оксидоредуктазными активностями посвящен следующий раздел.

## **1.2. Каталитически активные антитела**

### **1.2.1. Многообразие каталитически активных антител**

В 1969 году Уильям Дженкс, основываясь на работах Л. Полинга [145] о сходстве между узнаванием антигена антителом и взаимодействием фермента с переходным состоянием химической реакции, предположил возможность получения каталитически активных антител (абзимов) при иммунизации стабильными аналогами переходных состояний ферментативных реакций [146]. Экспериментально данная идея впервые подтверждена в 1975 году при создании антител, катализирующих трансаминирование L-тирозина [147]. Это послужило началом многочисленных работ по получению абзимов, основанных на способности иммунной системы нарабатывать иммуноглобулины, обладающие высокой аффинностью и специфичностью против практически любой молекулы.

Одними из первых в группах Р. Лернера [148] и П. Шульца [149], были получены каталитически активные антитела с эстеразной активностью. Авторы иммунизировали

лабораторных животных стабильными аналогами переходных состояний с последующим выделением и отбором клонов В-лимфоцитов, дифференцированные плазматические клетки которых продуцировали антитела с заданными каталитическими свойствами.

В 1989 году S. Paul с соавторами описали аутоантитела сыворотки больных астмой, гидролизующие вазоактивный интерстициальный пептид, являющийся пептидом-нейротрансмиттером и участвующий в расслаблении гладких мышц. Результаты этого исследования впервые четко продемонстрировали, что антитела, обладающие каталитической активностью, способны продуцироваться *in vivo* без иммунизации искусственными гаптенами. Кроме того, в данной работе был разработан ряд жестких критериев, позволивших доказать принадлежность ферментативной активности непосредственно антителам [13].

В настоящее время обнаружены и исследованы различные активности природных антител. Показано, что в крови больных СКВ присутствуют антитела, гидролизующие ДНК [150, 11, 151, 152] и РНК [12, 153, 154, 155]. Абзимы с нуклеазными активностями найдены так же у больных аутоиммунным тиреоидитом [156], рассеянным склерозом [157, 158], сахарным диабетом [159], вирусным гепатитом [160], клещевым энцефалитом [161], шизофренией [162] и ВИЧ-инфекцией [163]. Средние значения относительных активностей ДНК-гидролизующих антител в крови больных различными заболеваниями убывают в следующем порядке: СКВ  $\geq$  ВИЧ-инфекция  $\geq$  РС  $\gg$  аутоиммунный тиреоидит  $\geq$  бактериальные инфекции  $\geq$  клещевой энцефалит  $>$  вирусный гепатит  $\geq$  сахарный диабет [164]. Стоит отметить, что в случае иммуноглобулинов крови больных СКВ и РС, нуклеазными активностями обладают не только интактные молекулы антител, но и их Fab-фрагменты, а также изолированные легкие цепи [157]. ДНК-гидролизующая активность обнаружена и у иммуноглобулинов G из плаценты человека [165].

IgG и IgM, гидролизующие олигосахариды, обнаружены в крови больных СКВ, РС, ревматоидным артритом [14, 166] и в препаратах IgG и sIgA молока здоровых рожениц. Амилолитической активностью обладали как целые молекулы абзимов, так и Fab-фрагменты IgG [167]. Недавно получены данные, что IgG спинномозговой жидкости и сыворотки крови пациентов с РС эффективно гидролизуют мальтогептозу, причем средняя удельная активность абзимов спинномозговой жидкости примерно в 30 раз выше [168].

Из молока здоровых рожениц выделены IgG с нуклеотидфосфатазной активностью. В отличие от канонических ферментов, АТФаз, абзимы молока гидролизовали не только АТФ, но и все NTP, NDP, NMP [15].

Первые каталитически активные антитела с протеолитической активностью обнаружены в крови пациентов с бронхиальной астмой. Они эффективно связывали вазоактивный интестенальный пептид (значение  $K_m$  реакции гидролиза варьировало в диапазоне от  $2,2 \times 10^{-6} \text{ M}$  до  $3,8 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) и обладали высокой специфичностью. Авторами доказано, что активный центр абзимов формируется легкой цепью, а тяжелая цепь иммуноглобулина отвечает за возрастание сродства при связывании субстрата [13, 169]. Иммуноглобулины классов G, M и A крови больных РС гидролизуют входящий в состав миелин-фосфолипидной оболочки аксонов основной белок миелина (ОБМ), что способствует развитию данного заболевания [170, 171]. Более того, опубликованы данные, согласно которым IgG с протеолитическими активностями, направленными против ОБМ, присутствуют у больных аутизмом [172] и шизофренией, причем удельная активность антител возрастает с увеличением продолжительности болезни [173].

В работах [174, 175, 176] показано, что иммуноглобулины классов G и M крови ВИЧ-инфицированных пациентов эффективно расщепляют вирусные обратную транскриптазу и интегразу. IgG больных РС, а так же ВИЧ инфекцией могут гидролизовать ОБМ и, в зависимости от препарата антител, от одного до пяти гистонов человека, играя, тем самым, важную роль как в патогенезе ВИЧ-инфекции, так и при развитии аутоиммунных процессов [177, 178, 179, 180, 181].

Все природные каталитически активные антитела являются поликлональными, т.е. пулы суммарных препаратов IgG, IgA или IgM, выделенные из биологических жидкостей, представляют собой смесь моноклональных антител, исключительно гетерогенных, различающихся по многим кинетическим и термодинамическим характеристикам. Например, они могут содержать легкие цепи как  $\kappa$ -, так и  $\lambda$ -типа, иметь различные рН-оптимумы активности, отличаться по изоэлектрическим точкам, проявлять различное сродство к субстрату, иметь различные профили зависимости активности от ионов металлов. Важно отметить, что набор данных моноклональных антител может зависеть не только от исследуемого заболевания или состояния человека, но и от конкретного индивида. Тем не менее, в случае любого из аутоиммунных заболеваний (АИЗ), в суммарном препарате антител преобладает подфракция абзимов, нарабатываемых преимущественно каким-либо одним из клонов иммунокомпетентных клеток, или же антитела, соответствующие разным клонам, но при этом с достаточно близкими ферментативными характеристиками [26, 27, 164]. Вся совокупность данных по абзимам представлена в следующих обзорах и главах книг [11, 12, 26, 27, 164, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189].

### 1.2.2. Возможные механизмы образования природных каталитически активных антител

В настоящее время рассматривается несколько возможных путей образования природных абзимов. Одним из них является наработка каталитических антител к субстрату или гаптену (ДНК или различным белкам), структура которых может быть изменена вследствие деформации или образования комплексов с какими-либо молекулами и моделировать переходное состояние реакции (**рис. 8А**) [11, 26, 164, 183].

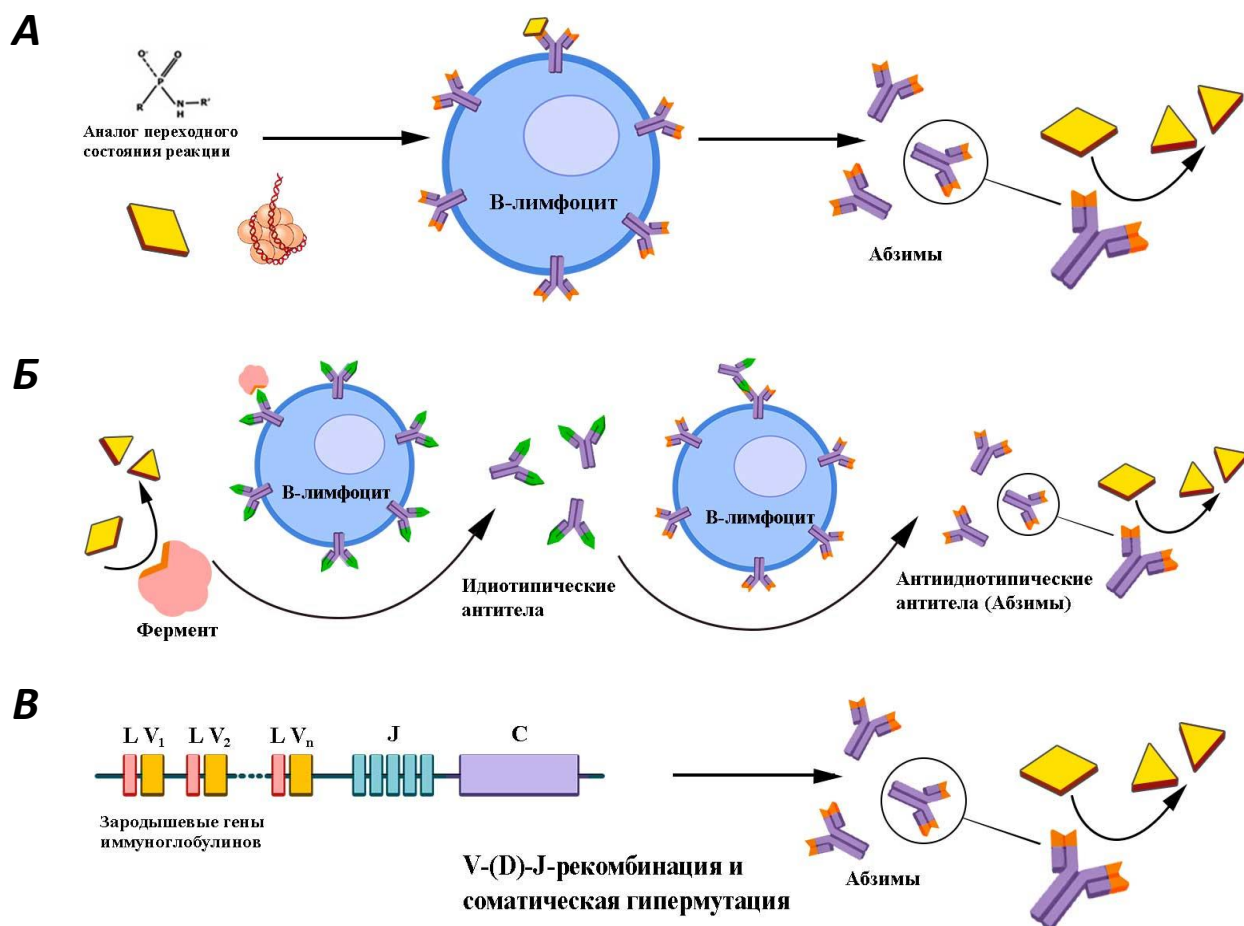
Еще один путь формирования абзимов – антиидиотипическая сеть Эрне [190], согласно которой, антитела, связывающие антиген, могут сами выступать в качестве антигена (*идиотипа*) для других, вторичных антител (*антиидиотипических*), которые, в свою очередь, тоже могут быть антигенами для иммуноглобулинов (**рис. 8Б**). В случае абзимов каталитический центр антитела может являться антиидиотипом активного центра фермента, либо абзима [191, 11, 26, 182, 183].

Образование абзимов также связывают с многообразием продуцируемых организмом антител ( $10^{24}$ – $10^{26}$  возможных вариантов), обусловленным процессами V-(D)-J-рекомбинации и соматической гипермутации зародышевых генов, протекающей после антигенной стимуляции (**рис. 8В**) [192].

В ряде работ показано присутствие в переменных доменах антител с протеолитической активностью аминокислотных последовательностей, благодаря которым антитела катализировали химические реакции по механизму нуклеофильного катализа, сходному с механизмом сериновых протеаз. Установлено, что гены, кодирующие эти аминокислотные последовательности, проявляли высокую степень гомологии с их зародышевыми аналогами переменных доменов антител. На основании полученных данных авторы предположили, что каталитическая активность антител в большей степени определяется зародышевыми генами, в то время как процесс созревания путем накопления соматических гипермутаций имеет меньшее значение [189].

Тем не менее, несмотря на множество исследований, посвященных абзимам, формируются антитела с каталитической активностью во время соматической диверсификации или она «предзаложена» внутри генов иммуноглобулинов зародышевой линии, остается на данный момент нерешенной проблемой [189, 193, 194].





**Рис. 8.** Возможные механизмы образования природных каталитически активных антител.

**А** - наработка каталитических антител к различным гаптенам, моделирующим переходное состояние реакции;

**Б** - образование абзимов за счет идиотип-антиидиотипических взаимодействий антител;

**В** - адаптивное созревание активных центров антител, происходящих из исходных зародышевых генов иммуноглобулинов.

### 1.2.3. Биологическая роль природных каталитически активных антител

Некоторые абзимы могут играть отрицательную роль в развитии различных АИЗ [11, 184, 27, 186, 187, 188, 189]. В качестве примера таких абзимов можно привести ДНК-гидролизующие антитела из сывороток крови больных СКВ [150, 151], РС [157, 158], тиреоидитом Хашимото [156], ВИЧ-инфекцией [163] и шизофренией [162]. Такие абзимы способны проникать через клеточную и ядерную мембраны и стимулировать апоптоз клеток, что, в свою очередь, приводит к повышению концентрации комплексов гистонов и фрагментов ДНК в крови. Показано, что комплексы ДНК с гистонами являются основными антигенами при наработке анти-ДНК антител у людей с аутоиммунными заболеваниями [195]. Повышение уровня гистонов в крови связано с многочисленными патофизиологическими процессами, включая прогрессирование различных АИЗ, вирусных и воспалительных заболеваний [196]. В крови больных СКВ [197, 198], РС [170,

171], ВИЧ-инфекцией [199] и шизофренией [173] обнаружены антитела, гидролизующие ОБМ. Анти-ОБМ абзимы с протеазной активностью могут атаковать ОБМ миелин-протеолипидной оболочки аксонов, что ведет к нарушению проведения нервного импульса. Следовательно, такие абзимы могут играть важную роль в патогенезе некоторых аутоиммунных заболеваний.

Ранние исследования связывали присутствие абзимов в организме исключительно с возникновением различных патологий, однако позднее стали появляться данные, позволяющие предположить, что природные каталитические антитела могут не только участвовать в патогенезе различных заболеваний, но и выполнять защитную функцию [176, 200, 201, 202].

У больных гемофилией А обнаружена высокая протеолитическая активность иммуноглобулинов по отношению к фактору VIII системы свертывания крови [203, 204], однако, с другой стороны, показано, что у некоторых пациентов с приобретенной гемофилией присутствуют каталитически активные антитела, способствующие активации фактора IX, что может приводить к улучшению гемостаза [202]. Абзимы, гидролизующие тиреоглобулин, снижают аутоиммунный ответ к данному белку и, тем самым, возможно могут играть положительную роль в патогенезе аутоиммунного тиреоидита [205]. Данные, согласно которым в сыворотке крови человека найдены  $\beta$ -амилоид-гидролизующие IgM, позволяют предположить участие каталитически активных антител в защите от болезни Альцгеймера [201]. В крови ВИЧ-инфицированных больных обнаружены IgG и IgM с протеолитической активностью, гидролизующие вирусные обратную транскриптазу и интегразу. Показано, что абзимы, гидролизующие интегразу, эффективно подавляют реакции 3'-процессинга и интегрирования, катализируемые данным ферментом [206]. Таким образом, данные антитела могут способствовать защите организма от развития ВИЧ-инфекции [174, 175, 176]. В молоке здоровых рожениц обнаружены sIgA и IgG, обладающие широким спектром ферментативных активностей: они гидролизуют ДНК, РНК, белки, пептиды, олигонуклеотиды, олигосахариды [207, 167]. Более того, показано, что абзимы молока обладают уникальными синтетическими активностями – фосфорилируют белки молока, а также липиды и олигосахариды, прочно связанные с иммуноглобулинами [208, 209, 210].

Каталитически активные антитела обладают более высоким сродством к субстрату по сравнению с ферментами (значения  $K_m$ , как правило, в 10–1000 раз ниже), тем не менее, значения их  $k_{cat}$  варьируют в пределах  $10^{-5}$ – $10^3$  мин<sup>-1</sup>, что свидетельствует о значительно более низких скоростях преобразования субстрата. Однако, несмотря на то, что скорости реакций, осуществляемых абзимами, могут быть на несколько порядков

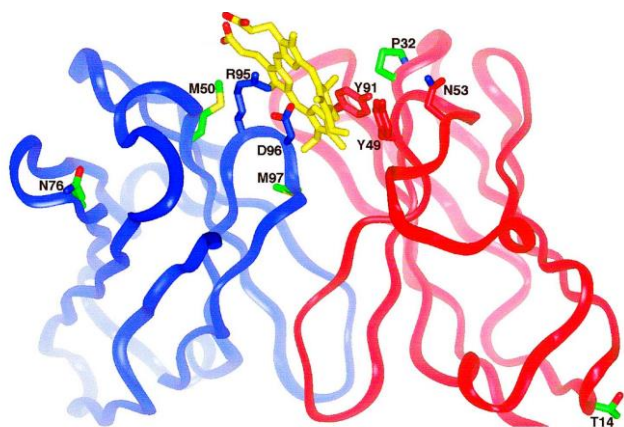
ниже скоростей, соответствующих им канонических ферментов, антитела обнаруживаются в сыворотке крови в гораздо более высоких концентрациях (от 1 до 10 мг/мл) и могут сохраняться с очень длительным периодом полураспада (от 1 до 3 недель) [211, 212]. Следовательно, сочетание таких факторов, как высокая концентрация антител, (даже если принять во внимание тот факт, что непосредственно каталитической активностью обладает лишь малая часть из них), и большая продолжительность действия абзимов в сыворотке по сравнению с каноническими ферментами, может компенсировать низкие скорости катализа абзимов.

#### **1.2.4. Искусственные каталитически активные антитела с оксидоредуктазными активностями**

Одними из самых ранних работ по получению искусственных абзимов с оксидоредуктазными активностями стали исследования, посвященные гем-содержащим абзимам. Учитывая строение известных гемопротеинов, при разработке антител, способных участвовать в реакциях окисления, необходимо было создать такую структуру, которая сочетала бы в себе следующие элементы: простетическую группу, в качестве которой может выступать гем или (Fe)(III)-протопорфирин IX, отвечающие за связывание с такими лигандами, как O<sub>2</sub> (гемоглобин, цитохромы P450) или за перенос электронов (пероксидазы) и апопротеин, который с одной стороны связывает и «изолирует» гем, предотвращая его агрегацию и бимолекулярное самоокисление, а с другой – содержит аминокислоты, которые могут обеспечить гидрофобную среду для субстрата и, возможно, непосредственно участвовать в катализе. Таким образом, при создании гемоабзимов гем имитировался синтетическим металлопорфирином, а в качестве апопротеина выступала белковая молекула антитела.

В 1990 году с помощью гибридной технологии получено антитело 7G12 с использованием N-метилмезопорфирина IX (N-CH<sub>3</sub>-MPIX) в качестве гаптена [213]. Показано, что комплекс Fe (III)-MPIX-7G12 катализирует в присутствии пероксида водорода окисление нескольких типичных субстратов пероксидаз, таких как о-дианизидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоикислоту) (ABTS) и пирогаллол. Кинетические параметры для катализируемого антителом окисления субстратов: соотношение  $k_{cat}/K_m$  составило для ABTS 233 М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, а для пирогаллола – 122 М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>. Определена структура комплекса Fe (III)-MPIX-7G12 (**рис. 9**) [214]. Показано, что приблизительно две трети мезопорфирина взаимодействует с «карманом» антитела, три пиррольных кольца плотно прилегают к остаткам VH домена, а два пиррольных кольца находятся напротив остатков тирозина VL домена. Кроме того, метионин H100

специфически взаимодействует с одним пиррольным кольцом и заставляет его принять наклонную конформацию, наиболее благоприятную для проникновения ионов металлов в порфириновое кольцо, что объясняет феррохелатазную активность антитела 7G12.

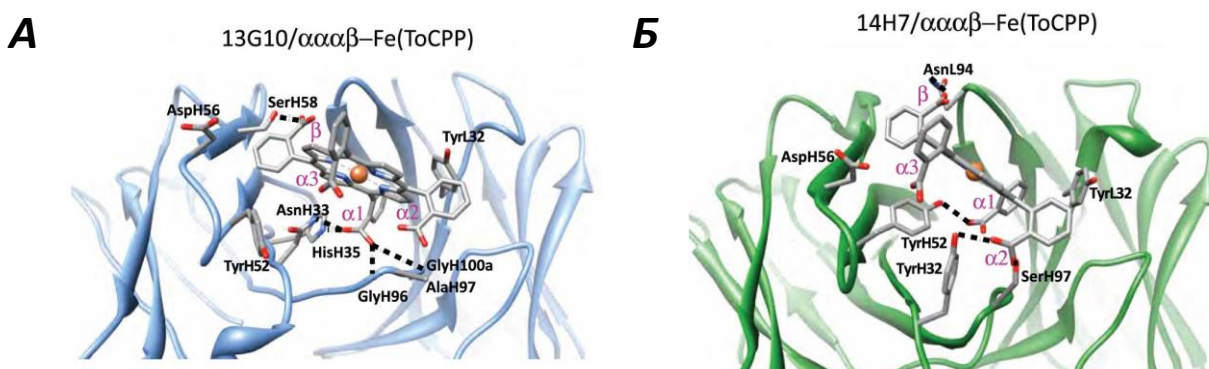


**Рис. 9.** Трехмерная структура домена переменной области комплекса Fab-фрагмента 7G12 с гаптенем. VH и VL домены обозначены синим и красным цветом соответственно. Гаптен окрашен желтым цветом. Рисунок адаптирован из Romesberg F. E. et al., 1998 [214].

Тот же N-метилмезопорфирин IX-гаптен был использован двумя другими группами исследователей, которые соответственно получили два моноклональных антитела, 2B4 и 9A5. При связывании с Fe(III)-MPIX оба эти антитела обладали пероксидазной активностью. 9A5-Fe (III)-MPIX комплекс оказался способным катализировать окисление пирогаллола с помощью  $H_2O_2$  [215]. 2B4-Fe (III)-MPIX катализировал реакцию окисления о-дианизидина и ABTS в присутствии  $H_2O_2$ , но не проявлял активности в отношении пирогаллола или гидрохинона [216].

В работе [217] проведена иммунизация мышей линии BALB/c гаптенем  $\alpha,\alpha,\alpha,\beta$ -Fe(ToCPP) и с помощью гибридной технологии получены моноклональные антитела 13G10 и 14H7, принадлежащие к подклассу IgG1. Установлено, что 13G10 и 14H7 связывают порфирин в качестве гаптена с наномолярной аффинностью. Комплексы 13G10-Fe (ToCPP) и 14H7-Fe (ToCPP) (**рис. 10**) демонстрировали высокую пероксидазную активность и катализировали окисление 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты) (ABTS) в 5–8 раз эффективнее, чем один кофактор. Определены кинетические константы реакции окисления ABTS при pH 4,6 для комплекса 13G10-Fe (ToCPP). Значения  $k_{cat}$ , достигали  $540 \text{ мин}^{-1}$ , соотношение  $k_{cat}/K_m$  оказалось равным  $6,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ . Кроме того, обнаружено, что комплекс  $\alpha,\alpha,\alpha,\beta$ -Fe(ToCPP)-13G10 катализирует окисление различных субстратов, таких как о-дианизидин, пирогаллол и тетраметилбензидин не только в присутствии  $H_2O_2$ , но также и в присутствии гидропероксидов ROOH, отличных от пероксида водорода, включая гидропероксиды

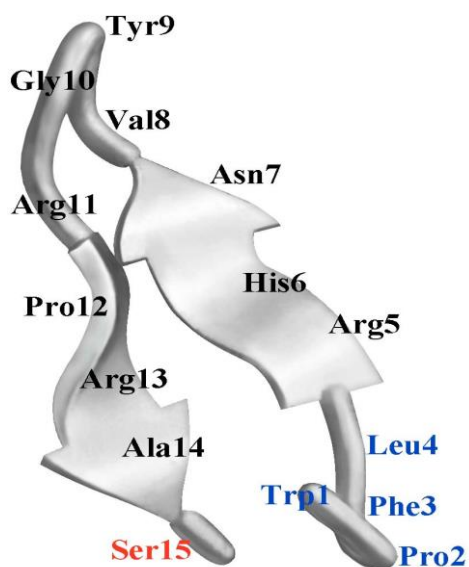
алкила и жирных кислот. Оказалось, что пероксидазная активность  $\alpha,\alpha,\alpha,\beta$ -Fe(ToCPP)-13G10 максимальна при pH ниже 5 и что аминокислота с pKa около 4,6 может участвовать в механизме реакции. Авторы предположили, что карбоксильная группа порфиринового кольца может протонировать атом кислорода  $H_2O_2$  и способствовать высвобождению молекулы воды [218]. После детального изучения структуры 13G10-Fe (ToCPP) и 14N7-Fe (ToCPP) комплексов сделано предположение, что связывание пероксида водорода на поверхности порфиринового кольца происходит в гидрофобном кармане, подобном тому, который присутствует в пероксидазе хрена [219].



**Рис. 10.** Трехмерная структура активных центров комплексов 13G10-Fe (ToCPP) (А) и 14N7-Fe (ToCPP) (Б). Рисунок адаптирован из Robles V. M. et al., 2012 [219].

В работе [220] авторы предположили, что ранее полученные комплексы антитело-порфирин не столь эффективны, как их естественные аналоги гемопротейны, так как обладают пероксидазной активностью, характеризующейся величиной соотношения  $k_{cat}/K_m$  от четырех до трех порядков более низкой, нежели пероксидазы, вследствие отсутствия в этих антителах аминокислота подобной гистидину, который в пероксидазах аксиально координирует атом железа и повышает его окислительно-восстановительный потенциал. Поэтому авторы использовали в качестве гаптена микропероксидазу 8 (MP8) – октапептидный гем, в котором имидазольное кольцо гистидина (His18) действовало как внутренний лиганд атома железа. Получен набор из шести моноклональных антител, одно из них, (3A3), связывалось с MP8 с константой диссоциации равной  $10^{-7}$  М. Комплекс 3A3–MP8 обладал пероксидазной активностью и характеризовался величиной соотношения  $k_{cat}/K_m = 2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$  более высокой, чем какие-либо другие антитело-порфириновые комплексы, полученные ранее.

В работе [221] описан селенопептид (15SeP), обладающий ферментативной активностью GPx. Данный пептид получен путем введения в 15P полипептид (рис. 11) селеногидрильной группы с помощью химической модификации гидроксильной группы серина.



**Рис. 11.** Трехмерная структура 15SeP. Рисунок адаптирован из Sun Y. et al., 2004 [221]. Область модификации Ser → Sec выделена красным. Аминокислотные остатки участка связывания субстрата отмечена синим цветом.

15SeP состоял из 15 аминокислотных остатков: первые четыре (Trp, Pro, Phe, Leu) формировали гидрофобный участок для связывания субстратов ( $\text{ROOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), в 5 и 13 положении находился Arg, способный образовать солевой мостик с карбоксильной группой GSH, на конце располагался селеноцистеин, обуславливающий каталитическую активность, в 10 положении располагался Gly, обеспечивающий конформационную гибкость пептида. Авторами показано, что данный селенопептид обладает высокой активностью, низкой цитотоксичностью, маленьким по сравнению с нативным ферментом размером, благодаря которому легко проникает в клеточную мембрану, высокой стабильностью и увеличивает глутатионпероксидазную активность в клетках. Соотношения  $k_{\text{cat}}/K_m(\text{CuOOH})$  и  $k_{\text{cat}}/K_m(\text{H}_2\text{O}_2)$ , отражающие эффективность восстановления данных субстратов для 15SeP составили  $7,55 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$  и  $2,42 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$  соответственно и были близки к таковым для глутатионпероксидаз.

В работе [222] исследовано полученное с помощью гибридной технологии антитело B13-DE1 против флуоресцина. Оказалось, что оно катализирует окислительно-восстановительную реакцию, превращая резазурин в резорурфин в присутствии сульфит-ионов. Данная активность сохраняется при высокой температуре (окисление субстрата происходит даже при  $65^\circ \text{C}$ ) и ингибируется ионами  $\text{Cl}^-$ .

Несколько типов моноклональных селен-содержащих каталитических антител получены химическим превращением реакционноспособных сериновых остатков в селеноцистеин. Эти селен-содержащие абзимы, проявляли глутатионпероксидазную активность и имитировали цитозольную глутатионпероксидазу [223, 224, 225]. Один из них, абзим 2F3 (Se-2F3), обладал высокой каталитической активностью, в 4,3 раза

превосходящей активностью GPx печени кролика [225]. Для создания белка с перспективой дальнейшего использования в фармакологии и изучения каталитической активности Se-2F3, авторы секвенировали, клонировали и экспрессировали гены варибельной области 2F3 в виде одноцепочечных антител (2F3-scFv), а затем методом химической модификации включили в (2F3-scFv) селен, в результате чего получили селенсодержащее антитело (Se-2F3-scFv), катализирующее восстановление  $H_2O_2$  со скоростью, приближающейся к нативному ферменту GPx из печени кролика. Показано, что остаток селеноцистеина данного антитела расположен в каталитическом центре и необходим для его активности. Оптимальные параметры реакции, такие, как значение pH и температуры, для Se-2F3-scFv-катализируемого восстановления пероксида водорода определены как 8,3 и 47,2° C соответственно, и близки к параметрам фермента GPx [226]. Для оценки антиоксидантной способности Se-2F3-scFv, была создана модель, позволяющая исследовать способность Se-2F3-scFv защищать митохондрии от окислительного повреждения. Согласно полученным данным, антитело Se-2F3-scFv заметно ингибировало перекисное окисление липидов [227]. Позднее авторы получили еще одно каталитическое антитело Se-scFv-B3 человека с глутатионпероксидазной активностью [228]. С помощью фагового дисплея был выбран новый клон 2D8, после чего антитело scFv-2D8 экспрессировали в растворимой форме и очищали аффинной хроматографией. После превращения в селенсодержащую форму scFv путем химической модификации, данное антитело показало еще более высокую активность GPx по сравнению с абзимом Se-scFv-B3 [229]. В настоящее время исследования с целью получения GPx-абзима человеческого происхождения с более низкой молекулярной массой и более высокой активностью продолжаются.

#### **1.2.5. Природные каталитически активные антитела с оксидоредуктазными активностями**

Впервые окислительно-восстановительная активность поликлональных иммуноглобулинов описана в работе А. Кульберга и И. Петяева. Авторы продемонстрировали, что IgG в модельных химических системах катализируют супероксид-зависимые процессы. Кроме того, показано, что активность антител существенно возрастает при образовании иммунного комплекса, возможно, за счет изменения конформации молекулы. Позднее были изучены каталитические свойства IgG в комплексе с R-белками – продуктами катаболизма рецепторов клеточных мембран. Как оказалось, и сам комплекс, и отдельные его компоненты IgG и R-белки, обладали



ферментативной активностью, сходной с супероксиддисмутазной, однако активность комплекса была в 100 раз выше [230].

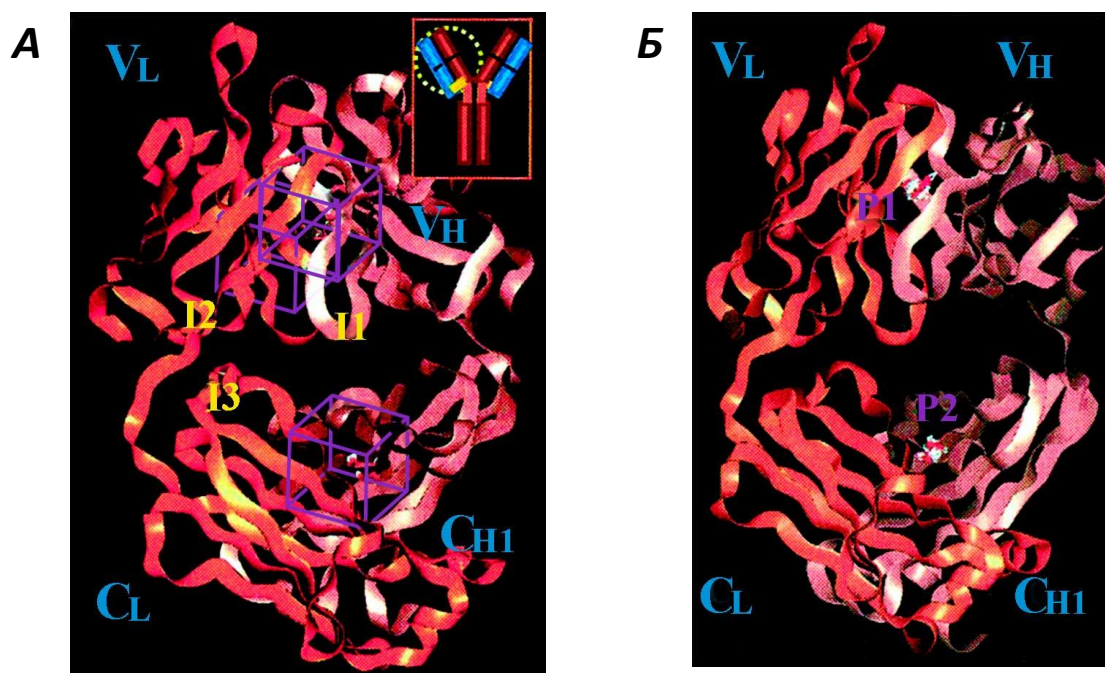
В 2000 году группой Lerner R [16] проведен ряд экспериментов, показавших, что антитела обладают супероксиддисмутазной активностью: иммуноглобулины взаимодействовали с высокореакционноспособным синглетным  $^1\text{O}_2^*$  и восстанавливали его в более стабильный  $^{\cdot}\text{O}_2^-$  с образованием пероксида водорода. В работе использовались моноклональные антитела различных млекопитающих, принадлежащие к IgG1<sub>к</sub>, IgG2a<sub>к</sub>, IgG2b<sub>к</sub> изотипам, F(ab)<sub>2</sub> моноклональных антител козы и поликлональные IgG лошади и человека. Важно отметить, что в ряде экспериментов использовалось не только UV-облучение, но и химический источник  $^1\text{O}_2$ . Например, инкубация моноклонального антитела овцы 31243 в темноте при 37°C в присутствии 3'3'-(1,4-нафтилиден)-дипропионата также приводила к образованию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В качестве возможного механизма реакции авторы предложили окисление остатков ароматических аминокислот или дисульфидных групп молекулы антитела в процессе переноса электронов на  $^1\text{O}_2^*$ . В дальнейших работах авторы установили, что в процессе восстановления синглетного кислорода образуется пероксид водорода в более высоких концентрациях, нежели можно было ожидать при окислении аминокислот активного центра. Исследования по включению изотопов и анализ кинетических параметров реакции позволили установить, что антитела в качестве источника электронов при восстановлении синглетного кислорода используют H<sub>2</sub>O [231]. В результате данного процесса происходит образование H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в качестве первого промежуточного продукта каскада реакций, который в конечном итоге, приводит к формированию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Основной функцией абзима в качестве катализатора может являться стабилизация промежуточного продукта H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и препятствие его обратного превращения. Datta D. с соавторами [232] на основании экспериментов [233] предложили следующий механизм восстановления  $^1\text{O}_2$ :

1. взаимодействие  $^1\text{O}_2$  с двумя молекулами воды с образованием HO<sub>2</sub>OH
2. формирование димера из двух молекул HO<sub>2</sub>OH
3. внутримолекулярная перегруппировка димера 2(HO<sub>2</sub>OH) и образование [HO<sub>2</sub> – HO<sub>2</sub>OH + H<sub>2</sub>O]
4. внутримолекулярная перегруппировка [HO<sub>2</sub> – HO<sub>2</sub>OH + H<sub>2</sub>O] и образование [HO<sub>2</sub>OH – OOH + H<sub>2</sub>O]
5. внутримолекулярная перегруппировка [HO<sub>2</sub>OH – OOH + H<sub>2</sub>O] с образованием продукта реакции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и промежуточного соединения HO<sub>2</sub>OOH
6. расщепление HO<sub>2</sub>OOH на две молекулы HO<sub>2</sub> с их последующей ассоциацией и формированием циклического HO<sub>2</sub> димера



7. перегруппировка НОО димера и образование конечных продуктов реакции:  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2$ .

В результате детального изучения активного центра Fab определены сайты взаимодействия промежуточных продуктов реакции с антителом. Обнаружено три сайта связывания мономера и димера  $\text{H}_2\text{O}_3$  (I1, I2 и I3) (рис. 12). Два из них, I1 и I2, находились в районе стыка VH и VL цепей, а один – I3 – между CH1 и CL доменами. Сайт связывания  $\text{H}_2\text{O}_2$  состоял из двух кластеров P1 и P2. P1 располагался у основания антигенсвязывающей области, а P2 между CL и CH1 доменами и перекрывал I3. При исследовании кристаллической структуры этих кластеров не было обнаружено молекул воды, что указывает на то, что эти сайты погружены в гидрофобные карманы. Около I1 сайта тяжелой цепи располагался Trp109, который, по мнению авторов, может отвечать за взаимодействие с синглетным кислородом.



**Рис. 12.** Трехмерная структура участков связывания Fab с  $\text{HO}_2\text{OH}$  димерами (А) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Б). Рисунок адаптирован из Datta D. et al., 2002 [232].

На основании представленных данных можно сделать вывод, что, являясь акцепторами свободных радикалов, абзимы могут проявлять защитные свойства в организме, предотвращая перекисное окисление белков и липидов. Кроме того, согласно работе [234], нельзя исключить, что молекулы абзимов, независимо от их специфичности, оказывают значительное влияние на дыхательный “взрыв” в макрофагах, так как при опсонизации антигенов антитела в составе поглощенных иммунных комплексов проникают в макрофаг.

В работе [235] определена супероксиддисмутазная активность поликлональных IgG группы из шести крыс линии Wistar с помощью непрямого метода по ингибированию восстановления цитохрома C в системе ксантин/ксантинооксидаза. Показано, что IgG всех животных обладали достоверно тестируемой активностью. М.В. Волковой [18] проведено сравнение супероксиддисмутазной активности поликлональных IgG сыворотки здоровых доноров и пациентов с острым реактивным артритом, ассоциированным с урогенитальной инфекцией, вызванной *Chlamydia trachomatis*. Обнаружено статистически значимое повышение уровня активности абзимов больных по сравнению с группой здоровых лиц, причем удельная активность антител возрастала с увеличением тяжести заболевания. По мнению авторов, увеличение супероксиддисмутазной активности при различных патологиях может являться защитным противовоспалительным механизмом.

Проведено исследование супероксиддисмутазной активности IgG у здоровых людей и пациентов с различными типами рассеянного склероза [236]. Важной особенностью данной работы являлось подтверждение с помощью ряда строгих критериев принадлежности SOD – активности антителам. Показано, что супероксиддисмутазная активность у пациентов с рассеянным склерозом статистически значимо превышает данную активность у здоровых людей в 2-4 раза, причем максимальная активность обнаружена у пациентов с рецидивирующим ремиттирующим рассеянным склерозом. На основе данных, полученных с помощью ингибиторного анализа, авторами работы сделано предположение об участии ионов меди в катализе реакции дисмутации супероксидного анион-радикала иммуноглобулинами класса G.

В последние несколько лет активно изучается каталазная активность поликлональных иммуноглобулинов пациентов с различными заболеваниями. В 2017 году Ермаков Е.А. с соавторами [22], выполнив все необходимые эксперименты для доказательства отнесения активности непосредственно к антителам, впервые показали, что поликлональные иммуноглобулины G человека обладают каталазной активностью. Кроме того, было проведено сравнение активности поликлональных IgG сыворотки здоровых доноров, пациентов с шизофренией и их Fab- и F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов. Стоит отметить, что только треть препаратов антител в обеих группах являлась каталитически активной. Несмотря на то, что относительная каталазная активность IgG пациентов с шизофренией и здоровых доноров значительно варьировала от пациента к пациенту, показано, что активность IgG здоровых доноров в среднем в 15,8 раз ниже, чем у пациентов с шизофренией. Авторами проведено исследование металл- и pH-зависимости, а также кинетических параметров реакции разложения пероксида водорода. Все препараты поликлональных IgG обладали металлизависимой и независимой каталазной

активностью. Ионы  $\text{Co}^{2+}$  лучше каких-либо других ионов металлов увеличивали скорость реакции, в то время как влияние на активность абзимов ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  оказалось слабым, либо отсутствовало совсем. Каждый из препаратов поликлональных IgG демонстрировал несколько отдельных ярко выраженных оптимумов pH в диапазоне от 4,0 до 9,5. По мнению авторов, эти данные свидетельствуют об индивидуальном репертуаре и большом разнообразии IgG с каталазной активностью у каждого человека. В работах [19, 20, 21] описаны IgG и IgA с каталазной активностью больных острым реактивным артритом, ранним ревматоидным артритом, а также пациенток с новообразованиями молочной железы.

Интересные результаты получены при исследовании каталазной активности IgG у пациентов с различным типом рассеянного склероза [236]. Показано, что каталазная активность у IgG здоровых доноров ( $300,3 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2 / \text{мин} / \text{мг белка}$ ) почти в 2 раза ниже, чем у пациентов с рецидивирующим ремиттирующим рассеянным склерозом ( $621,5 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2 / \text{мин} / \text{мг белка}$ ) и пациентов со вторично-прогрессирующим рассеянным склерозом ( $513,0 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2 / \text{мин} / \text{мг белка}$ ), в то же время различий между уровнем активности антител у пациентов с разными типами рассеянного склероза авторами не обнаружено.

Группой Генералова [23] проведено исследование ферментативных активностей препаратов различных подклассов иммуноглобулинов G (IgG1, IgG2 и IgG4), выделенных из крови пациентов с острым вирусным гепатитом В, хроническим вирусным гепатитом С, а также из крови здоровых доноров. Оказалось, что все препараты IgG обладают достоверно тестируемой пероксидазной активностью – окисляют ароматический амин в присутствии пероксида водорода. Этот же коллектив авторов изучал взаимодействие поликлональных IgG из сыворотки крови человека с различными ионами металлов с помощью металл-хелатирующих сорбентов. Исследование показало, что добавление  $\text{CuSO}_4$  в конечной концентрации  $4,7 \times 10^{-5} \text{ М}$  приводило к значительному увеличению активности по сравнению с исходной (в среднем  $7,8 \pm 2,97$  раз) [237].

Пероксидазная активность IgG наблюдалась в сыворотке пациентов, имеющих хронический гастрит и/или дуоденит с персистенцией *Helicobacter pylori* в антральном отделе желудка и/или ДПК [25], у больных раком желудка и бронхиальной астмой [238].

Позднее появился еще ряд работ, в которых проводилось сравнение пероксидазной активности препаратов иммуноглобулинов в норме и при различных заболеваниях. Установлено, что у больных с аутоиммунной патологией щитовидной железы пероксидазная активность IgG достоверно выше, чем у здоровых доноров. Авторы предположили, что у таких больных она может возникать по антиидиотипическому

механизму, где в качестве индуктора абзимогенеза выступает эндоантиген щитовидной железы – тиреопероксидаза [238]. Также показано, что пероксидазная активность поликлональных IgA из ротовой жидкости пациентов с хроническим периодонтитом достоверно выше активности IgA лиц без патологии периодонта [24].

В 2005 году появились данные, согласно которым поликлональные IgG крови здоровых крыс линии Wistar обладают пероксидазной (зависимой от пероксида водорода) и независимой от пероксида водорода оксидазной (и/или оксигеназной) активностью, окисляя 3,3'-диаминобензидин (DAB) – один из классических субстратов пероксидазы хрена (ПХ) [17]. Отличительной чертой этого исследования являлось доказательство того, что обе наблюдаемые активности IgG являются собственной функцией антител, а не следствием загрязнения препаратов иммуноглобулинов совыделяющимися микропримесями ферментов. Для этого авторы использовали строгие, ранее разработанные критерии, позволяющие утверждать о принадлежности данной активности непосредственно к антителам [11, 26, 164, 183]. Значения  $k_{cat}$  реакции окисления DAB поликлональными IgG, выделенными из крови одиннадцати крыс, варьировали в диапазоне от  $1,8 \times 10^2$  до  $2,9 \times 10^3$  мин<sup>-1</sup> в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и от  $1,1 \times 10^3$  до  $3,6 \times 10^3$  мин<sup>-1</sup> в отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Значение  $K_m$  в присутствии и в отсутствие пероксида водорода варьировало в пределах  $(1,0-6,0) \times 10^{-4}$  М. Таким образом было показано, что пероксидазная и оксидоредуктазная активности поликлональных IgG крыс линии Wistar на 1–3 порядка выше удельной активности большинства известных искусственных и природных каталитически активных антител.

При проведении последующих исследований отмечено, что прединкубация поликлональных IgG крыс Wistar с 0,5–2,0 М NaCl или KCl приводит к уменьшению как пероксидазной, так и оксидоредуктазной активностей. На основании этих данных авторы предположили, что, вероятно, обе эти активности антител металло-зависимые, но, в то же время, сродство ионов металлов к IgG является низким, так как они легко замещаются ионами K<sup>+</sup> или Na<sup>+</sup>. В работе [239] показано, что все ионы двухвалентных металлов, соответствующие металлам, обнаруженным в препаратах IgG из сыворотки крыс с помощью атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров в двухструйном дуговом плазмотроне, (Fe, Cu, Ni, Co, Mn, Mg, Ca, Zn), оказались способны в разной степени активировать пероксидазную и оксидоредуктазную активности антител. Кроме того, все препараты IgG утрачивали свою активность после полного удаления ионов металлов, связанных с ними, с помощью ЭДТА. Однако, все активности полностью восстанавливались после инкубации IgG с экзогенными ионами Fe<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>.

Согласно данным, представленным в [240, 241], поликлональные IgG крыс линии

Wistar обладали широкой субстратной специфичностью и эффективно окисляли не только DAB, но также и другие субстраты ПХ, такие как о-фенилендиамин, фенол, р-гидрохинон, а-нафтол и NADH.

На основании полученных данных, а также принимая во внимание тот факт, что согласно [16, 231, 234] некоторые абзимы могут превращать  $\cdot\text{O}_2^-$  в  $\text{H}_2\text{O}_2$ , авторы предположили, что полный репертуар поликлональных абзимов крыс млекопитающих может служить дополнительной естественной системой детоксикации различных видов активных форм кислорода, а также различных токсичных, мутагенных и канцерогенных соединений.

Как указано выше, в нормально функционирующих клетках активированные кислородные метаболиты участвуют в процессах, необходимых для жизнедеятельности, но при высоких концентрациях могут быть опасны, так как благодаря своей реакционной способности являются сильными окислителями и вступают в реакции с различными компонентами клетки, приводя к их повреждению. Канонические ферменты антиоксидантной защиты организма, такие как супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, препятствуют образованию окислительных модификаций клеточных компонентов, однако в крови они быстро инактивируются [28, 29]. В последние несколько десятилетий проведено множество исследований различных активностей природных абзимов, в том числе ряд публикаций посвящен иммуноглобулинам с оксидоредуктазными активностями [16-25, 231, 232, 235, 237, 239, 240, 241]. Несмотря на то, что в некоторых работах сообщается о достоверно тестируемой пероксидазной активности препаратов различных подклассов иммуноглобулинов G человека [23, 24, 25, 237], ни в одной из них не приведено доказательств отнесения пероксидазной активности непосредственно к антителам и не проведено изучения их ферментативных свойств. Учитывая то, что антитела с окислительно-восстановительными функциями могут играть значимую роль в защите людей и других млекопитающих от окислительного стресса, детальное исследование их ферментативных свойств является исключительно важным.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Реактивы и материалы

В работе использовали следующие материалы и реактивы: 3,3'-диаминобензидин (DAB), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевая соль (ABTS), гомованилиновая кислота (HVA),  $\alpha$ -нафтол, 1,4-дителиотреит (ДТТ), NaOH, о-фенилендиамин (OPD), гидрохинон (HQ), NaN<sub>3</sub>, персульфат аммония (PSA), 3-амино-9-этилкарбазол (АЕС), гидроксид натрия, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> (Sigma, США); соляная кислота, уксусная кислота, серная кислота, этанол, бутанол-1, изопропанол, (Реахим, Россия); пероксидаза хрена (Диа-М, Россия); Тритон X-100, краситель бромфеноловый синий, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, трихлоруксусная кислота, додецилсульфат натрия (SDS), Coomassie Blue R-250 (Helicon, Россия); глицерин (PanReac AppliChem, США); EDTA, EGTA, акриламид, N,N-метилен-бисакриламид, трис-гидроксиметил-аминометан, хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (Amresco, США); Chelex-100 (BioRAD, США); Coomassie brilliant blue G250, глицин, адреналин (MP Biomedicals, США); TEMED, 2-меркаптоэтанол, 5-аминосалициловая кислота (5-AS) (Acros Organics, США); CaCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> (Fluka, Швейцария); маркеры молекулярной массы белков для белкового электрофореза (Thermo Fisher Scientific, США); хроматографические сорбенты: protein A-Sepharose, protein G-Sepharose (Pharmacia, Швеция), Whatmann 3ММ (Whatmann, США); планшеты для ИФА (Grenier Bio-One, Германия); колонки для выделения белков HiTrap Protein G HP column, HiTrap Protein A HP column, Superdex 200 HR column (GE Healthcare, Швеция); микроцентрифужные пробирки, наконечники для пипеток (Ахуген, США), концентраты Centricon 10 кДа (Millipore, США).

В работе использовали следующее оборудование: хроматографические системы Akta Purifier (GE Healthcare, Швеция), BioCAD (Perseptive Biosystems, США), сканер 96-луночных планшет Uniscan II (Thermo Scientific, США), спектрофлуориметр Cary Eclipse, спектрофотометр Carry-100 Bio UV-visible (Varian, США), спектрофотометры BioPhotometer plus (Eppendorf, США), Genesis 10S Bio (Thermospectronic, США), ротационный испаритель Concentrator plus (Eppendorf, США).

Анализ металлов в препаратах иммуноглобулинов и сыворотке крови методом атомно-эмиссионного спектрального анализа с возбуждением спектров в двухструйном дуговом плазмотроне проведен в ИНХ СО РАН Закас Н. П. согласно [242].

Анализ содержания селена в препаратах иммуноглобулинов с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения проведен Закас Н. П. в ИНХ СО РАН согласно [243].

В качестве материала исследования в работе использовали следующие препараты крови:

- Препараты крови здоровых самцов крыс линии Wistar (38 месяцев), содержащихся в стандартных условиях (ИЦиГ СОРАН).
- Препараты сыворотки крови 10 здоровых доноров в возрасте от 19 до 45 лет (5 мужчин и 5 женщин) любезно предоставленные Дорониным Б. М. (Новосибирский медицинский университет). Критериями включения данных препаратов в исследование являлось отсутствие у них аутоиммунных патологий, а также инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний.
- Препараты сыворотки крови 10 больных системной красной волчанкой в возрасте от 25 до 59 лет (7 женщин и 3 мужчины), любезно предоставленные Коненковой Л. П. (НИИ Клинической иммунологии СО РАМН). Диагноз СКВ установлен в соответствии с диагностическими рекомендациями EULAR [244].
- Препараты сыворотки крови 11 больных рассеянным склерозом в возрасте от 16 до 55 лет (7 женщин и 4 мужчины), любезно предоставленные Дорониным Б.М. (Кафедра неврологии Новосибирского государственного медицинского университета). Диагноз клинически определен согласно критериям McDonald [245].

Протокол исследования одобрен местным этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, Россия) и соответствует принципам Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации и иным нормативно-правовым документам, регламентирующим проведение биомедицинских исследований в РФ. У каждого обследуемого лица получено информированное согласие на проведение исследования.

Больные СКВ и РС не получали каких-либо иммуносупрессирующих препаратов не менее месяца до госпитализации, включения в исследование и забора крови.

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Приготовление препаратов сыворотки крови крыс.**

Кровь забирали в пробирки для коагуляции, затем пробирки со свернувшейся кровью центрифугировали в течение 10 мин при 4°C (4500 g). Полученную сыворотку крови отделяли от клеточного осадка и замораживали при –20°C.

### **2.2.2. Выделение иммуноглобулинов из крови крыс**

Сыворотку крови здоровых крыс линии Wistar (3–4 мл) размораживали при 4°C, разбавляли в четыре раза 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, центрифугировали для удаления возможного осадка и наносили на колонку с протеин А-сефарозой (объемом 5 мл), предварительно уравновешенную этим же буфером согласно [239–241]. Белки, не связавшиеся с сорбентом, элюировали с колонки 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 0.1 М NaCl, до полного исчезновения оптической плотности при  $\lambda = 280$  нм. Далее, для удаления неспецифически адсорбированных белков и липидов колонку промывали 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 1% Triton X-100 до исчезновения оптической плотности элюата при  $\lambda = 280$  нм. Фракцию, содержащую IgG, элюировали с помощью 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 4,5. Далее, для выделения суммарной фракции IgM + IgA, колонку промывали 0,1 М калий-фосфатным буфером, рН 3,3. Полученные фракции антител по мере выхода с колонки собирали в охлажденные во льду пробирки, содержащие 50 мкл 0,5–1 М калий-фосфатного буфера, рН 8,5, дотитровывали им до рН 7,0, затем диализовали против 20 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0, и, при необходимости, концентрировали при 4°C с использованием концентраторов Centricon (предел исключения 10 кДа) при 4500g на центрифуге Centricon-T-42K.

### **2.2.3. Выделение иммуноглобулинов G из сыворотки крови человека**

Сыворотку крови (2 мл) размораживали при 4°C, разбавляли в четыре раза 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, центрифугировали для удаления возможного осадка и наносили на колонку с протеин G-сефарозой (HiTrap Protein G HP column), объемом 1 мл, предварительно уравновешенную тем же буфером согласно [170, 171]. Белки, не связавшиеся с сорбентом, элюировали 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, до полного исчезновения поглощения при  $\lambda = 280$  нм. Далее, для удаления неспецифически адсорбированных белков и липидов колонку промывали 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 1% Triton X-100 до исчезновения оптической плотности элюата при  $\lambda = 280$  нм. IgG элюировали 50 мМ буфером Gly-НСl, рН 2,6. Полученные фракции IgG по



мере выхода с колонки собирали в охлажденные во льду пробирки, содержащие 50 мкл 0,5 М буфера Трис-НCl, pH 8,8, дотитровывали им до pH 7,0, затем диализовали против 25 mM буфера Трис-НCl, pH 7,5, далее, при необходимости, концентрировали при 4<sup>0</sup>С с использованием концентраторов Centricon (предел исключения 10 кДа) при 4500g на центрифуге Centricon-T-42К.

#### **2.2.4. Очистка препаратов IgG**

Препараты IgG после выделения на аффинных сорбентах очищали от возможных примесей в условиях разрушения прочных нековалентных комплексов с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex-200 HR (10/30), предварительно уравновешенной 0,1 М буфером Gly-НCl, pH 2,6, содержащим 0,15 М NaCl согласно [170, 171]. Белок элюировали тем же буфером со скоростью 0,3 мл/мин. Полученные фракции сразу нейтрализовали 0,5 М буфером Трис-НCl, pH 9,0, диализовали против 25 mM калий-фосфатного буфера, pH 7,0, и оставляли для восстановления активности антител после “кислого шока” на 14 суток при 4<sup>0</sup>С.

#### **2.2.5. Определение концентрации белка**

Концентрацию белка в препаратах антител определяли спектрофотометрически по формуле  $C = A_{280} \times 0,71$ , где значение  $A_{280}$  являлось концентрацией, измеренной при длине волны 280 нм, а значение 0,71 являлось коэффициентом, рассчитанным с использованием коэффициента молярной экстинкции при 280 нм для IgG ( $\epsilon=210\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) [246].

Также концентрацию белка определяли с помощью окраски белков Coomassie brilliant blue G250. Образцы антител (2 мкл) и калибровочные растворы (2 мкл), приготовленные с использованием бычьего сывороточного альбумина в диапазоне концентраций 0,5–2 мг/мл, наносили на бумагу Whatman 3MM и высушивали. Далее смачивали поверхность бумаги ацетоном для фиксации белка и сушили повторно. Лист бумаги с нанесенными препаратами белка и калибровочными растворами помещали на 5 мин в раствор, содержащий 45% метанол, 10% уксусную кислоту и 0,25% Coomassie brilliant blue G250. Окрашенную бумагу промывали в растворе, содержащем 20 % бутанол и 5 % уксусную кислоту до исчезновения окраски фона, затем бумагу промывали водой, сушили и сканировали. Концентрацию белка определяли, сопоставляя плотность окраски пятен препаратов антител и пятен калибровочных растворов. Для обработки результатов использовали программу Image Quant 5.2. Растворы антител с низкой концентрацией белка (менее 0,2 мг/мл) концентрировали при 4<sup>0</sup>С с использованием концентраторов Centricon (предел исключения 10 кДа) при 4500g на центрифуге Centricon-T-42К.

### 2.2.6. Электрофоретический анализ белков

Электрофоретический анализ белковых препаратов проводили по методу Лэммли [247] в присутствии и в отсутствие ДТТ. Концентрирующий гель содержал 4% акриламид, разделяющий гель состоял из 4–18 % акриламида (соотношение акриламид: бисакриламид – 40:1). Перед нанесением на ПААГ, препараты белка (0,5–5 мкг) кипятили 1–2 мин при 100<sup>0</sup>С в 20 мкл 50 мМ буфера Трис–HCl, pH 6,8, содержащем 1% SDS, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий и 100 мМ ДТТ (восстанавливающие условия). Электрофорез проводили в течение 2 ч при комнатной температуре и силе тока 15–20 мА в 25 мМ буфере Трис–HCl, pH 8,3, содержащем 0,192 М глицин, 0,1% SDS. Белки окрашивали Coomassie brilliant blue G250 согласно [248], либо раствором AgNO<sub>3</sub> [249], как описано ниже.

### 2.2.7. Окраска ПААГ нитратом серебра

После электрофоретического разделения белков в ПААГ, гель промывали водой для удаления SDS в течение 30 мин, далее фиксировали 20–30 мин в 20% трихлоруксусной кислоте, промывали 4–5 раз водой и оставляли в ней на ночь. После чего гель инкубировали 30 мин в растворе ДТТ (4–5 мг ДТТ на 300 мл воды), а затем 30 мин в 0,1% растворе AgNO<sub>3</sub> в темноте. Далее гель промывали водой 4 раза по 10 мин и оставляли в растворе проявителя (6 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 140 мкл 40% формалина на 300 мл воды) до момента окрашивания белков. Реакцию окраски останавливали добавлением 2%-ного раствора уксусной кислоты (инкубация 10 мин), промывали 2–3 раза гель водой и оставляли в ней на несколько часов.

### 2.2.8. Определение оксидоредуктазных активностей антител

Реакционная смесь для определения пероксидазной активности антител содержала 25 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6,8, 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, субстрат в необходимой концентрации и IgG (33 нМ–6,7 мкМ). Окисление 3,3'-диаминобензидина (0,93 мМ), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты) (0,36 мМ), адреналина (0,13 мМ), офенилендиамин (0,19 мМ) и 3-амино-9-этилкарбазола (0,19 мМ) проводили в ячейках иммунологических планшетов в темноте при 25<sup>0</sup>С в течение 20 мин. Изменение оптической плотности через определенные промежутки времени регистрировали при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра Labsystems Uniskan II (Thermo Scientific, США). В случае окисления 5-аминосалициловой кислоты (0,38 мМ), оптическую плотность растворов (A<sub>450</sub>) определяли с помощью спектрофотометра Genesis

10S Bio (Thermospectronic, США) с использованием кюветы длиной оптического пути 1 см.

Окисление гидрохинона (0,124 мМ), гомованилиновой кислоты (0,55 мМ) и  $\alpha$ -нафтола (0,07 мМ) анализировали по изменению флуоресценции ( $\Delta F$ ) на спектрофлюориметре Cary Eclipse (Varian, США) с использованием кюветы с длиной оптического пути 0,5 см.

Собственную флуоресценцию субстратов возбуждали при длине волны максимального возбуждения  $\lambda = 300$  нм (гидрохинон),  $\lambda = 315$  нм (гомованилиновая кислота),  $\lambda = 324$  нм ( $\alpha$ -нафтол) и наблюдали изменения при максимальной флуоресценции при  $\lambda = 330, 425$  и  $458$  нм для этих веществ соответственно.

В случае гомованилиновой кислоты (HVA) реакцию проводили в 100 мМ буфере Трис-HCl, pH 8,5.

Определение пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG проводили на том же оборудовании и в тех же условиях, что и для пероксидазной активности, однако реакционные смеси в этом случае не содержали пероксида водорода. В качестве контролей использовали реакционные смеси, не содержащие иммуноглобулинов G.

Начальную скорость реакции окисления субстратов антителами определяли с помощью программы Origin 8.5 по наклонам линейных участков кинетических кривых зависимости увеличения количества продукта реакции или убыли субстрата от времени. Концентрацию каждого препарата IgG в реакционной смеси выбирали такой, при которой наблюдалась линейная зависимость скорости реакции окисления субстрата от концентрации антител.

#### **2.2.9. Исследование влияния ионов $K^+$ на оксидоредуктазные активности антител**

Исследование влияния ионов  $K^+$  на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности иммуноглобулинов класса G проводили в реакции окисления DAB. В реакционную смесь, содержащую IgG (33–66 нМ), DAB (0,93 мМ), 25 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6,8, и 10 мМ  $H_2O_2$  (в случае пероксидазной активности), добавляли KCl (0,1 мМ). Изменение оптической плотности через определенные промежутки времени регистрировали при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра Labsystems Uniskan II (Thermo Scientific, США). В качестве контролей использовали реакционные смеси, не содержащие иммуноглобулинов G.

### **2.2.10. Исследование влияния ионов двухвалентных металлов на оксидоредуктазные активности антител**

Исследование влияния ионов двухвалентных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности иммуноглобулинов проводили в реакции окисления DAB. В реакционную смесь, содержащую IgG (33–66 нМ), DAB (0,93 мМ), 25 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6,8, и 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (в случае пероксидазной активности, при анализе пероксид-независимой оксидоредуктазной активности реакционные смеси не содержали пероксида водорода), добавляли соли: MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> или их комбинации. Концентрация каждой соли в реакционной смеси варьировала в диапазоне 0,1–5,0 мМ. В качестве контроля использовали смеси, содержащие соли этих же металлов или их комбинации в необходимой концентрации. В некоторых случаях для анализа влияния ионов двухвалентных металлов на оксидоредуктазные активности, использовали препараты антител, предварительно диализованные против агентов (EDTA и EGTA), хелатирующих ионы металлов.

### **2.2.11. Анализ оксидоредуктазных активностей антител *in situ***

Препараты IgG (10–15 мкг) инкубировали при 22°C в 50 мМ буфере Трис-HCl, pH 6,8, содержащем 1% SDS, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, 1% SDS и ДТТ, концентрацию которого варьировали в диапазоне от 0 до 100 мМ (восстанавливающие условия). Далее белки разделяли с помощью электрофореза в системе Лэммли. Для определения положения IgG в геле после электрофоретического разделения белков, полоску геля, соответствующую контрольной дорожке, отделяли и окрашивали раствором Coomassie Blue R 250 или 0,1% раствором AgNO<sub>3</sub>. Для определения пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG *in situ*, остальную часть геля отмывали от SDS в течение 1 ч 20 мМ калий-фосфатным буфером, pH 6,8, и водой (5 раз по 5 мин) при комнатной температуре, а затем инкубировали в стандартной реакционной смеси, содержащей DAB 0,93 мМ и 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (в случае пероксидазной активности).

О наличии активности судили по появлению в геле пятен окрашенного продукта окисления субстрата.

### **2.2.12. Гель-фильтрация антител в условиях „кислого шока”**

Препарат IgG (200 мкл, 3 мг/мл) инкубировали в течение 30 мин при 22°C в 100 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 3,0, содержащего 0,1 М KCl. Затем проводили гель-фильтрацию на колонке с Superdex 200 HR 10/30 предварительно уравновешенной 0,1 М

калий-фосфатным буфером, рН 2,6, содержащим 0,1 М КСl. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0,3 мл/мин. Полученные фракции сразу нейтрализовали 1 М калий-фосфатным буфером, рН 8,0, диализовали против 25 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0 и оставляли на 14 суток при 4°C. Оксидоредуктазные активности антител во всех фракциях оценивали по реакции окисления DAB, согласно методике, описанной выше.

#### **2.2.13. Аффинная хроматография антител на колонке с анти-L-сефарозой**

Препарат IgG (70 мкл, 7,3 мг/мл) разбавляли до 1,5 мл 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, чтобы количество белка в растворе не превышало 1 мг. Препарат IgG (0,5 мг/мл) в 20 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,5, объемом 1,5 мл, наносили на сефарозу, содержащую антитела против легких цепей IgG человека (анти-L-IgG-Sepharose), предварительно уравновешенную 20 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5. Далее колонку промывали этим же буфером до исчезновения оптической плотности элюата. Антитела элюировали 100 мМ буфером Gly-НСl, рН 2,6. Полученные фракции IgG нейтрализовали 1 М буфером Трис-НСl, рН 8,8, диализовали против 25 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0 и оставляли на 14 суток при 4°C для регенерации антител после “кислого шока”. Оксидоредуктазные активности антител во всех фракциях оценивали по реакции окисления DAB, согласно методике, описанной выше.

#### **2.2.14. Получение и очистка Fab и F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов класса G**

Fab-фрагменты иммуноглобулинов получали гидролизом эквимольной смеси 10 препаратов IgG папаином согласно [250]. Антитела (1 мг/мл) инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 200 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и папаин (0,1 мг/мл), в течение 3 ч при 37°C, после чего диализовали против 50 мМ буфера Трис-НСl, рН 7,5, в течение 16 ч при 4°C. Fab-фрагмент IgG отделяли от интактных молекул IgG и их Fc-фрагмента хроматографией на протеин А-сефарозе. Элюируемую при нанесении на колонку белковую фракцию, содержащую Fab-фрагмент антител и папаин, диализовали 16 ч при 4°C против 50 мМ буфера Трис-НСl, рН 7,5, концентрировали и наносили на колонку Superdex-200 HR (10/30), предварительно уравновешенную этим же буфером. Далее белок элюировали 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 0,1 М NaCl. Полученные фракции белков подвергали электрофоретическому разделению в системе Лэммли, после чего фракции, содержащие гомогенные Fab-фрагменты объединяли и диализовали против 20 мМ буфера Трис-НСl, рН 7,5.

F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты иммуноглобулинов получали гидролизом эквимольной смеси 10 препаратов IgG пепсином согласно [251]. IgG (1 мг/мл) инкубировали в реакционной смеси, содержащей 45 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4,5, и пепсин (0,1 мг/мл), в течение 12 ч при 37°C, после чего доводили pH реакционной смеси до нейтральных значений 1 М буфером Трис-НСl, pH 8,0, и диализовали против 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, в течение 16 ч при 4°C. F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты иммуноглобулинов отделяли от интактных молекул IgG хроматографией на протеин А-сефарозе. Несвязавшуюся с сорбентом белковую фракцию, содержащую F(ab)<sub>2</sub>-фрагмент IgG, продукты протеолитического расщепления Fc-фрагмента антител и пепсин, наносили на колонку Superdex-200 HR (10/30), предварительно уравновешенную 50 мМ буфером Трис-НСl, pH 7,5. Далее белок элюировали 50 мМ буфером Трис-НСl, pH 7,5, содержащем 0,1 М NaCl. Полученные фракции белков подвергали электрофоретическому разделению в системе Лэммли, после чего фракции, содержащие гомогенные F(ab)<sub>2</sub> объединяли и диализовали против 20 мМ буфера трис-НСl, pH 7,5.

Fab и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты IgG получены совместно с Тимофеевой А. М. (ЛФР ИХБФМ СО РАН).

Активность препаратов Fab и F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов измеряли, как описано выше.

### **2.2.15. Определение и статистическая обработка кинетических параметров реакций окисления субстратов антителами**

Все измерения кинетических параметров проводили с использованием таких концентраций субстратов, при которых скорость их окисления линейно зависела от времени и концентрации субстрата. Величины  $K_m$  и  $V_{max}$  оценивали методом двойных обратных координат Лайнуивера–Берка с использованием программы Origin 8.5. Ошибка определения величин не превышала 10–20%.

Кажущиеся значения  $k_{cat}$  ( $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [IgG] \text{ (М)}$ ) оценены с использованием зависимостей химической реакции от времени при фиксированных концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ) и используемых субстратов. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения по меньшей мере трех независимых экспериментов для каждого препарата IgG. Ошибки значений  $k_{cat}$  находились в пределах 7–15%.

Коэффициенты корреляции ( $R$ ) рассчитаны с помощью программы STATISTICA 10. Для данных, подчиняющихся нормальному закону распределения, использовали критерий Пирсона, в противном случае использовали критерий Спирмана.

Достоверность различий между группами препаратов IgG анализировали с помощью критерия Манна-Уитни, значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

### **2.2.16. Анализ содержания металлов в сыворотке крови и препаратах антител**

Препараты сыворотки крови, приготовленные согласно (п.2.2.1) лиофилизировали до порошка (7–10 мг на образец) и анализировали с помощью атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров (САЭМ) в двухструйном дуговом плазмотроне согласно [242].

Электрофоретически гомогенные препараты IgG (1 мг/мл, 5–7 мл) наносили на колонку с протеин G-сефарозой (HiTrap Protein G HP column), объемом 1 мл. После сорбции молекул IgG на сорбенте, колонку промывали 50 мМ буфером Трис-HCl, pH 7,5, содержащим 100 мМ EDTA (25 мл), для удаления ионов металлов, связанных с антителами. Затем элюат лиофилизировали до порошка. В качестве контроля использовали такое же количество лиофилизованного порошка, приготовленного из 25 мл этого же буфера, пропущенного через колонку с протеин G-сефарозой, свободную от антител. Анализ содержания металлов в лиофилизованных контрольных образцах (5–7 мг) и образцах элюата (5–7 мг) проводили с помощью атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров (САЭМ) в двухструйном дуговом плазмотроне согласно [242]. Процентное содержание металлов в лиофилизованных образцах элюата рассчитывали по разнице величин между опытным и контрольным образцами.

### **2.2.17. Диализ препаратов антител против агентов, хелатирующих ионы металлов**

Препараты IgG диализовали в диализных мешках против 20 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 М EDTA, 0,1 М EGTA и 3 М NaCl в течение 16 ч при 4°C, затем диализ продолжали в этих же условиях в течение 5 ч против 20 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 М EDTA, 0,1 М EGTA. Далее для удаления EDTA, и EGTA проводили диализ препаратов IgG в течение 3–4 ч против пяти смен 5 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,0, лишенного примесей ионов металлов. Все используемые для диализа буферы и растворы солей, кроме растворов EDTA и EGTA, пропускали через колонку с Chelex-100. Мешки для диализа иммуноглобулинов непосредственно перед диализом кипятили в воде, а затем в растворе, содержащем 0,01 М EDTA и 0,01 М EGTA. В момент проведения диализа против 5 мМ калий-фосфатного буфера в стакане с буфером присутствовал диализный мешок, содержащий Chelex-100.

Диализованные препараты IgG использовали для определения их оксидоредуктазных активностей. В качестве контроля использовали эти же препараты, не подвергавшиеся диализу.

### 2.2.18. Хроматография IgG на хелатирующем сорбенте Chelex-100

Электрофоретически гомогенные препараты IgG (5 мг) в 0.5 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,5, наносили на колонку с Chelex-100 (7×20 мм), свободную от металлов и уравновешенную водой. Затем колонку промывали последовательно 10 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 0, 0,3, 0,5, 0,75 и 1,0 М NaCl и, в заключение, 10 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 100 мМ EDTA. Аликвоты полученных фракций использовали для определения оксидоредуктазных активностей IgG в реакции окисления DAB в присутствии и в отсутствие экзогенных ионов металлов.

Хроматографию IgG на колонках с Chelex-100, заряженном ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , проводили аналогичным образом. Пероксидазную и оксидоредуктазную активности фракций измеряли в отсутствие экзогенных ионов металлов, а также после предынкубации иммуноглобулинов с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ . Предынкубированные IgG добавляли в реакционную смесь, содержащую DAB, в количестве 1/10 по объему от конечного объема реакционной смеси.

### 2.2.19. Анализ содержания селена в препаратах антител

Эквимольную смесь пяти электрофоретически гомогенных препаратов иммуноглобулинов G ( $\text{IgG}_{\text{mix}}$ ) диализовали против пяти смен воды, предварительно пропущенной через Chelex-100, в присутствии диализного мешка, содержащего Chelex-100, объемом 5 мл. Затем три образца препарата  $\text{IgG}_{\text{mix}}$  (5 мг каждый) лиофилизовали и анализировали с помощью метода рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения. Анализ проведен Заксас Н. П. (НИИХ СО РАН). Концентрацию селена рассчитывали, принимая за внешний стандарт NIES №4 “Freeze-dried Human Serum” (Japan).



### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работах [17, 239, 240, 241] показано, что IgG крови здоровых крыс линии Wistar обладают высокой пероксидазной (зависимой от пероксида водорода) и независимой от пероксида водорода оксидоредуктазной активностью. Авторами доказано выполнение всех основных критериев принадлежности данных активностей непосредственно антителам. В некоторых публикациях приведены данные о том, что препараты IgG сыворотки крови человека также обладают пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностью [18, 23, 252], но так как доказательств отнесения этих активностей непосредственно к антителам не представлено, вопрос об их принадлежности к IgG человека оставался открытым.

Согласно существующим данным, подавляющее большинство исследуемых на данный момент каталитических активностей антител, наблюдается при различных патологиях. Например, известно, что абзимы, гидролизующие ДНК, РНК, белки и пептиды, образуются у людей, страдающих аутоиммунными патологиями (системная красная волчанка, [150, 154, 155], аутоиммунный тиреоидит [156], рассеянный склероз [157, 253]); инфекционными (вирусный гепатит [160], клещевой энцефалит [161]); лимфопролиферативными (В-клеточный лейкоз, мантийноклеточная лимфома, множественная миелома [254]) заболеваниями и при психических расстройствах [22, 172, 173]. В то же время, в крови здоровых людей антитела со многими каталитическими активностями либо отсутствуют (ДНКазная, РНКазная), либо она является низкой (протеолитическая). Так, например, IgG крови здоровых доноров способны с низкой эффективностью гидролизовать тиреоглобулин [186] и вазоактивный интестинальный пептид [13]. В связи с этим представляется достаточно неожиданным обнаружение у человека абзимов, способных катализировать окислительно-восстановительные реакции при отсутствии патологий. Кроме того, возникает вопрос, будет ли отличаться уровень оксидоредуктазных активностей IgG при каких-либо заболеваниях от их активности у здоровых людей. Как правило, наиболее высокий уровень каталитической активности абзимов обнаруживается при таких тяжелых аутоиммунных патологиях, как системная красная волчанка (СКВ) и рассеянный склероз (РС), поэтому одной из задач данной работы стало изучение влияния аутоиммунных процессов на возможное изменение пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG.

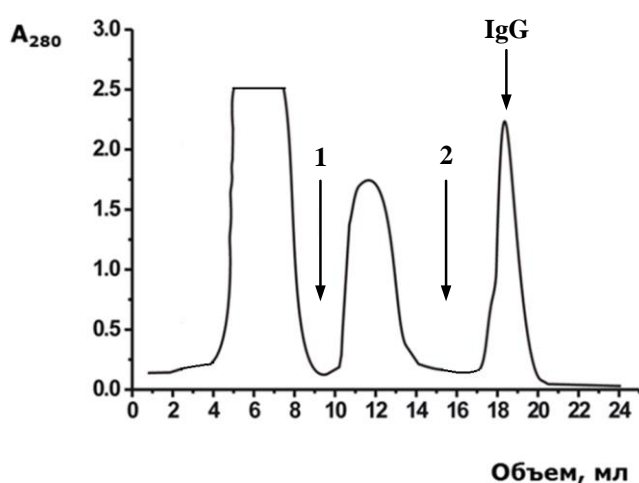
В связи с вышеперечисленным, проведено доказательство принадлежности пероксид-зависимой и пероксид-независимой оксидоредуктазных активностей иммуноглобулинам класса G сыворотки крови человека и исследование данных

активностей IgG у здоровых доноров, у больных системной красной волчанкой (СКВ) и у больных рассеянным склерозом (РС).

### 3.1. Выделение иммуноглобулинов класса G из крови здоровых доноров, больных системной красной волчанкой и рассеянным склерозом

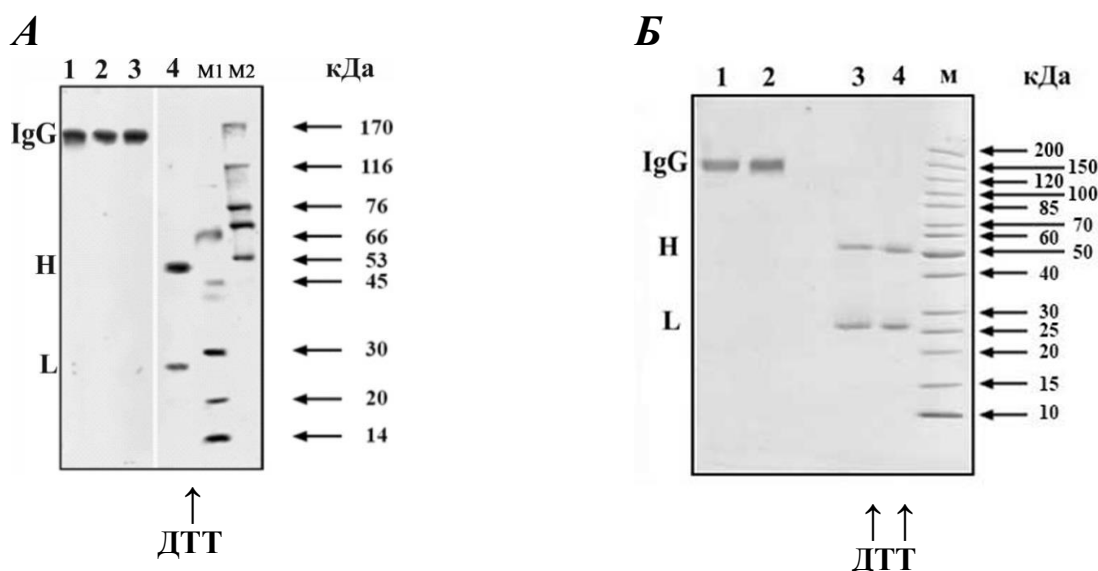
Препараты IgG выделяли из сыворотки крови здоровых доноров, больных СКВ и РС аффинной хроматографией на протеин G-сефарозе в условиях удаления неспецифически связавшихся с антителами белков и селективной элюции антител кислым буфером, согласно разработанному ранее методу [255].

На первом этапе выделения иммуноглобулинов класса G с помощью этого метода происходит специфическое связывание IgG всех подклассов с белком G из *Staphylococcus aureus*, иммобилизованном на сорбенте. Далее липидная фракция и неспецифически сорбировавшиеся белки сыворотки крови элюируются буфером, содержащим 1% неионный детергент Тритон X-100, после чего IgG элюируются глициновым буфером, pH 2,6. Так как нековалентные белковые комплексы диссоциируют в кислой среде, данный метод позволяет получать электрофоретически гомогенные препараты иммуноглобулинов класса G. Для дополнительной очистки IgG от возможных примесей, препараты антител после выделения инкубировали в буфере при pH 2,6, затем проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex-200 HR. В качестве примера на **рис. 13** приведен профиль оптической плотности при селективной элюции IgG с протеин G-сефарозы после нанесения одного из препаратов сыворотки крови здорового донора.



**Рис. 13.** Профиль оптического поглощения при аффинной хроматографии белков сыворотки крови человека на протеин G-сефарозе.  
1 – элюция буфером, содержащим 1% Тритон X-100,  
2 – элюция 50 мМ Gly-HCl буфером, pH 2,6.

Аналогичные профили хроматографии получены при выделении IgG из сыворотки крови больных СКВ и РС. Гомогенность препаратов антител во всех случаях подтверждали SDS-ПААГ с последующей окраской серебром в восстанавливающих (в присутствии ДТТ) и невосстанавливающих (в отсутствие ДТТ) условиях. На **рис. 14** приведен SDS-ПААГ трех препаратов IgG здоровых доноров (**А**), а также эквимольных смесей десяти препаратов IgG из сывороток больных СКВ (СКВ-IgG<sub>mix</sub>) и одиннадцати препаратов антител из сывороток больных РС (РС-IgG<sub>mix</sub>) (**Б**). В невосстанавливающих условиях наблюдалась одна белковая полоса с мол. массой 150 кДа, соответствующая интактному IgG, и две белковые полосы с молекулярными массами примерно 50 и 25 кДа, соответствующие Н- и L-цепям антител после восстановления. Установлено, что все полученные нами препараты IgG из сыворотки крови здоровых доноров и больных АИЗ электрофоретически гомогенны.



**Рис. 14.** Электрофоретический анализ гомогенности препаратов IgG крови здоровых доноров (**А**, дорожки 1, 2, 3, 4), эквимольных смесей десяти препаратов IgG больных СКВ (**Б**, дор. 1, 3) и одиннадцати препаратов больных РС (**Б**, дорожки 2, 4) с помощью SDS-гель-электрофореза в градиентном 4–18% ПААГ до и после восстановления антител с помощью ДТТ. Белки окрашены нитратом серебра.

**М** – белковые маркеры

**М1** – белковые маркеры с молекулярной массой от 66 до 14 кДа.

**М2** – белковые маркеры с молекулярной массой от 170 до 53 кДа.

### 3.2. Peroксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности иммуноглобулинов класса G здоровых доноров

Для проверки предположения о том, что иммуноглобулины класса G человека способны, подобно IgG из крови крыс Wistar, обладать пероксидазной и перекись-независимой оксидоредуктазной активностями, проанализировали возможность 10 препаратов антител, выделенных из сыворотки крови здоровых доноров (IgG-3Д),

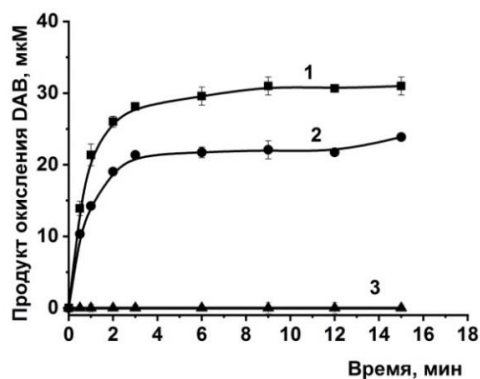
окислять 3,3'-диаминобензидин (DAB) в присутствии и в отсутствие пероксида водорода. В качестве субстрата использовали DAB при его фиксированной концентрации (0,93 мМ), по аналогии с работами [17, 239], где показано, что IgG из сыворотки крови крыс Wistar окисляют его лучше, чем другие ароматические амины. Для оценки активности каждого из препаратов IgG подбирали такую его концентрацию, при которой наблюдалась линейная зависимость скорости реакции окисления DAB от концентрации антител и, в то же время, при которой все препараты IgG проявляли достоверно тестируемую (как минимум в 2-3 раза превышающую уровень спонтанного окисления) активность. Уровень неспецифического окисления субстрата в отсутствие антител не превышал 10%. Все десять исследуемых препаратов иммуноглобулинов класса G проявляли пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности. Так как доля антител со всеми возможными каталитическими активностями среди общего пула поликлональных IgG составляет не более 5-7% и индивидуальна для каждого из исследуемых препаратов антител [26], для оценки оксидоредуктазных активностей использовали величину кажущейся  $k_{cat}$ , рассчитанную формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (М)}$ , где [IgG] – общая концентрация антител в реакционной смеси (табл. 1).

**Таблица 1.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих пероксидазную и оксидоредуктазную активности IgG крови здоровых доноров в реакции окисления DAB

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , $\text{min}^{-1**}$	
	Пероксидазная активность	Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность
<b>IgG-1</b>	54,2* ± 4,8	49,0 ± 3,9
<b>IgG-2</b>	69,4 ± 7,2	41,8 ± 5,2
<b>IgG-3</b>	70,5 ± 5,5	55,4 ± 7,3
<b>IgG-4</b>	51,6 ± 6,3	54,7 ± 4,2
<b>IgG 5</b>	92,8 ± 10,6	58,0 ± 5,3
<b>IgG-6</b>	60,5 ± 7,3	56,6 ± 3,9
<b>IgG-7</b>	65,3 ± 8,1	49,4 ± 4,7
<b>IgG-8</b>	69,3 ± 8,0	48,1 ± 3,8
<b>IgG-9</b>	63,3 ± 7,9	56,1 ± 5,0
<b>Среднее значение</b>	<b>66,3 ± 12,0</b>	<b>52,1 ± 5,3</b>

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

На **рис. 15** продемонстрированы зависимости накопления количества окрашенного продукта реакции от времени в результате окисления DAB препаратом IgG3 в присутствии и в отсутствие пероксида водорода.



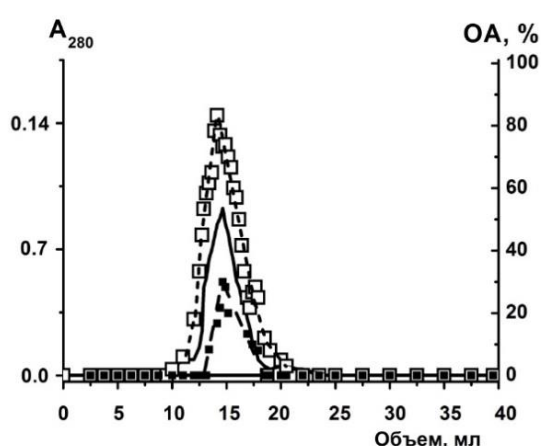
**Рис. 15.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта пероксидазного (1) и пероксид-независимого оксидоредуктазного (2) окисления DAB (0,93 мМ) препаратом IgG3 (667 нМ). На кривой 3 представлен контроль – окисление DAB в отсутствие антител.

### 3.3. Доказательство принадлежности каталитической активности антителам

Абзимы, выделяемые из сыворотки крови, поликлональны, т.е. представлены широким набором антител, близких по структуре, но, в то же время, содержащих переменные участки, отвечающие за связывание различных антигенов. Для доказательства того, что обе, как пероксидазная, так и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG являются собственной функцией антител, а не следствием загрязнения препаратов иммуноглобулинов совыделяющимися микропримесями ферментов, использовали несколько строгих, ранее разработанных критериев [11, 13, 26, 27, 164, 183]:

- электрофоретическая гомогенность антител при окраске серебром (представлена выше);
- наличие каталитической активности у иммуноглобулинов класса G после гель-фильтрации в условиях «кислого шока»;
- полная адсорбция ферментативной активности анти-Ig сефарозой и элюция IgG с сорбента буфером с низким значением pH;
- иммунопреципитация абзимов анти-Ig-антителами с потерей раствором каталитической активности;
- каталитическая активность Fab-фрагментов иммуноглобулинов класса G;
- выявление активности у изолированных цепей антител;
- выявление ферментативной активности *in situ* в геле, содержащем субстрат, после SDS-электрофореза в системе Лэммли в участках геля, занимаемых полосами Ig, их Fab-фрагментами или отдельными цепями и др.

Одним из критериев, позволяющих отнести каталитическую активность непосредственно к антителам, является *сохранение этой активности после гель-фильтрации иммуноглобулинов в условиях «кислого шока» (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. Для проверки этого критерия, электрофоретически гомогенные препараты IgG здоровых доноров, а также больных СКВ и РС инкубировали в калий-фосфатном буфере, pH 3,0, содержащем KCl, далее в этом же буфере проводили гель-фильтрацию. Так как на этой стадии происходит значительное снижение активности абзимов вследствие частичной денатурации белковых молекул [26], полученные фракции сразу нейтрализовали и выдерживали при нейтральном значении pH в течение двух недель для восстановления активности IgG. Далее пероксидазную активность каждой из фракций оценивали по реакции окисления 3,3'-диаминобензидина согласно стандартной методике. В результате проведенных экспериментов показано, что гель-фильтрация IgG в кислых условиях не приводит к исчезновению их активности. Кроме того, в случае всех исследованных препаратов антител, профиль оптической плотности ( $\lambda = 280$ ), полученный в результате гель-фильтрации, совпадал с профилем пероксидазной активности, т.е. каталитической активностью обладали только антитела. Аналогичная картина наблюдалась при анализе оксидоредуктазной активности иммуноглобулинов класса G. В качестве примера на **рис. 16** приведен профиль FPLC гель-фильтрации одного из препаратов IgG крови здорового донора на колонке Superdex-200 при pH 3,0.



**Рис. 16.** Профиль FPLC гель-фильтрации препарата IgG3 из сыворотки крови здорового донора на колонке Superdex-200 при pH 3,0:

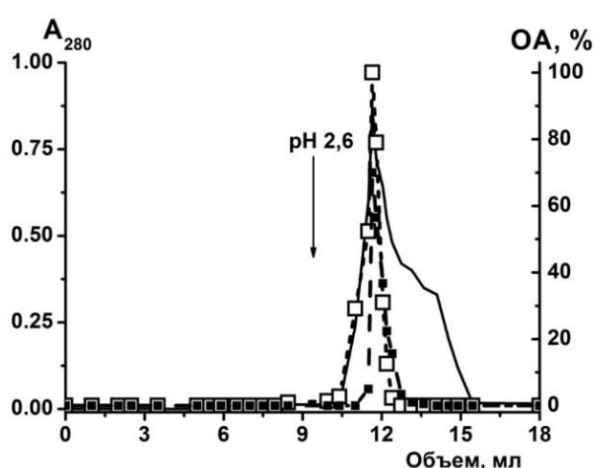
(—) – оптическое поглощение элюата при  $\lambda = 280$  нм,

(□) – профиль относительной пероксидазной активности IgG,

(■) – профиль относительной пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG.

ОА – относительная активность, за 100% принят максимальный уровень активности IgG до гель-фильтрации.

Также одним из критериев, подтверждающих наличие каталитической активности у антител, является *полная адсорбция ферментативной активности иммуноглобулинов в результате специфического взаимодействия абзимов с аффинными сорбентами*. В качестве аффинного сорбента для доказательства принадлежности оксидоредуктазных активностей непосредственно IgG, выбран сорбент с иммобилизованными мышинными моноклональными антителами к легким цепям IgG человека, позволяющий количественно связать все молекулы иммуноглобулинов класса G человека [11]. Таким образом, при проведении аффинной хроматографии препаратов IgG здоровых доноров и больных АИЗ на данном сорбенте, наблюдалось полное связывание антител с сорбентом и, как следствие, исчезновение ферментативной активности в растворе. Связавшиеся антитела элюировали кислым буфером (рН 2,6). Полученные фракции IgG выдерживали при нейтральных значениях рН для восстановления активности абзимов, после чего оценивали пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности каждой из полученных фракций в реакции окисления DAB. Согласно полученным данным, как в случае исследования препаратов антител крови здоровых доноров, так и больных СКВ и РС, профиль оптической плотности ( $\lambda = 280$ ), полученный в результате аффинной хроматографии, совпадал с профилями тестируемых активностей. Это, а также исчезновение ферментативной активности в растворе, свидетельствует о принадлежности каталитической активности непосредственно IgG. В качестве примера на **рис. 17** приведен профиль FPLC гель-фильтрации одного из препаратов IgG крови здорового донора на сорбенте с иммобилизованными мышинными моноклональными IgG против легких цепей IgG человека.



**Рис. 17.** Профиль аффинной хроматографии препарата IgG4 из сыворотки крови здорового донора на сорбенте с иммобилизованными мышинными моноклональными IgG против легких цепей IgG человека: (—) — оптическое поглощение элюата при  $\lambda = 280$  нм,

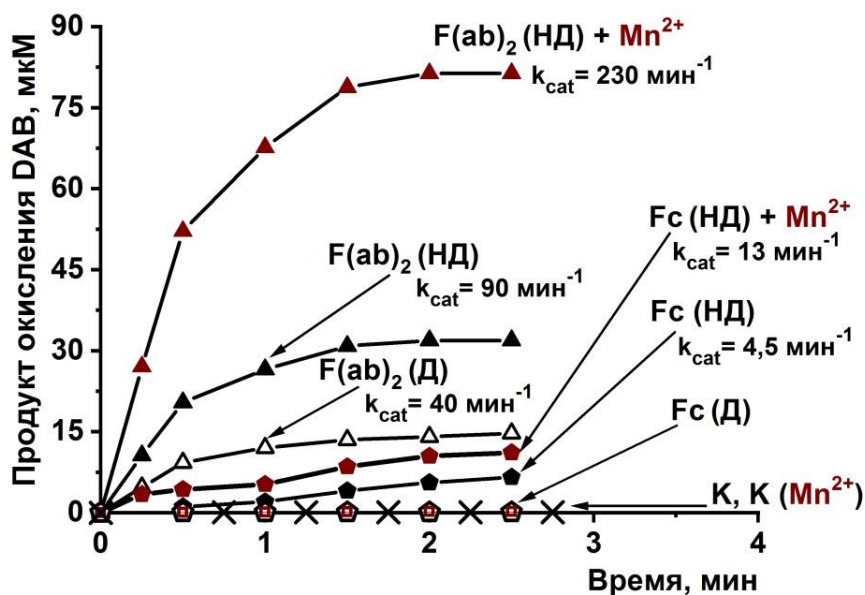
(□) — профиль относительной пероксидазной активности IgG, (■) — профиль относительной пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG. ОА — относительная активность, за 100% принят максимальный уровень активности IgG.

Не все молекулы иммуноглобулинов класса G имеют одинаковое сродство к мышинным моноклональным IgG против легких цепей IgG человека, поэтому они могли частично разделяться в процессе аффинной хроматографии. В связи с этим нельзя исключить, что некоторые фракции IgG, не обладающие каталитической активностью, имели более высокое сродство к данному сорбенту, и это привело к появлению большого плеча на профиле хроматографии (**рис. 17**).

Еще одним из критериев доказательства принадлежности каталитической активности антителам, является *каталитическая активность Fab-фрагментов IgG*. В ряде работ показано, что Fab и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты антител обладают каталитической активностью и способны гидролизовать ДНК, РНК, белки и полисахариды [26, 164, 183, 186, 256]. Первым примером антител, способных катализировать окислительные реакции явились абзимы, осуществляющие превращение <sup>1</sup>O<sub>2</sub>\* в пероксид водорода [16, 231]. Zhu X с соавторами показали, что Fab и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты иммуноглобулинов класса G козы, кролика и мыши эффективно катализируют эту реакцию [257]. Для того чтобы проанализировать пероксидазную активность Fab, F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулинов IgG здоровых доноров, определили кажущиеся  $k_{cat}$  реакции окисления DAB при его фиксированной концентрации (0,93 мМ) Fab-, F(ab)<sub>2</sub>- и их Fc-фрагментами, полученными из эквимольной смеси (IgG<sub>mix</sub>) 10 препаратов IgG. Так как абзимы с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями могут активироваться различными ионами металлов, включая Mn<sup>2+</sup> [239], анализ пероксидазной активности фрагментов IgG проводили в присутствии и в отсутствие ионов Mn<sup>2+</sup> до и после диализа антител против EDTA. Как Fab-, так и F(ab)<sub>2</sub>-фрагменты IgG<sub>mix</sub> обладали высокой пероксидазной активностью, значения их кажущихся  $k_{cat}$  составили 62 мин<sup>-1</sup> и 90 мин<sup>-1</sup> соответственно. После диализа против EDTA, активность Fab и F(ab)<sub>2</sub> уменьшалась в 2,3 и 2,4 раза (кажущиеся  $k_{cat} = 26$  мин<sup>-1</sup> и 40 мин<sup>-1</sup>) (**рис. 18 и рис. 19**). Добавление к недиализованным фрагментам 3 мМ MnCl<sub>2</sub> приводило к увеличению их активности приблизительно в 2,5 и 2,6 раз (кажущиеся  $k_{cat} = 155$  мин<sup>-1</sup> и 230 мин<sup>-1</sup>, соответственно).

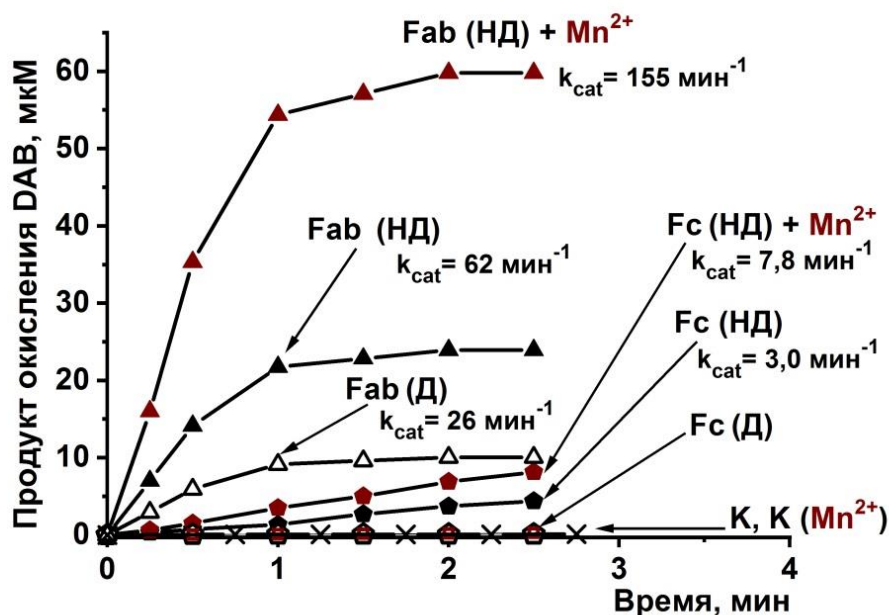
Неожиданно оказалось, что в присутствии Fc-фрагментов эквимольной смеси также происходит пероксид-зависимое окисление DAB. Однако активность недиализованных Fc молекул IgG после отщепления F(ab)<sub>2</sub> ( $k_{cat} = 4,5$  мин<sup>-1</sup>) и Fab ( $k_{cat} = 3,0$  мин<sup>-1</sup>) была приблизительно в 20 и 21 раз ниже активности их F(ab)<sub>2</sub>- и Fab-фрагментов. При добавлении 3 мМ MnCl<sub>2</sub> активность Fc увеличивалась в 2,9 и 2,6 раз соответственно. После диализа Fc-фрагменты становились практически полностью неактивными (**рис. 18 и рис. 19**).





**Рис. 18.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта пероксидазного окисления DAB (0,93 мМ) диализованным (Д) и недиализованным (НД) препаратом  $F(ab)_2$ -фрагмента  $IgG_{mix}$  (454 нМ) и препаратом его Fc-фрагмента (454 нМ), в присутствии и в отсутствие ионов  $Mn^{2+}$ . Средняя ошибка определения количества образовавшегося продукта реакции в каждый момент времени не превышала 7–15%.

К – окисление DAB в отсутствие антител.



**Рис. 19.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта пероксидазного окисления DAB (0,93 мМ) диализованным (Д) и недиализованным (НД) препаратом Fab-фрагмента  $IgG_{mix}$  (450 нМ) и препаратом его Fc-фрагмента (450 нМ), в присутствии и в отсутствие ионов  $Mn^{2+}$ . Средняя ошибка определения количества образовавшегося продукта реакции в каждый момент времени не превышала 7–15%.

К – окисление DAB в отсутствие антител.

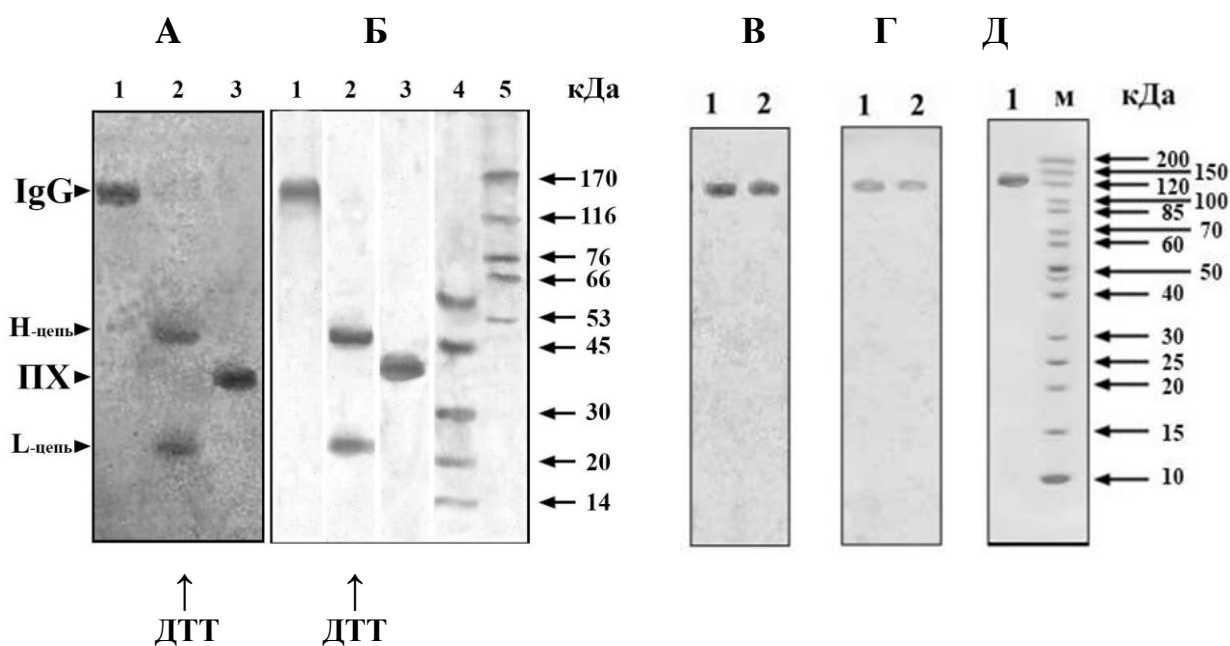
Так как согласно литературным данным Fc-фрагменты абзимов в отсутствие ионов металлов являются каталитически неактивными в реакциях гидролиза различных субстратов [26, 164, 183, 184, 186], возникает вопрос, какова природа их пероксидазной активности. Стоит отметить, что, прежде всего, малоэффективное, но заметное спонтанное окисление некоторых соединений, включая DAB, происходит в отсутствие и, особенно, в присутствии пероксида водорода. Кроме того, различные ионы металлов также могут способствовать его значительному увеличению [17, 239]. Кроме того, можно предположить, что некоторые белки или их фрагменты, например, Fc-фрагменты IgG, способны вызывать в присутствии ионов металлов окисление DAB и, вероятно, других субстратов, вследствие образования комплексов ионов металлов с некоторыми аминокислотными остатками на поверхности белка, что приводит к формированию «специфических участков», в какой-то степени имитирующих активные центры ферментов, катализирующих окисление различных субстратов.

В работе [16], наряду с исследованием супероксиддисмутазной активности антител, приводятся данные о регистрации этой активности, значительно более низкой, и у других белков, таких как, например,  $\beta$  - лактоглобулин и  $\beta$  - галактозидаза. В качестве объяснения наблюдаемого явления авторами сделано предположение о возможном участии в процессе катализа сульфгидрильных групп, а также ароматических аминокислот, входящих в состав данных белков в качестве доноров электронов. Не исключено, что пероксидазная активность, наблюдаемая у Fc-фрагментов IgG, также может быть обусловлена схожими механизмами. Принимая это во внимание, нами определены значения кажущихся  $k_{cat}$ , характеризующих окисление DAB в отсутствие и в присутствии  $MnCl_2$ , тремя различными контрольными гомогенными белками: тиреоглобулином (TG), лактатдегидрогеназой (LDH) и лизоцимом. Данные белки выбраны в силу высокого содержания сульфгидрильных групп и ароматических аминокислот [258, 259, 260]. Показано, что окисление DAB в отсутствие ионов металлов с помощью TG, LDH и лизоцима, диализованных против EDTA, сопоставимо со спонтанным окислением субстрата в отсутствие антител. Активность недиализованного лизоцима была близка к нулю. Остальные два из трех проанализированных недиализованных белков обладали очень низкой, однако, регистрируемой пероксидазной активностью: TG ( $k_{cat} = 5 \pm 0,5 \text{ мин}^{-1}$ ), LDH ( $k_{cat} = 0,9 \pm 0,1 \text{ мин}^{-1}$ ). Добавление экзогенных ионов  $Mn^{2+}$  приводило к увеличению активности всех белков: TG ( $k_{cat} = 33 \pm 3,0 \text{ мин}^{-1}$ ), LDH ( $k_{cat} = 11,6 \pm 1,0 \text{ мин}^{-1}$ ), лизоцим ( $k_{cat} = 0,16 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$ ). Таким образом, относительная пероксидазная активность недиализованных Fc-фрагментов, соответствующих  $F(ab)_2$  ( $k_{cat} = 4,5 \text{ мин}^{-1}$ ) и Fab ( $k_{cat} = 3,0 \text{ мин}^{-1}$ ), так же, как и их активность в присутствии  $MnCl_2$  ( $k_{cat} = 13 \text{ мин}^{-1}$  и  $7,8 \text{ мин}^{-1}$ ,

соответственно), сопоставима с активностью TG и LDH, регистрируемой в тех же условиях. Принимая во внимание полученные данные, а также тот факт, что диализованные препараты Fc-фрагментов абзимов практически неактивны, можно предположить, что регистрируемое окисление DAB Fc-фрагментом в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  является следствием активации спонтанного металл-зависимого окисления субстрата, а пероксидазная активность иммуноглобулинов класса G здоровых доноров определяется в основном переменными участками Fab- и F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов абзимов.

Также одним из подходов к отнесению активности непосредственно иммуноглобулинам является *метод определения активности IgG in situ и выявление активности у их изолированных цепей*. После SDS-электрофоретического разделения IgG здоровых доноров, больных СКВ и РС, их пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности определяли с помощью инкубации геля в стандартной реакционной смеси, содержащей DAB и пероксид водорода (в случае пероксидазной активности). Желто-коричневая полоса продукта окисления DAB выявлялась только в тех участках геля, которые соответствовали расположению поликлональных иммуноглобулинов класса G (**рис. 20**). В качестве контроля использовали пероксидазу хрена. Для анализа каталитической активности у изолированных легких и тяжелых цепей IgG, перед нанесением на ПААГ препараты антител обрабатывали с помощью 100 мМ ДТТ для восстановления дисульфидных связей. Известно, что каталитической активностью в реакциях гидролиза ДНК, РНК, пептидов, белков и олигосахаридов обладают только легкие цепи IgG [26, 11, 12, 164, 182, 183, 184, 185, 186, 188]. Тяжелая цепь антител необходима для повышения сродства лиганда и специфичности действия абзимов. В то же время в работе [17] было показано, что как легкие, так и тяжелые цепи IgG антител из сыворотки крови здоровых крыс Wistar, катализируют окислительно-восстановительные реакции. Согласно полученным данным, как легкие, так и тяжелые цепи поликлональных IgG человека также обладали активностью, и окисляли DAB, подобно легким и тяжелым цепям поликлональных IgG крыс [17] (**рис. 20**).

Так как в присутствии SDS происходит разрушение всех белковых комплексов, наблюдение активностей в участках геля, соответствующих только интактным молекулам иммуноглобулинов G и их разделенным цепям, а также отсутствие других окрашенных полос, свидетельствующих о присутствии каких-либо белков со схожими активностями, является непосредственным однозначным и достоверным доказательством того, что IgG обладают пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями.



**Рис. 20.** *A, Б* – Анализ *in situ* пероксидазной активности IgG здоровых доноров с помощью SDS-гель-электрофореза в градиентном 4–18% ПААГ до и после восстановления антител с помощью ДТТ.

*В, Г, Д* – Тестирование *in situ* пероксидажной (*В*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (*Г*) активности IgG больных СКВ (дор. *1 В, Г*) и РС (дор. *2 В, Г*) с помощью SDS-гель-электрофореза в градиентном 4–18% ПААГ.

*А, В* – гель, инкубированный в реакционной смеси с DAB и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Г* – гель, инкубированный в реакционной смеси с DAB.

*Б, Д* – гель, окрашенный серебром.

ПХ – пероксидаза хрена.

М- белковые маркеры.

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

Как уже упоминалось в обзоре литературы, ферментативная активность многих оксидоредуктаз определяется одним или несколькими ионами переходных металлов или их сочетанием с металлом с постоянной валентностью (см. раздел 1.1). 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. Так как с одной стороны в ряде работ уже показано, что оксидоредуктазные активности антител крыс являются металлозависимыми [17, 239], а с другой стороны пулы IgG, выделенных из сывороток разных животных одной линии, содержащихся в одинаковых условиях, являются более близкими по составу, нежели пулы антител сывороток различных людей. В связи с тем, что в работе используются поликлональные препараты IgG, такой подход

позволил сначала получить статистически достоверные результаты по металлозависимости активностей IgG крыс, а потом уже проверить их на антителах человека.

### **3.4.1. Влияние ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови крыс линии Wistar**

Для того чтобы охарактеризовать влияние одновалентных ионов металлов, а также ионов металлов с переменной валентностью на пероксидную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG из крови крыс линии Wistar, в данной работе было необходимо выявить зависимость между содержанием металлов в крови крыс, а также в препаратах очищенных IgG, выделенных из нее, и оксидоредуктазными активностями, проявляемыми этими антителами.

#### **3.4.1.1. Анализ содержания металлов в крови крыс линии Wistar и в препаратах иммуноглобулинов G**

Содержание металлов в лиофилизированных образцах сыворотки крови 9 крыс линии Wistar определены спектральным атомно-эмиссионным методом с возбуждением спектров в двухструйном дуговом плазматроне (САЭМ). Этот метод позволяет определить, какие металлы и в каком количестве содержатся в анализируемых пробах, но не дает информации о заряде ионов этих металлов. Все препараты плазмы характеризовались низким, но достаточно близким содержанием Ag, Co, Pb, Cr и Ni (**табл. 2**). Большинство образцов сыворотки демонстрировали близкое содержание металлов, за исключением Mn и Al, минимальное и максимальное значения содержания которых в различных препаратах сыворотки крови крыс, содержащихся в одинаковых условиях, отличалось в 1,5 и в 3,8 раз соответственно. В то же время, количество Cr в препарате сыворотки одной из крыс было в шесть раз выше, чем в остальных. Относительное количество других различных металлов уменьшалось в следующем порядке  $Ca > Mg > Fe > Cu > Zn > Al \geq Sr > Ti \geq Mo \geq Mn \geq Pb \geq Co \geq Ni > Ag$  (**табл. 2**).

Из препаратов сыворотки крови крыс линии Wistar по стандартному протоколу выделения IgG методом аффинной хроматографии на протеин А-сефарозе в условиях разрушения неспецифических взаимодействий согласно [17, 239] получены 9 индивидуальных препаратов иммуноглобулинов класса G. В качестве примера на **рис. 21** приведен профиль оптической плотности при селективной элюции IgG с протеин А-сефарозы для препарата IgG7.

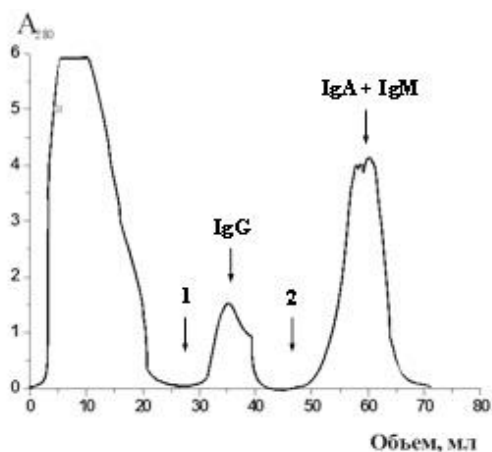
**Таблица 2.** Относительное содержание металлов в лиофилизированных препаратах сыворотки крови крыс линии Wistar

Металл	Металл × 10 <sup>4</sup> , %									
	Номер препарата									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Средняя величина × 10 <sup>4</sup> , %
Ca	1700	1700	<b>1200</b>	1500	1700	1300	1200	1700	<b>2000**</b>	1555,6±274,4
Mg	440	420	280	380	360	310	300	360	410*	362,2 ± 56,3
Fe	<b>140*</b>	120	90	110	<b>80</b>	110	80	100	110	104,4 ± 19,4
Cu	29	25	<b>22</b>	24	34	22	25	<b>39</b>	33	28,1 ± 6,0
Zn	26	44	<b>22</b>	25	<b>28</b>	25	26	25	26	27,4 ± 6,4
Al	6,0	<b>15,0</b>	7,0	13,0	6,0	5,0	5,0	<b>4,0</b>	7,0	7,6 ± 3,8
Sr	5,5	6,2	5,3	6,2	8,4	<b>5,0</b>	6,2	6,5	<b>8,4</b>	6,4 ± 1,2
Ti	5,0	3,0	3,0	3,0	3,0	4,0	3,0	4,0	4,0	3,6 ± 0,7
Mo	2,3	1,5	<b>1,1</b>	1,8	3,3	2,0	2,0	<b>3,4</b>	2,7	2,2 ± 0,8
Mn	1,2	<b>1,6</b>	1,1	<b>1,1</b>	1,3	1,4	1,2	1,4	1,3	1,3 ± 0,2
Pb	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
Cr, Ni	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0	–	–	–	–	≤1,0
Cr	–	–	–	–	–	≤1,0	≤1,0	≤2,0	≤6,0	≤2,5 ± 2,4
Ni	–	–	–	–	–	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0	≤1,0
Co	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

\*Содержание металлов определено методом САЭМ; ошибка определения по данным двух экспериментов не превышала 5–7%.

\*\* Минимальные и максимальные величины отмечены жирным шрифтом.

За 100 % принимали общий вес препарата.

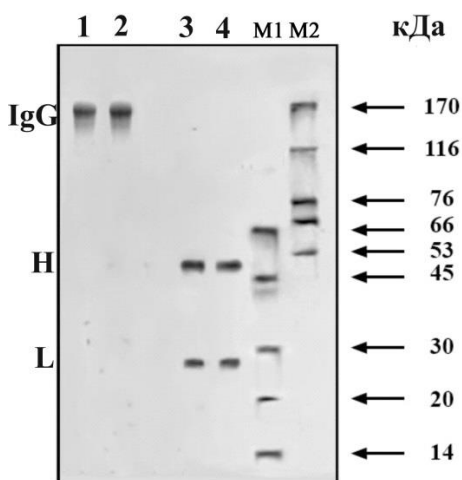


**Рис. 21.** Профиль оптического поглощения при аффинной хроматографии белков сыворотки крови одной из крыс линии Wistar на протеин А-сефарозе.

**1** – элюция 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 4,5;

**2** – элюция 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 3,3.

Согласно данным SDS-гель-электрофореза в ПААГ в восстанавливающих (в присутствии ДТТ) и невосстанавливающих (в отсутствие ДТТ) условиях, выделенные препараты IgG являлись электрофоретически гомогенными. В невосстанавливающих условиях наблюдалась одна белковая полоса с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, соответствующая интактному IgG (рис. 22, дор. 1, 2), и две белковые полосы с молекулярными массами приблизительно 50 и 25 кДа, соответствующие Н- и L-цепям антител после восстановления (рис. 22, дор. 3, 4).



**Рис. 22.** Электрофоретический анализ гомогенности препаратов IgG сыворотки крови двух крыс с помощью SDS-гель-электрофореза в градиентном 4–12,5% ПААГ до (дор. 1, 2) и после (дор. 3, 4) восстановления антител с помощью ДТТ. Белки окрашены нитратом серебра.

**M1** - белковые маркеры с молекулярной массой от 66 до 14 кДа.

**M2** – белковые маркеры с молекулярной массой от 170 до 53 кДа.

Для того чтобы установить, какие металлы связаны с IgG, каждый из 9 препаратов антител пропускали через колонку с протеин G-сефарозой, сорбентом с иммобилизованным белком G из *Staphylococcus aureus*. Этот белок способен специфически связывать Fc-фрагменты всех подклассов IgG. Далее для элюции ионов металлов с иммуноглобулинов, связавшихся с сорбентом, колонку промывали буфером, содержащим 0,1 М EDTA. Анализ содержания металлов в элюате проводили с помощью САЭМ.

В отличие от сыворотки крови, очищенные препараты IgG не содержали достоверно обнаруживаемые количества Sr, Ti, Mo, Cr и Ag. В то время как образцы сыворотки характеризовались высоким содержанием Mg, относительное количество этого металла, связанного с антителами, было очень низким (таблица 3).

Восемь из девяти препаратов IgG содержали сопоставимое между собой количество некоторых ионов металлов, например, разница между максимальным и минимальным значением содержания Ni не превышала 1,3 раза. В то же время, относительное количество разных ионов металлов в одном и том же препарате IgG значительно

отличалось. Так, например, количество железа и меди в случае препарата IgG1 было в 240, и 52 раза соответственно больше чем Mn. Относительное количество Fe в отдельных препаратах было от 33 до 460 раз выше, чем Ni, Mn, Co или Mg. В среднем, относительное количество различных металлов, связанных с иммуноглобулинами класса G, уменьшалось в порядке: Fe ≥ Pb ≥ Zn ≥ Cu ≥ Al ≥ Ca ≥ Ni ≥ Mn > Co ≥ Mg.

**Таблица 3.** Относительное содержание металлов в препаратах IgG крыс Wistar

Металл	Металл×10 <sup>4</sup> , %									
	Номер препарата IgG									Средняя величина×10 <sup>4</sup> , %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>Fe</b>	12*	11	5,0	7,0	4,0	10	8,0	<b>2,0**</b>	<b>23</b>	9,1 ± 6,2
<b>Pb</b>	7,7	8,7	8,7	5,7	<b>1,7</b>	20	6,7	<b>1,7</b>	<b>17</b>	8,7 ± 6,2
<b>Zn</b>	6,0	2,5	1,5	0,5	<b>0,1</b>	0,3	4,5	<b>0,1</b>	<b>16</b>	3,5 ± 5,1
<b>Cu</b>	2,6	2,6	2,6	1,6	2,6	1,6	1,6	<b>0,3</b>	<b>8,6</b>	2,7 ± 2,4
<b>Al</b>	3,0	3,0	2,0	3,0	2,0	2,0	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	2,3 ± 1,0
<b>Ca</b>	<b>0,1</b>	0,15	3,0	3,0	3,0	0,2	0,3	<b>0,1</b>	<b>10</b>	2,2 ± 3,2
<b>Ni</b>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	<b>3,3</b>	0,7 ± 1,0
<b>Mn</b>	<b>0,05</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	<b>0,7</b>	0,1	0,3	0,2 ± 0,2
<b>Co</b>	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
<b>Mg</b>	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1

\*Содержание металлов определено с помощью метода САЭМ; ошибка определения по данным двух экспериментов не превышала 5–7%.

\*\* Минимальные и максимальные величины отмечены жирным шрифтом.

За 100 % принимали общий вес препарата.

Несмотря на использование стандартного метода выделения IgG, наблюдалась значительная разница в содержании ионов некоторых металлов в препаратах антител разных крыс. Например, количество Fe и Ca в двух различных образцах отличалось в 11,5 и 100 раз соответственно. Относительное количество других ионов металлов, связанных с IgG девяти животных, отличалось от 4 раз для Al до 160 раз для Zn. Согласно полученным данным, IgG разных крыс демонстрировали значительную вариабельность во



взаимодействии с ионами металлов, в то время как содержание этих металлов в крови у этих животных было близким.

#### **3.4.1.2. Влияние ионов $K^+$ на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG из сыворотки крови крыс линии Wistar**

Показано, что 0,1 М KCl активирует как пероксидазную, так и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности недиализованных препаратов антител [17]. Так как согласно полученным данным препараты антител крыс отличались по составу металлов, можно предположить, что они по-разному могут быть активированы ионами  $K^+$ . Для оценки влияния ионов  $K^+$  на оксидоредуктазные активности абзимов, определены относительные активности 9 препаратов IgG в реакциях пероксид-зависимого и пероксид-независимого окисления субстрата, в присутствии и в отсутствие 0,1 М KCl. В качестве субстрата использовали 3,3'-диаминобензидин (DAB) в оптимальной концентрации 0,93 мМ. В экспериментах использовали суммарные препараты IgG, всех фракций, полученных при их выделении. Концентрация IgG выбиралась такой, при которой наблюдалась линейная зависимость скорости реакции окисления субстрата от концентрации антител. Значения кажущихся  $k_{cat}$  окисления антителами DAB при фиксированной концентрации 0,93 мМ в присутствии и в отсутствие KCl ( $k_{cat} = V$  (М/мин)/ [IgG] (М)), были индивидуальными для каждого из препаратов антител (таблица 4). В присутствии пероксида водорода и в отсутствие KCl кажущаяся  $k_{cat}$  варьировала в диапазоне от 19,7 до 158,3 мин<sup>-1</sup>. Добавление KCl приводило к увеличению скорости реакции в случае пяти из девяти препаратов IgG в 1,2–2 раза, активность одного из препаратов осталась на прежнем уровне, а у остальных трех препаратов уменьшилась в 1,2–2,9 раз.

В отсутствие KCl величины кажущихся  $k_{cat}$  для пероксид-независимой оксидоредуктазной реакции варьировали в диапазоне от 3,9 до 136,9 мин<sup>-1</sup> и были в 1,2–5 раз ниже значений  $k_{cat}$  в случае пероксидазной активности. В присутствии KCl величины кажущихся  $k_{cat}$  варьировали в диапазоне 12,1–260 мин<sup>-1</sup> и были в 0,61–3,0 раза ниже значений  $k_{cat}$  в случае пероксидазной активности этих препаратов, но, в то же время, выше в 1,1–4,8 раза значений  $k_{cat}$  при пероксид-независимом оксидоредуктазном окислении субстрата в отсутствие KCl. Увеличение обеих активности ряда препаратов IgG в присутствии KCl, свидетельствует о том, что, вероятно, в сыворотке крови ионы  $K^+$  и  $Na^+$  могут являться активаторами некоторых подфракций абзимов. Такая активация может быть связана с изменением пространственной структуры антител под действием ионов калия к более оптимальной для катализа. Понижение активности нескольких препаратов

антител при добавлении KCl может являться следствием конкурентного вытеснения ионами  $K^+$  экзогенных ионов различных двухвалентных металлов из комплекса с молекулами иммуноглобулинов. В пользу этого предположения свидетельствует заметное понижение активности всех препаратов антител после их предварительной продолжительной инкубации с 0,1–0,15 М KCl.

**Таблица 4.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности индивидуальных препаратов IgG крови крыс линии Wistar в присутствии и в отсутствие 0,1 М KCl

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , $\text{min}^{-1}^{**}$							
	Пероксидазная активность (+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность (-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			-KCl	+KCl
	- KCl	+ KCl	Соотношение +KCl / -KCl	- KCl	+ KCl	Соотношение +KCl / -KCl	Соотношение $k_{cat} + \text{H}_2\text{O}_2 / - \text{H}_2\text{O}_2$	Соотношение $k_{cat} + \text{H}_2\text{O}_2 / - \text{H}_2\text{O}_2$
<b>IgG-1</b>	55,3*	64,0	1,2	35,1	42,1	1,2	1,5	1,5
<b>IgG-2</b>	19,7	28,6	1,5	3,9	12,1	3,1	5,0	2,4
<b>IgG-3</b>	134,3	64,4	0,5	48,8	50,8	1,1	2,8	1,3
<b>IgG-4</b>	55,9	112,8	2,0	45,2	37,7	0,6	1,2	3,0
<b>IgG 5</b>	102,1	145,0	1,4	81,1	49,2	0,6	1,3	3,0
<b>IgG-6</b>	93,0	108,1	1,2	82,1	90,4	1,1	1,1	1,2
<b>IgG-7</b>	50,5	17,7	0,35	31,6	84,8	1,6	3,8	0,21
<b>IgG-8</b>	158,3	158,5	1,0	136,9	260,1	1,9	1,2	0,61
<b>IgG-9</b>	100,0	84,7	0,85	96,9	97,0	1,0	1,0	0,87
<b>Среднее значение</b>	85,2 ± 44,3	87,1 ± 48,5	1,1 ± 0,5	62,4 ± 44,3	80,5 ± 72,9	1,4 ± 0,8	2,1 ± 1,4	1,6 ± 1,0

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

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), DAB (0,93 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (М)}$ , где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

Таким образом, все 9 препаратов иммуноглобулинов класса G как в случае пероксидазной, так и пероксид-независимой оксидоредуктазной активности, демонстрировали индивидуальную зависимость значений кажущихся  $k_{cat}$  от ионов  $K^+$ , что может являться следствием как каталитической гетерогенности абзимов, так и

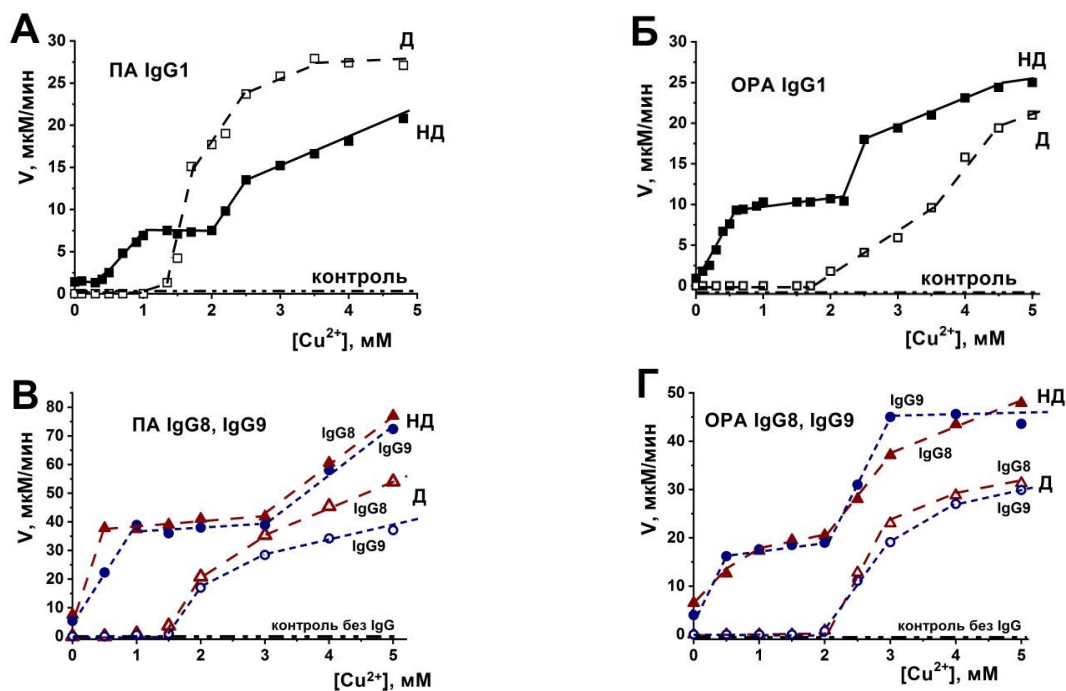
существенного отличия девяти препаратов IgG друг от друга по содержанию связанных с ними оптимальными для катализа ионами различных металлов.

### **3.4.1.3. Влияние ионов двухвалентных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови крыс линии Wistar**

Для оценки влияния ионов двухвалентных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности иммуноглобулинов класса G крови крыс линии Wistar, проанализирована возможная корреляция между значениями кажущихся  $k_{cat}$  абзимов в реакциях окисления DAB, и относительным количеством различных ионов металлов, связанных с ними. Согласно данным, полученным с помощью САЭМ, статистически значимой корреляции между активностями IgG и относительным содержанием любого эндогенного металла, связанного с антителами, включая железо или медь, не обнаружено. Например, препараты IgG3, IgG6, IgG8 и IgG9 характеризовались самыми высокими как пероксидазной, так и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, и, в то же время, демонстрировали значительную вариабельность содержания ионов меди и железа. Количество Fe и Cu у IgG8 и IgG9 отличалось в 11,5 и 28,6 раз соответственно. Известно, что многие оксидоредуктазы используют в качестве кофактора при катализе один ион металла, например, Mn-SOD млекопитающих или Fe-SOD бактерий [68, 70, 75]. В то же время, известны оксидоредуктазы, в активный центр которых входят несколько ионов металлов. Например, Cu,Zn-SOD, содержащая ион меди, непосредственно вовлеченный в процесс окислительно-восстановительной реакции, и ион  $Zn^{2+}$  с постоянной валентностью, необходимый для активации процесса. Некоторые оксидоредуктазы содержат два иона металла с переменной степенью окисления, как разных, так и одинаковых, каждый из которых является непосредственным участником окислительно-восстановительной реакции [261]. Следовательно, можно предположить, что какие-то другие ионы переходных металлов или их комбинации с ионами как переменной, так и постоянной валентности, могут увеличивать активность антител в реакциях окисления DAB. В этом случае логично предположить отсутствие корреляции между значениями кажущихся  $k_{cat}$  абзимов и относительным количеством различных ионов металлов, связанных с ними. Кроме того, нельзя исключить, что поликлональные иммуноглобулины класса G крыс могут являться смесью различных подфракций антител (моноклональных иммуноглобулинов) с окислительно-восстановительными активностями, способными окислять субстраты, используя один или два иона металла, которые, в свою очередь, могут быть как одинаковыми, так и различными. Принимая это

во внимание, активация IgG различными ионами металлов проанализирована более детально.

На первом этапе проведено сравнение влияния ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности диализованных против EDTA и EGTA, и недиализованных препаратов IgG крови крыс линии Wistar. На **рис. 23** показано характерное для большинства исследованных препаратов IgG двухфазное возрастание активности антител при увеличении концентрации добавляемой соли  $\text{CuCl}_2$ , схожее как в случае окисления субстрата в присутствии пероксида водорода, так и в его отсутствие.



**Рис. 23.** Зависимость пероксидазной (ПА) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОПА) активностей препаратов IgG1 (**А**, **Б**), IgG8 и IgG9 (**В**, **Г**) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации  $\text{CuCl}_2$ . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG (33 нМ) отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции для каждой из концентраций  $\text{Cu}^{2+}$  не превышала 5–10%

Повышение концентрации меди приводило к увеличению обеих активностей недиализованных препаратов IgG. Промежуточное плато достигалось при 0,7–1,8 мМ концентрации  $\text{CuCl}_2$ , и соответствовало увеличению первоначальной активности в 11,4 раза. При концентрации меди больше 2 мМ, активность снова начинала резко расти, увеличиваясь еще в 2,4 раза (при концентрации  $\text{CuCl}_2$ , равной 5 мМ).

После удаления эндогенных ионов металлов с помощью диализа одного из препаратов иммуноглобулинов (IgG1) против EDTA и EGTA в присутствии Chelex-100, антитела не проявляли активности при добавлении ионов меди в концентрациях, менее 2 мМ. Однако 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  и дальнейшее увеличение концентрации соли до 5 мМ, приводило к резкому росту пероксид-независимой оксидоредуктазной активности,

достигающей в итоге значений, сопоставимых с активностью недиализованного препарата антител (рис. 23Б).

В присутствии пероксида водорода недиализованный препарат IgG1 демонстрировал похожий двухфазный рост пероксидазной активности с увеличением концентрации ионов меди (рис. 23А). Относительная активность, соответствовавшая первому плато, превышала начальную активность антител (до добавления ионов металлов) в 5,4 раза, однако была в 1,4 раза ниже таковой при пероксид-независимом окислении субстрата (рис. 23Б, кривая НД). При добавлении 5 мМ CuCl<sub>2</sub>, относительная пероксидазная активность препарата антител была в 1,2 раза ниже пероксид-независимой оксидоредуктазной. Интересно, что подобно оксидоредуктазной активности (рис. 23Б), диализованный препарат IgG1, не содержащий после диализа эндогенных ионов металлов, не обладал пероксидазной активностью при добавлении экзогенных ионов меди в концентрациях меньше 1,5 мМ (рис. 23А). При увеличении концентрации Cu<sup>2+</sup> от 1,5 до 5,0 мМ, пероксидазная активность диализованного препарата IgG1 возрастала более чем в 1,3 раза по сравнению с недиализованным препаратом.

Аналогичные двухфазные зависимости активностей антител от увеличения концентрации меди выявлены для всех недиализованных препаратов IgG, в то время как диализованные антитела оставались неактивными в диапазоне концентраций CuCl<sub>2</sub> от 0 до 1,5–2,0 мМ. Следует отметить, что оксидоредуктазные активности и их рост на первом или втором участках двухфазной кривой, являлись индивидуальными для каждого из препаратов IgG. На рис. 23В и 23Г продемонстрированы данные для IgG8 и IgG9.

Добавление ионов Mn<sup>2+</sup> к диализованным и недиализованным IgG, приводило к их активации, однако, кривые зависимости активностей различных препаратов антител от концентрации ионов марганца отличались (рис. 24).

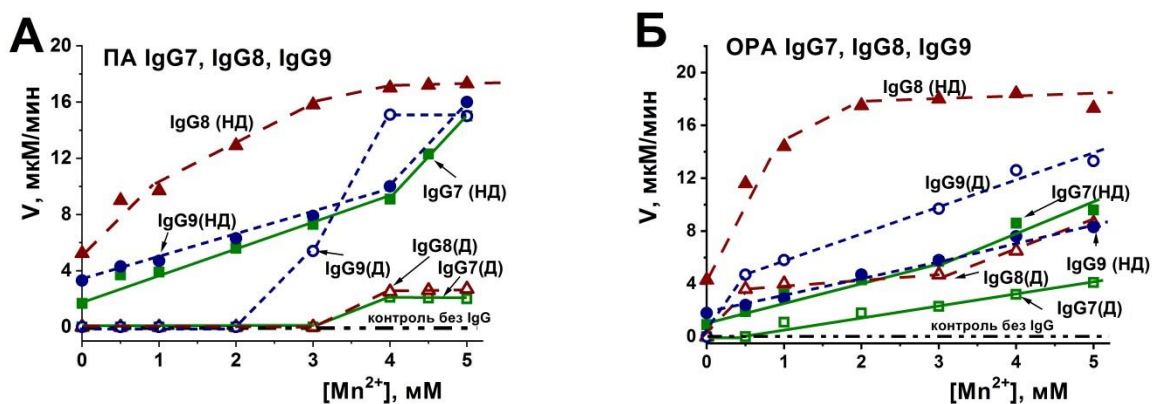


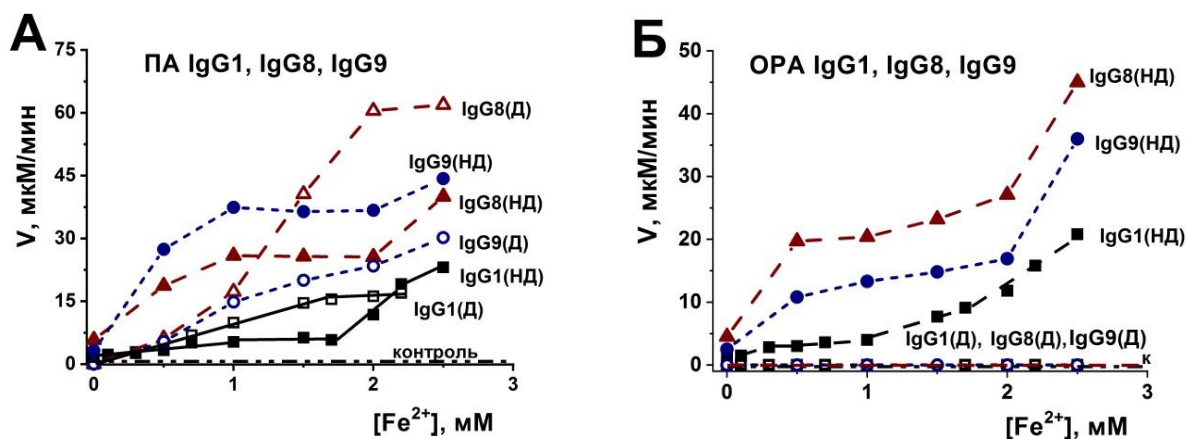
Рис. 24. Зависимость пероксидазной (ПА, А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОПА, Б) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации MnCl<sub>2</sub>. Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД, соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций Me<sup>2+</sup> не превышала 5–10%.

Недиализованные препараты IgG7 и IgG9 демонстрировали похожее, практически линейное возрастание обеих активностей при увеличении концентрации  $Mn^{2+}$  до 3–4 мМ с дальнейшим резким ростом при больших концентрациях марганца (**рис. 24А**). В случае диализованных препаратов IgG7 и IgG9 наблюдалось близкое к линейному увеличению пероксид-независимой оксидоредуктазной активности (**рис. 24Б**), в то время как их пероксидазная активность в присутствии низких концентраций ионов марганца (ниже 2–3 мМ) практически отсутствовала и оставалась очень низкой и при более высокой концентрации  $Mn^{2+}$  (**рис. 24А**). Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность диализованного препарата IgG9 была значительно выше активности недиализованного IgG9, однако в случае диализованных и недиализованых препаратов IgG7 и IgG8 наблюдалась обратная закономерность (**рис. 24Б**).

Пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  в высоких концентрациях, были приблизительно в 2–30 раз ниже (в зависимости от препарата и анализируемой активности) наблюдаемых активностей этих же препаратов в присутствии ионов  $Cu^{2+}$ . В отличие от ионов меди (**рис. 23**), ионы марганца приводили к появлению пероксид-независимой оксидоредуктазной активности всех диализованных препаратов антител, не содержащих эндогенных ионов металлов, при концентрациях  $Mn^{2+}$  ниже 2 мМ (**рис. 24Б**), однако, при этом, практически не активировали пероксидазную активность диализованных IgG (**рис. 24А**).

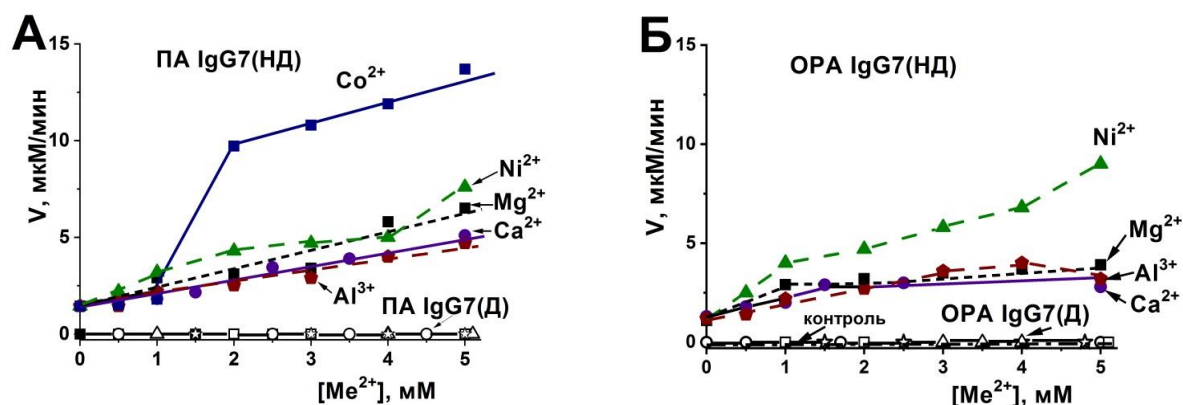
Добавление ионов  $Fe^{2+}$  к антителам в концентрациях, выше 2,5 мМ, приводило к выпадению в осадок компонентов реакционной смеси, поэтому  $FeCl_2$  использовали только в низких концентрациях (менее 2,5 мМ). Влияние ионов железа на пероксид-независимую оксидоредуктазную активность недиализованых, содержащих связанные с ними ионы металлов, препаратов IgG было сходным с влиянием ионов меди, и приводило к формированию двухфазной кривой зависимости скорости реакции от концентрации ионов металла (**рис. 25А и рис. 25Б**), в то время как активность диализованных препаратов антител при добавлении ионов железа оставалась близкой к нулю (**рис. 25Б**).

В отличие от ионов  $Cu^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ , ионы  $Fe^{2+}$  в низких концентрациях (до 1,8 мМ) явно активировали пероксидазную активность диализованных IgG, однако кривые зависимости их скорости реакции от концентрации ионов железа не являлись двухфазными (**рис. 25А**). Увеличение скорости реакции пероксидазного окисления субстрата с ростом концентрации железа было индивидуальным для каждого из препаратов антител, как недиализованного, так и диализованного. Максимальные значения пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей иммуноглобулинов G в присутствии ионов  $Fe^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  были сопоставимы (**рис. 23, 25**).



**Рис 25.** Зависимость пероксидазной (ПА, *А*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, *Б*) активностей препаратов IgG1, IgG8 и IgG9 в реакции окисления DAB (0,93 мМ), от концентрации  $\text{FeCl}_2$ . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG (33 нМ) отмечены как Д и НД, соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{Fe}^{2+}$  не превышала 5–10%.

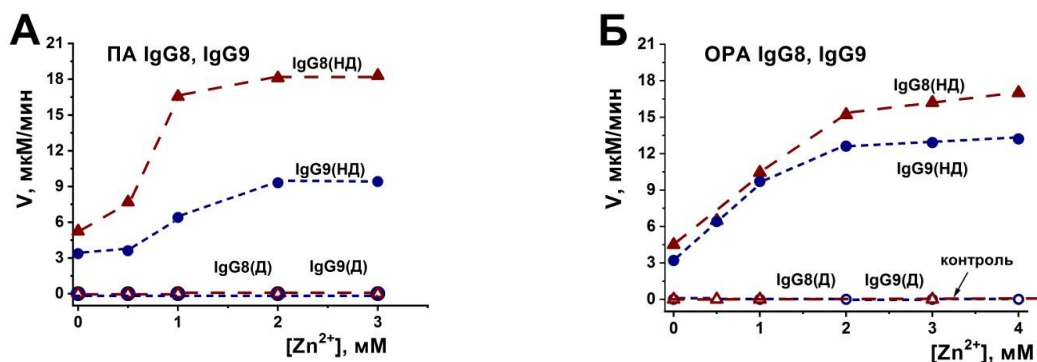
Ионы металлов с постоянной степенью окисления, такие как  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , в присутствии или в отсутствие пероксида водорода не активировали окисление DAB диализованными, не содержащими эндогенных ионов металлов, препаратами антител (рис. 26*А*).



**Рис. 26.** Зависимость пероксидазной (ПА, *А*) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, *Б*) активностей препарата IgG7 в реакции окисления DAB (0,93 мМ), от концентрации различных ионов металлов:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ . Кривые диализованного и недиализованного препарата IgG7 (33 нМ), отмечены как Д и НД, соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{Me}^{2+}$  не превышала 5–10%.

Эффект влияния ионов  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Al}^{3+}$  на исследуемые активности недиализованных IgG оказался сопоставимым в случае всех препаратов проанализированных иммуноглобулинов класса G. Добавление ионов данных металлов в реакцию приводит к увеличению активности антител (рис. 26*А*).

Ионы  $\text{Zn}^{2+}$  активировали как пероксидазную, так и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности недиализованных IgG (рис. 27).



**Рис. 27.** Зависимость пероксидазной (ПА, А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, Б) активностей препаратов IgG8 и IgG9 в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации ZnCl<sub>2</sub>. Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG (33 нМ), отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций Zn<sup>2+</sup> не превышала 5–10%.

Такие ионы металлов, как Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, не участвуют непосредственно в окислительно-восстановительных реакциях, однако могут влиять на каталитическую активность абзимов посредством взаимодействия с переменными или константными доменами антител и индукции конформационных изменений молекул антител. С другой стороны, каждый из этих ионов металлов может выступать в качестве дополнительного кофактора для реакции окисления субстрата, подобно иону Zn<sup>2+</sup> в активном центре фермента Cu,Zn-SOD [70]. Кроме того, увеличение скорости реакции в 3–4 раза в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> или Al<sup>3+</sup>, сопоставимо с увеличением активности некоторых препаратов IgG при добавлении в реакционную смесь ионов K<sup>+</sup> (табл. 4). Можно предположить, что эти ионы металлов, подобно ионам K<sup>+</sup>, участвуют в создании оптимальной для протекания реакции структуры антитела.

В присутствии ионов Ni<sup>2+</sup> происходила заметная активация недиализованных препаратов иммуноглобулинов, их активности возрастали в 5,2–7,5 раз. Ионы Co<sup>2+</sup> значительно (до 9,5 раз) увеличивали только пероксидазную активность недиализованных IgG и практически не оказывали влияние на их активность в отсутствие пероксида водорода (рис. 26А, Б). Таким образом, все препараты антител демонстрировали одинаковые зависимости (имели близкую форму кривых) скорости реакции окисления субстрата от концентрации ионов металла в случае различных ионов металлов (рис. 26). Известно, что некоторые оксидоредуктазы могут использовать два иона переходных металлов для окисления субстрата [261]. Следовательно, нельзя исключить, что Ni<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup> способны увеличивать активность недиализованных препаратов антител, участвуя в катализе совместно с эндогенными ионами металлов.

Наблюдаемые кривые зависимости пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей недиализованных IgG от концентраций Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>,



являлись двухфазными и, в то же время, добавление этих ионов металлов в реакционную смесь приводило к появлению активности у диализованных IgG, не содержащих какие-либо другие ионы металлов (рис. 23–25). Все диализованные препараты IgG катализировали окисление субстрата в присутствии и в отсутствие пероксида водорода только при высоких концентрациях ионов меди ( $>1,5\text{--}2,0$  мМ), демонстрируя кривые, близкие к гиперболическим при концентрациях  $\text{CuCl}_2$  выше 1,5 мМ (рис. 23А, Б). Подобное влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на активности диализованных и недиализованных препаратов антител можно объяснить, если предположить, что ионы меди могут эффективно окислять субстрат только совместно с другим ионом металла, который, в свою очередь, может являться или еще одним ионом  $\text{Cu}^{2+}$ , или каким-либо иным, например, ионом  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и т.д. В этом случае, первая часть двухфазной зависимости скорости реакции от концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 23, НД) может являться результатом взаимодействия иона меди в качестве дополнительного кофактора с молекулами иммуноглобулинов. Только 20–40% молекул антител обладают сродством к ионам металлов, сохраняя их после выделения и очистки антител [239]. Поэтому вторая часть двухфазной кривой зависимости скорости реакции от концентрации ионов меди для недиализованных препаратов антител (рис. 23) может быть объяснена насыщением молекул IgG, утративших связанные с ними металлы в процессе выделения и очистки, одним или двумя ионами  $\text{Cu}^{2+}$ . Так как активация диализованных антител наблюдается только при достаточно высоких концентрациях  $\text{CuCl}_2$  ( $>1,5$  мМ, рис. 23), нельзя исключить, что сродство IgG к ионам  $\text{Cu}^{2+}$  является относительно низким, и взаимодействие молекулы антитела с ионом меди, приводящее к возможности осуществления окислительной реакции, происходит при высокой концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Активация недиализованных IgG в присутствии только соли  $\text{CuCl}_2$  в концентрациях ниже 1,5 мМ (рис. 23), свидетельствует о том, что антитела способны связывать ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , даже если те находятся в низких концентрациях. Возможно, молекулы IgG связывают первый ион  $\text{Cu}^{2+}$  при низких концентрациях меди ( $<1,5$  мМ), однако, образовавшийся таким образом комплекс  $\text{IgG}\cdot\text{Cu}^{2+}$  не обладает активностью, и только после присоединения второго иона  $\text{Cu}^{2+}$ , которое происходит при концентрации  $\text{CuCl}_2$  больше 1,5 мМ, итоговый комплекс  $\text{IgG}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  приобретает способность катализировать окисление DAB. Однако могут существовать и другие пути активации абзимов двумя ионами меди: в качестве второго электрофильного металла-кофактора или вследствие взаимодействий с переменным или константным доменами антител. Эти пути окисления субстрата могут объяснить двухфазные кривые в случае недиализованных антител, а также возникновение способности у диализованных препаратов IgG

катализировать окислительные реакции в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в высоких концентрациях (рис. 23).

Некоторые супероксиддисмутазы млекопитающих являются Mn-зависимыми ферментами. Интересно, что пероксидазная активность диализованных IgG в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  ( $>3$  мМ) была только в 2 раза выше активности антител в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $>1,5$  мМ) (рис. 24А), однако абзимы эффективно катализировали окисление субстрата при низких концентрациях  $\text{Mn}^{2+}$ , демонстрируя зависимости, близкие к линейным (рис. 24Б). Влияние ионов марганца на пероксидазную активность диализованных препаратов IgG (рис. 24А) было сходным с влиянием ионов меди (рис. 23А). Следовательно, можно предположить, что при высоких концентрациях  $\text{MnCl}_2$  происходит образование комплексов  $\text{IgG}\cdot\text{Mn}^{2+}\cdot\text{Mn}^{2+}$ , способных катализировать пероксидазное окисление субстрата с эффективностью в 10–20 раз более низкой, нежели комплексы  $\text{IgG}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{Cu}^{2+}$ . Увеличение активности антител при высоких концентрациях  $\text{MnCl}_2$  ( $> 3\text{--}4$  мМ) может возникать в результате взаимодействия фракций IgG, свободных от ионов металлов, с двумя ионами  $\text{Mn}^{2+}$ . Вероятно, некоторые подфракции антител для катализа пероксид-независимого оксидоредуктазного окисления субстрата используют ион  $\text{Mn}^{2+}$ , подобно Mn-SOD, осуществляющей катализ после связывания только одного иона марганца.

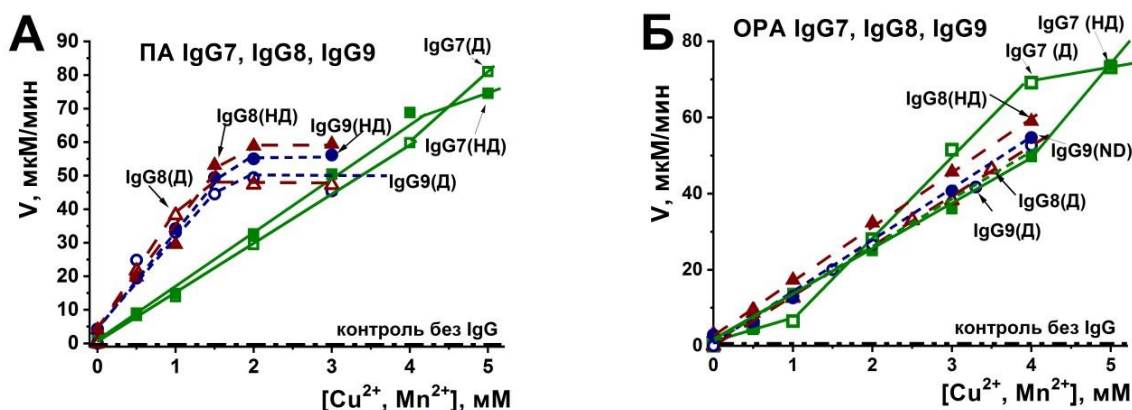
Представленные данные свидетельствуют о чрезвычайно сложной зависимости относительных пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей от концентрации различных ионов металлов, как с переменной, так и с постоянной валентностью. Отсутствие этих активностей у диализованных препаратов IgG при добавлении в реакционную смесь некоторых ионов переходных металлов и двухфазные кривые зависимостей, наблюдаемые в случае недиаализованных препаратов антител, содержащих связанные с ними ионы металлов, позволяют предположить, что окисление субстрата абзимами и в присутствии, и в отсутствие пероксида водорода может зависеть как от одного из ионов металлов, так и от их различных комбинаций.

#### **3.4.1.4. Пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности иммуноглобулинов G из крови крыс линии Wistar в присутствии двух различных ионов металлов**

Для оценки влияния на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности иммуноглобулинов класса G комбинаций различных ионов металлов, к препаратам антител добавляли эквимольные смеси двух ионов в различных концентрациях в диапазоне 0,5–5,0 мМ.

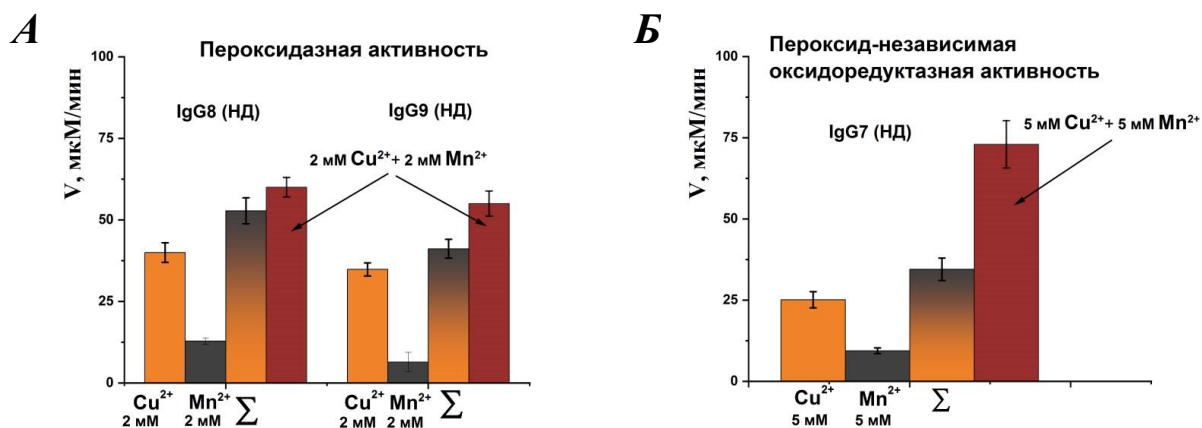
На первом этапе проведен анализ изменения активности диализованных и недиализованных препаратов IgG в присутствии эквимольной смеси ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  в различной концентрации (рис. 28). Как отмечено ранее, зависимость влияния ионов меди на активность антител характеризовалась двухфазными кривыми, в то время как диализованные абзимы при добавлении  $\text{Cu}^{2+}$  окисляли DAB как в присутствии пероксида водорода, так и в ее отсутствие, только при высоких концентрациях меди ( $> 2$  мМ) (рис. 23). Ионы марганца активировали пероксидазное окисление субстрата диализованными IgG только при концентрации больше 3 мМ, при этом активность антител оставалась очень низкой (рис. 24).

Это существенное отличие между диализованными и недиализованными препаратами антител исчезало в присутствии комбинации  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ : зависимости увеличения обеих активностей характеризовались линейными участками при низких концентрациях солей данных металлов (рис. 28А, Б).



**Рис. 28.** Зависимость пероксидазной (ПА, А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, Б) активностей препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{MnCl}_2$ . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$  не превышала 5–10%

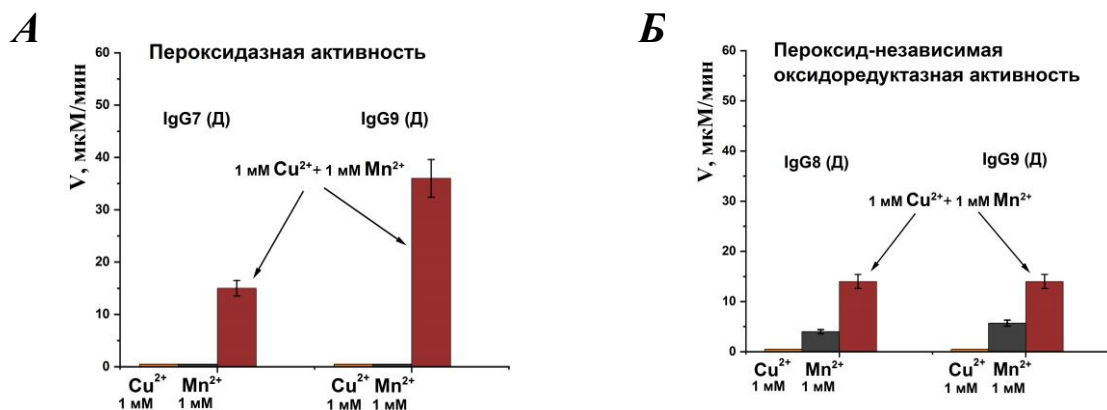
Кривые зависимости пероксидазной активности от концентрации эквимольной смеси ионов  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  в случае большинства препаратов антител возрастали с выходом на плато при концентрации металлов больше 2 мМ, в то время как кривые в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности не достигали плато при концентрации эквимольной смеси двух ионов  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$ , равной 4–5 мМ (рис. 28А, Б). Важно отметить, что, например, пероксидазная активность для недиализованных препаратов IgG8 и IgG9, соответствовавшая эквимольной концентрации солей  $\text{CuCl}_2 + \text{MnCl}_2$ , равной 2 мМ, была выше активности, наблюдаемой в присутствии только  $\text{CuCl}_2$  или  $\text{MnCl}_2$  в этой же концентрации в 1,5–1,6 и 4,6–8,6 раз соответственно (рис. 23, 24), и в 1,3 раза выше суммы активностей антител при добавлении одной из этих солей (рис. 29А).



**Рис. 29.** Peroxidase activity of non-dialyzed preparations IgG8 and IgG9 (33 nM) (**А**) and peroxidase-independent oxidoreductase activity of non-dialyzed preparation IgG7 (33 nM) (**Б**) in the reaction of oxidation of DAB (0,93 mM) in the presence of salts CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> and equimolar mixture CuCl<sub>2</sub>+ MnCl<sub>2</sub>.

Подобная ситуация наблюдалась и для пероксид-независимой оксидоредуктазной активности недиализованных IgG. в присутствии 5 mM эквимольной смеси солей CuCl<sub>2</sub> + MnCl<sub>2</sub> (**рис. 29Б**).

При добавлении смеси 1 mM ионов Cu<sup>2+</sup> и 1 mM ионов Mn<sup>2+</sup> пероксидазная (**рис. 30А**) и пероксид-независимая оксидоредуктазная (**рис. 30Б**) активности окисления DAB диализованными препаратами IgG, не содержащими эндогенных ионов металлов, возрастали в 15–36 и 2,4–3,5 раз соответственно, по сравнению с суммой активностей этих реакций в присутствии одного из этих ионов, 1 mM Cu<sup>2+</sup> или 1 mM Mn<sup>2+</sup>.

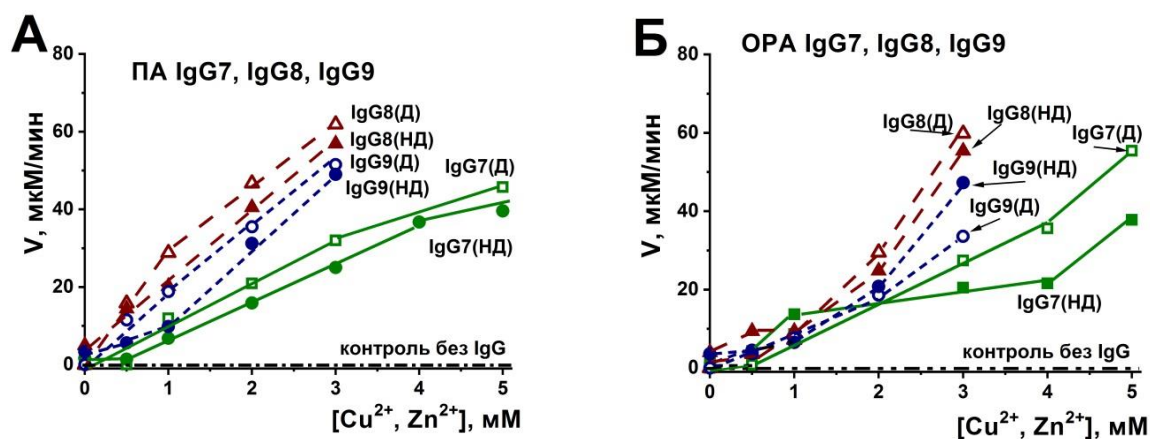


**Рис. 30.** Peroxidase activity of dialyzed preparations IgG7 and IgG9 (33 nM) (**А**) and peroxidase-independent oxidoreductase activity of dialyzed preparations IgG8 and IgG9 (33 nM) (**Б**) in the reaction of oxidation of DAB (0,93 mM) in the presence of salts CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> and equimolar mixture CuCl<sub>2</sub>+MnCl<sub>2</sub>.

Таким образом, комбинация ионов Cu<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup> устраняет двухфазный тип кривой и активирует пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности диализованных иммуноглобулинов класса G в зависимости от концентрации пар ионов

металлов и вида активности от 2 до 36 раз лучше, чем любой из этих ионов, взятый отдельно.

В то время как ионы  $\text{Cu}^{2+}$  только при высоких концентрациях ( $>2$  мМ, **рис. 23**) активировали диализованные препараты антител, а  $\text{Zn}^{2+}$  не активировал их совсем, 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. 31А, Б**). Двухфазные кривые, наблюдаемые для недиализованных IgG, в присутствии ионов меди в реакции пероксидазного окисления DAB (**рис. 23**), становились близкими к линейным в присутствии смеси  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в низких концентрациях и сравнимыми с кривыми для диализованных препаратов IgG (**рис. 31А**), которые в свою очередь, оставались неактивными при добавлении ионов  $\text{Zn}^{2+}$  (**рис. 27А**) и активировались только высокими концентрациями ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 23**).



**Рис. 31.** Зависимость пероксидазной (ПА, А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, Б) активностей препаратов IgG7, IgG8 и IgG9 в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{ZnCl}_2$ . Кривые диализованных и недиализованных препаратов IgG (33 нМ) отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{Me}^{2+}$  не превышала 5–10%.

Пероксидазная активность недиализованных препаратов антител в присутствии эквимольной смеси  $\text{Ca}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  (**рис. 32А**) оставалась на том же уровне, что и активность в присутствии только ионов меди (**рис. 23А**), в то время как добавление пары ионов  $\text{Ca}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  к диализованным препаратам антител приводило к снижению их активности по сравнению с таковой в присутствии только ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 23А**, кривая Д и **рис. 32А**, кривая ПА IgG7Д). Подобное ингибирование активности наблюдалось и в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности диализованных и недиализованных иммуноглобулинов класса G (**рис. 32А** и **рис. 23Б**).

Диализованные IgG не могли катализировать окисление субстрата при низких концентрациях ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\leq 1,5$  мМ) или в присутствии пары ионов  $\text{Ca}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  (**рис. 23**,

рис. 32А), однако добавление ионов  $\text{Cu}^{2+}$  совместно с ионами  $\text{Mg}^{2+}$  даже в низких концентрациях (рис. 32Б) приводило к активации как пероксидазной, так и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей антител. Кривые зависимости скорости реакции от концентрации эквимольной смеси ионной пары  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  были двухфазными в случае недиализованных препаратов и близки к линейным для диализованных препаратов антител (рис. 32Б).

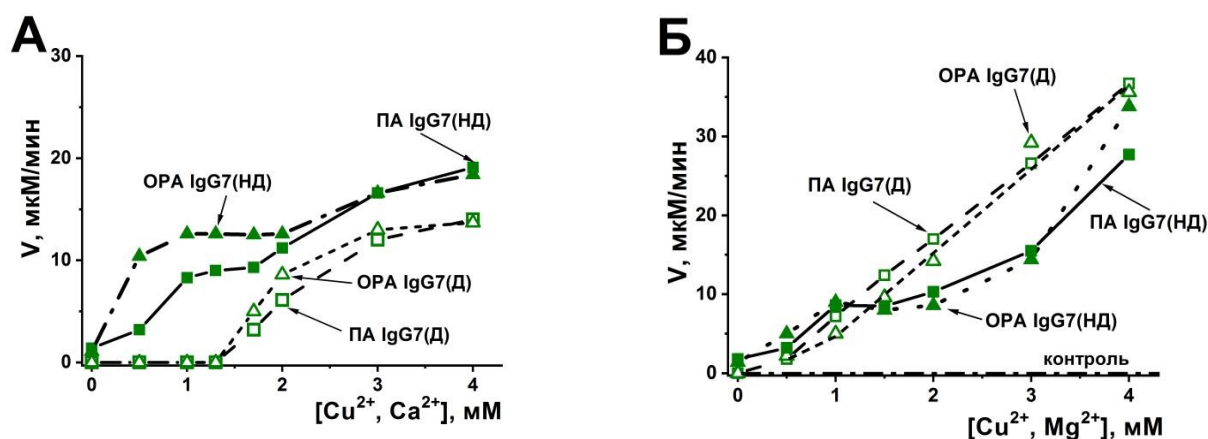


Рис. 32. Зависимость пероксидазной (ПА) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА) активностей препарата IgG7 (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{CaCl}_2$  (А) и  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$  (Б). Кривые диализованного и недиализованного препарата IgG7 (33 нМ) отмечены как Д и HD соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{Me}^{2+}$  не превышала 5–10%.

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 низких концентрациях солей (до 0,5 мМ), а при более высоких концентрациях имели гиперболический или двухфазный вид (рис. 33А, Б).

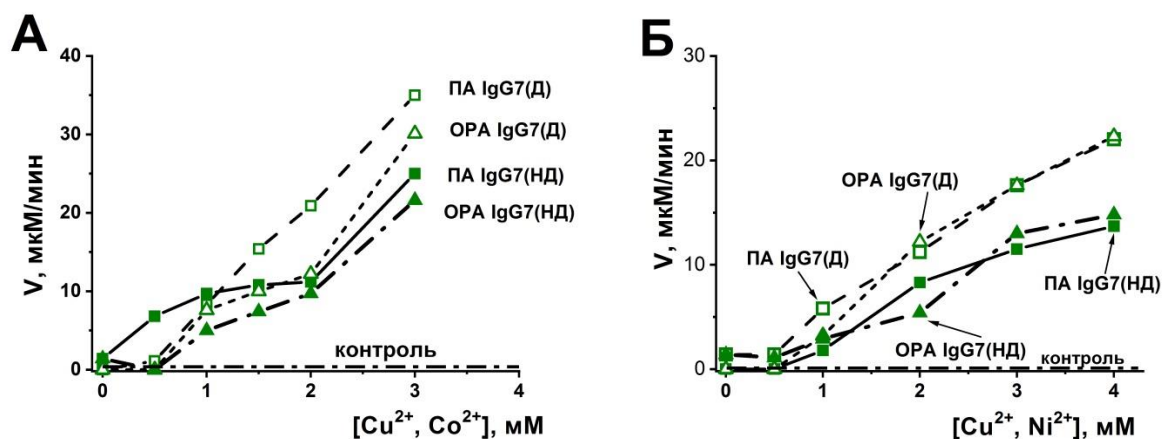
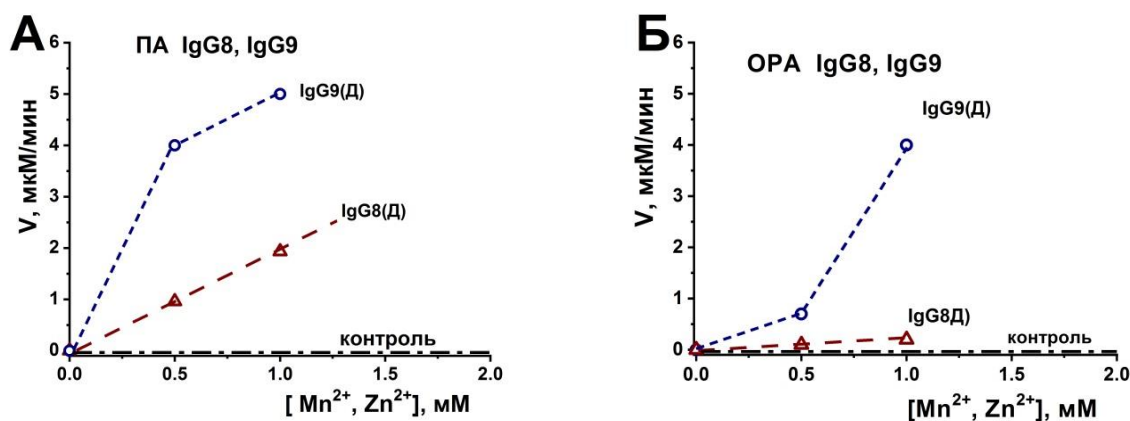


Рис. 33. Зависимость пероксидазной (ПА) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОРА, Б) активностей препарата IgG7 в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $\text{CuCl}_2$  и  $\text{CoCl}_2$  (А) и  $\text{CuCl}_2$  с  $\text{NiCl}_2$  (Б). Кривые диализованного и недиализованного препарата IgG7 (33 нМ) отмечены как Д и HD, соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $\text{Me}^{2+}$  не превышала 5–10%.



Ионы  $Zn^{2+}$  (рис. 27А) или  $Mn^{2+}$  (рис. 24А) не активировали пероксидазную активность диализованных препаратов IgG, однако их совместное добавление к диализованным антителам приводило к появлению у них низкой пероксидазной активности ( $V < 5$  мкМ/мин) (рис. 34А). В то же время,  $Zn^{2+}$  ингибировал оксидоредуктазное окисление субстрата, осуществляемое иммуноглобулинами класса G в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  (рис. 34Б).



**Рис. 34.** Зависимость пероксидазной (ПА, А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОПА, Б) активностей диализованных препаратов IgG (33 нМ) в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $MnCl_2$  и  $ZnCl_2$ . Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $Me^{2+}$  не превышала 5–10%.

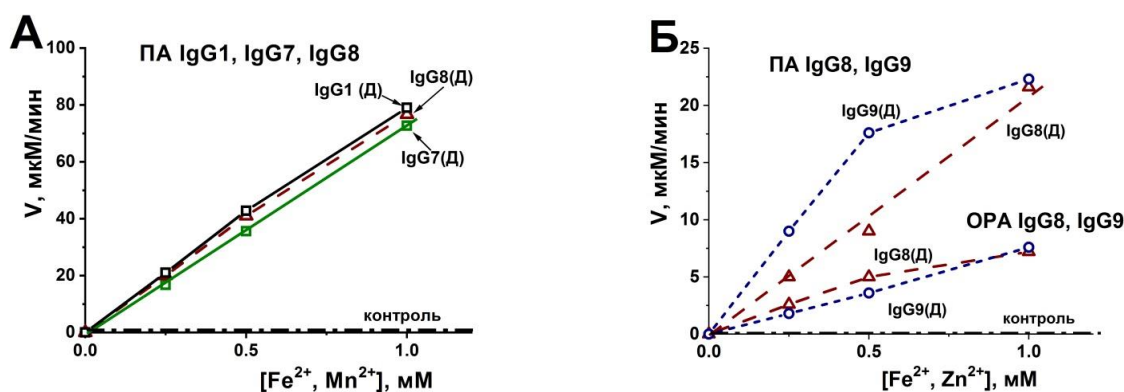
Добавление в реакционную смесь, содержащую недиализованное антитело, ионов  $Fe^{2+}$  в комбинации с ионами  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  даже в относительно низких концентрациях ( $< 1$  мМ), приводило к выпадению компонентов реакционной смеси в осадок. В то же время, в случае проведения реакций с диализованными препаратами IgG, не содержащими эндогенных ионов металлов, осадок не формировался. Это может являться следствием низкой растворимости комплекса субстрата в присутствии данных ионов металлов с антителами, содержащими эндогенные ионы. Подавление увеличения пероксидазной активности диализованных препаратов IgG1 и IgG8 при низких концентрациях  $Fe^{2+}$  (до 0,5 мМ; рис. 25А), исчезало в присутствии пары  $Fe^{2+} + Mn^{2+}$ . Например, активность препаратов IgG8 и IgG1 в случае 0,5 мМ  $Fe^{2+} + Mn^{2+}$  ( $V = 40$  и 42 мкМ/мин соответственно) (рис. 35А), была в 6,2 – 8,1 раз выше активности в присутствии только ионов  $Fe^{2+}$  ( $V = 6,5$  и 5,2 мкМ/мин) (рис. 25А), в то время как в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  в концентрациях менее 3 мМ диализованные IgG оставались полностью неактивны (рис. 24А).

Пероксидазная активность диализованных препаратов IgG в присутствии 0,5 мМ  $Fe^{2+} + Zn^{2+}$  (рис. 35Б) для IgG8 была приблизительно в 1,4 раза выше ( $V = 9,1$  мкМ/мин), а

для IgG9 в 3 раза выше ( $V=17,6$  мкМ/мин) активности в присутствии только ионов  $Fe^{2+}$  ( $V= 6,5$  и  $5,9$  мкМ/мин соответственно) (рис. 25А). В то время как ионы  $Zn^{2+}$  или  $Fe^{2+}$  по отдельности не влияли на пероксид-независимую оксидоредуктазную активность диализованных иммуноглобулинов (рис. 27Б и рис.26Б), а вместе эти металлы эффективно активировали окисление DAB (рис. 35Б).

Таким образом, вероятно, ионы  $Fe^{2+}$  и их комбинации с другими ионами металлов важны для пероксидазного и пероксид-независимого оксидоредуктазного окисления субстрата антителами.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что только три вида ионов металлов  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  активировали оксидоредуктазные активности диализованных IgG. В то же время, их влияние на эти активности сильно отличалось. При относительно низких концентрациях ионов металлов ( $\leq 1$  мМ), пероксидазная активность диализованных IgG наблюдалась только в присутствии ионов  $Fe^{2+}$ , а оксидоредуктазная только в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ .



**Рис. 35.** Зависимость пероксидазной (ПА) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (ОПА) активностей препаратов IgG в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации эквимольной смеси  $FeCl_2$  и  $MnCl_2$  (А) и  $FeCl_2$  и  $ZnCl_2$  (Б). Кривые диализованных препаратов IgG (33 нМ) отмечены как Д. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций  $Me^{2+}$  не превышала 5–10%.

Ионы меди в высоких концентрациях ( $> 1,5$ – $2$  мМ) значительно увеличивали как пероксидазную, так и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности абзимов, в то время как  $Mn^{2+}$  слабо активировал пероксидазную активность даже при высоких концентрациях ( $> 4$  мМ). Таким образом, вероятно, ионы  $Fe^{2+}$  и их комбинации с другими ионами металлов важны для окисления DAB антителами.

Низкие концентрации ионов меди, железа и их комбинации с ионами марганца и цинка значительно увеличивали способность антител окислять субстрат в присутствии и в отсутствие перекиси водорода, в то время как ионы магния, кобальта и никеля выступали в качестве слабых активаторов медь-зависимого окисления DAB.



Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  ингибировали окисление субстрата в присутствии ионов меди, возможно, вследствие конкуренции с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  за связывание с молекулами антител или уменьшения окислительного потенциала меди в составе комплекса  $\text{IgG}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{Ca}^{2+}$ , или стабилизации менее активной конформации молекул иммуноглобулинов путем взаимодействия с их переменным или константным доменом.

Данные, полученные с использованием диализованных препаратов IgG, позволяют предположить, что некоторые специфические подфракции (моноклональные иммуноглобулины) среди общего пула поликлональных антител, могут катализировать реакции окисления только в присутствии, по крайней мере, двух одинаковых или разных ионов металлов. Некоторые из этих ионов металлов, такие как  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , не могут принимать непосредственное участие в реакциях окисления, но могут выступать в качестве вспомогательных кофакторов каталитических антител или способствовать формированию каталитически более активной молекулы вследствие взаимодействия с переменным или константным доменами антител, отдаленными от активного центра. Таким образом, в качестве второго иона может выступать металл, как с переменной, так и с постоянной степенью окисления, то есть оба типа вспомогательных ионов могут активировать иммуноглобулины класса G.

Активности диализованных иммуноглобулинов в присутствии эквимольных смесей ионных пар  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  выше активностей, наблюдаемых в присутствии только какого-либо одного из ионов данных металлов, а также выше сумм относительных активностей антител при добавлении  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  или  $\text{ZnCl}_2$ , а ее зависимость от концентрации ионных пар не является двухфазной. Таким образом, можно сделать вывод, что ионные пары  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  являются оптимальными для катализа антителами пероксидазного и пероксид-независимого оксидоредуктазного окисления субстрата. Более вероятной причиной активации абзимов двумя ионами металлов с переменной степенью окисления может являться либо участие второго иона металла в реакции в качестве электрофильного кофактора, либо его непосредственное вовлечение в процесс окисления субстрата. В данной работе согласно принятым в энзимологии классическим подходам впервые проведен детальный анализ зависимости активности абзимов с окислительно-восстановительными функциями от сочетания двух различных ионов металлов. Полученные данные свидетельствуют о том, что пул поликлональных антител крыс может содержать как абзимы, зависящие от одного типа ионов металлов, так и комбинации ионов разных металлов.

Многие искусственные абзимы характеризуются относительно низкими скоростями реакции: значения  $k_{\text{cat}}$  искусственных абзимов приблизительно в  $10^2$ – $10^6$  ниже  $k_{\text{cat}}$

соответствующих классических ферментов [148, 183]. В случае реакции окисления DAB пероксидазой хрена, значение  $k_{cat}$  оценено как  $1,1 \times 10^4 \text{ мин}^{-1}$  [17, 240]. Согласно полученным данным, значения кажущихся  $k_{cat}$  реакции пероксидазного и оксидоредуктазного окисления DAB при фиксированной концентрации субстрата (0,93 мМ) для девяти поликлональных недиализованных препаратов IgG крыс линии Wistar варьировали в диапазоне от 3,9 до  $134 \text{ мин}^{-1}$  (табл. 4). После добавления ионов  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{2+}$  к недиализованным или диализованным IgG, значения кажущихся  $k_{cat}$  увеличивались до  $0,6\text{--}1,8 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$ , для некоторых препаратов IgG в присутствии комбинаций двух ионов металлов до  $3\text{--}4 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$ . Если учесть тот факт, что хроматография иммуноглобулинов класса G крыс на Chelex-100 приводит к абсорбции небольших фракций молекул IgG, содержащих ионы металлов, к разделению антител на множество разных подфракций, обладающих различным сродством к хелатирующему сорбенту, и к увеличению уровня специфических пероксид-независимой оксидоредуктазной и пероксидазной активностей некоторых отдельных подфракций антител в 10–50 раз [239], можно предположить, что специфические пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности поликлональных IgG крыс Wistar на несколько порядков выше активностей многих известных природных абзимов.

#### **3.4.2. Анализ влияния ионов различных металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG крови здоровых доноров**

Для изучения влияния ионов металлов на пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности IgG человека, семь различных препаратов иммуноглобулинов класса G здоровых доноров (IgG-ЗД), подобно антителам крыс, диализовали против буфера, содержащего 0,1 М EDTA и 0,1 М EGTA, и определяли их относительные оксидоредуктазные активности в реакции окисления DAB. В работах [17, 239] показано, что после удаления эндогенных ионов металлов все препараты IgG крыс полностью теряют активность, которая впоследствии восстанавливается после добавления к препаратам антител экзогенных ионов  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Cu}^{2+}$ . В отличие от IgG крыс, IgG-ЗД не утрачивали полностью как пероксидазную, так и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности. Дополнительный диализ IgG-ЗД, уже диализованных против 0,3 М EDTA, так же не приводил к дополнительному уменьшению их активностей (табл. 5).

На следующем этапе работы проведен анализ содержания металлов в диализованных препаратах IgG здоровых доноров с помощью спектрального атомно-эмиссионного метода с возбуждением спектров в двухструйном дуговом плазматроне [242]. Согласно

полученным данным, диализованные препараты антител не содержали какие-либо ионы металлов, поэтому очевидно, что, в отличие от IgG крыс, всецело зависимых от ионов металлов, иммуноглобулины класса G человека обладают как металл-зависимой, так и металл-независимой оксидоредуктазными активностями.

После диализа относительная пероксидазная активность IgG-ЗД уменьшалась в зависимости от анализируемого препарата IgG от 1,2 до 11,2 раз, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная активность уменьшалась от 1,2 до 7,2 раз. Кроме того, соотношение металл-зависимой и металл-независимой пероксидазной и оксидоредуктазной активностей было индивидуальным и значительно отличалось для каждого из препаратов поликлональных антител (табл. 5).

**Таблица 5.** Относительные пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности индивидуальных препаратов IgG крови здоровых доноров до и после диализа антител против буфера, содержащего EDTA и EGTA

Номер препарата IgG	Относительная активность, %**			
	Пероксидазная активность IgG		Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность IgG	
	До диализа	После диализа	До диализа	После диализа
<b>IgG-1</b>	72,2	61,1	77,8	33,3
<b>IgG-2</b>	77,8	38,9	94,4	44,4
<b>IgG-3</b>	83,3	33,3	33,3	27,8
<b>IgG-4</b>	94,4	38,9	50,0	31,1
<b>IgG 5</b>	55,5	11,1	72,2	10,0
<b>IgG-6</b>	100**	8,9	12,2	8,9
<b>IgG-7</b>	77,8	7,8	15,6	7,8

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

\*\*За 100% принимали значение величины кажущейся  $k_{cat}$  для недиализованного препарата IgG6, обладавшего наибольшей активностью в реакции пероксидазного окисления DAB (0,93 мМ).

Отличие между пероксидазной активностью до и после диализа в 1,2 раза для препарата IgG1 и в 11,2 раза для препарата IgG6, может являться следствием того, что

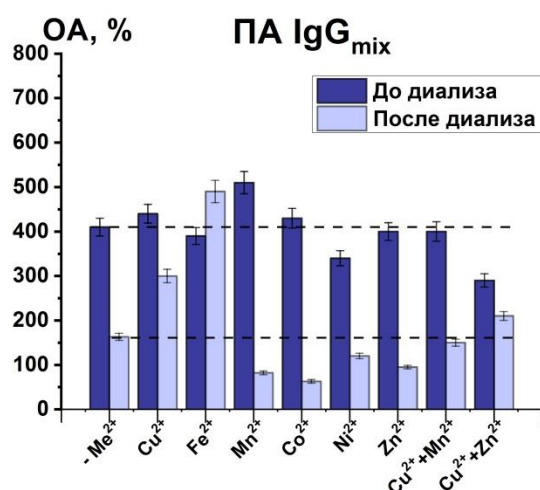
поликлональные иммуноглобулины класса G препарата 1 обладают главным образом металл-независимой пероксидазной активностью, в то время как антитела препарата 6, напротив, являются в основном металл-зависимыми. Подобная ситуация наблюдалась и в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности. Препарат поликлональных иммуноглобулинов IgG3 до диализа катализировал эту реакцию в 1,2 раза лучше, в то время как активность препарата IgG5 уменьшилась в 7,2 раза после удаления эндогенных ионов металлов.

Известно, что глутатионпероксидаза является селен-зависимым ферментом, и его активность не связана с ионами металлов, катализирующими восстановление различных пероксидов в присутствии глутатиона [107, 117]. Кроме того, с помощью замены в активном центре остатков серина на селеноцистеин получены моноклональные селен-содержащие каталитические антитела. Эти селен-содержащие абзимы обладали глутатионпероксидазной активностью и имитировали цитозольную форму глутатионпероксидазы [224, 225, 226]. Показано, что в организме человека присутствует как минимум 25 белков, содержащих в своем составе селен [262]. Принимая это во внимание, проведен анализ возможного содержания селена в лиофилизированном образце эквимольной смеси пяти электрофоретически гомогенных препаратов IgG-3Д ( $IgG_{mix}$ ) с помощью рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения [243]. Согласно полученным данным, препарат  $IgG_{mix}$  содержал селен в количестве  $0,4 \pm 0,1$  мкг селена/1 г IgG. Если предположить, что каждая молекула иммуноглобулина класса G содержит только один атом селена (или одну молекулу селеноцистеина), то можно прийти к выводу, что 0,075% всех молекул IgG являются селен-содержащими иммуноглобулинами. Нельзя исключить, что молекулы IgG-3Д, содержащие селен, могут катализировать металл-независимое окисление DAB. Следовательно, возможно, что металл-независимые субфракции иммуноглобулинов класса G человека, способные окислять DAB в отсутствие пероксида водорода, и, проявляющие оксидоредуктазную активность, могут быть рассмотрены в качестве селен-содержащих абзимов – аналогов глутатионпероксидазы. Однако необходимо отметить, что IgG человека могут эффективно катализировать окисление DAB как в отсутствие глутатиона, так и в отсутствие пероксида водорода, что является невозможным для глутатионпероксидазы.

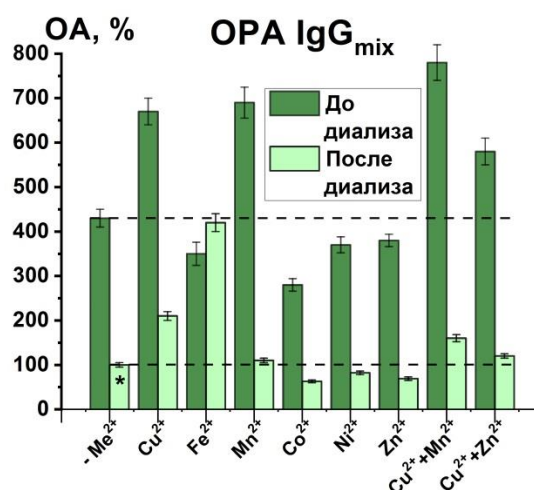
### 3.4.2.1. Влияние ионов двухвалентных металлов на оксидоредуктазные активности IgG крови здоровых доноров

Для анализа зависимости пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG-3Д от различных ионов металлов, использовали эквимольную смесь (IgG<sub>mix</sub>) (667 нМ) десяти индивидуальных препаратов IgG, выделенных из сыворотки 10 здоровых доноров. На **рис. 36** продемонстрирована относительная активность препарата IgG<sub>mix</sub>, как недиализованного, так и диализованного против EDTA + EGTA в присутствии различных ионов двухвалентных металлов при фиксированной концентрации металла (1 мМ). Относительную пероксид-независимую оксидоредуктазную активность диализованной эквимольной смеси препаратов IgG-3Д в отсутствие экзогенных ионов металлов принимали за 100%.

**А**



**Б**



**Рис. 36.** Относительные пероксидазная активность (ПА) (**А**) и пероксид-независимая оксидоредуктазная активность (ОПА) (**Б**) диализованного против буфера, содержащего EDTA и EGTA, и недиализованного препарата IgG<sub>mix</sub> в присутствии ионов двухвалентных металлов (1 мМ). \*Активность (%) диализованного препарата IgG<sub>mix</sub> в реакции оксидоредуктазного окисления DAB (0,93 мМ) в отсутствие экзогенных ионов металлов принимали за 100%. Пунктирными линиями показан уровень активностей диализованного и недиализованного перпаратов IgG в отсутствие ионов металлов.

Согласно полученным данным, пероксидазная активность диализованной эквимольной смеси IgG-3Д (ОА=160%) приблизительно в 1,6 раза выше ее пероксид-независимой оксидоредуктазной активности. Относительная пероксидазная активность диализованного препарата IgG<sub>mix</sub> возростала после добавления экзогенных ионов металлов в 1,8 раз (Cu<sup>2+</sup>) < 3,0 раза (Fe<sup>2+</sup>), в то время как ионы Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> не только не увеличивали эту активность, но и ингибировали ее, приводя к ее уменьшению в 1,4–2,6 раза. Относительные активности в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности диализованной IgG<sub>mix</sub>, не содержащей эндогенных ионов металлов, после добавления экзогенных ионов металлов увеличивались в 2,1 раза (Cu<sup>2+</sup>) < 4,2 раза (Fe<sup>2+</sup>), в

то время как присутствие ионов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  приводило к уменьшению данной активности от 1,2 до 1,6 раз (**рис. 36**).

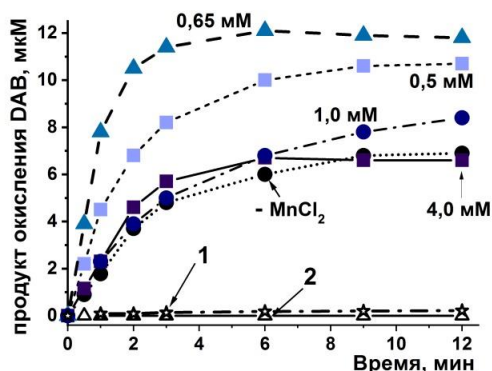
Ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  увеличивали в 1,5–1,6 раз оксидоредуктазную активность недиализованного суммарного препарата антител, содержащего эндогенные ионы металлов, в то время как добавление всех остальных металлов, включая железо, приводило к уменьшению его активности в 1,1–1,5 раза (**рис. 36**).

Таким образом, только два иона металла самостоятельно выступали в качестве активаторов пероксидазной активности диализованного препарата  $\text{IgG}_{\text{mix}}$ :  $\text{Cu}^{2+}$  (в 1,8 раз) <  $\text{Fe}^{2+}$  (в 3,0 раза), в то время как другие металлы, включая  $\text{Mn}^{2+}$ , выступали в качестве ингибиторов этой активности. С другой стороны, напротив,  $\text{Mn}^{2+}$  являлся лучшим активатором (в 1,3 раза) недиализованного препарата  $\text{IgG}_{\text{mix}}$ .

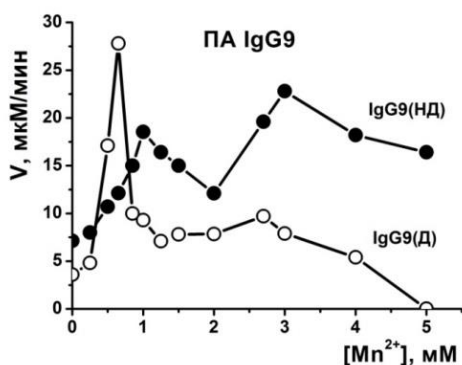
Как показано ранее, ионы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , и  $\text{Mn}^{2+}$  играют основную роль в случае оксидоредуктазных активностей поликлональных  $\text{IgG}$  крыс линии Wistar, чьи активности являются полностью зависимыми от ионов металлов. Подобная ситуация наблюдалась и для металл-зависимой подфракции (моноклональных антител)  $\text{IgG}$  здоровых доноров. При использовании комбинаций  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  активность  $\text{IgG}$  крыс значительно увеличивалась по сравнению с активностью, наблюдаемой в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ , взятых по отдельности, однако, в случае  $\text{IgG}$  человека, в присутствии пар ионов  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$  наблюдалось увеличение только пероксид-независимой оксидоредуктазной активности недиализованного и диализованного препарата  $\text{IgG}_{\text{mix}}$ . На пероксидазную активность абзимов эта пара ионов значительного эффекта не оказывала (**рис. 36**). Полученные данные свидетельствуют о сложных зависимостях относительных пероксидазной и оксидоредуктазной активностей от различных ионов металлов, используемых как отдельно, так и в различных комбинациях.

Так как препараты  $\text{IgG}$ , выделенные из сыворотки крови разных крыс, проявляли индивидуальные зависимости их активностей от различных ионов металлов, несколько препаратов  $\text{IgG}$  здоровых доноров проанализированы более детально. На **рис. 37** продемонстрированы типичные кинетические кривые  $\text{IgG}$ -зависимой пероксидазной активности недиализованного препарата  $\text{IgG8}$  при различных концентрациях  $\text{MnCl}_2$ .

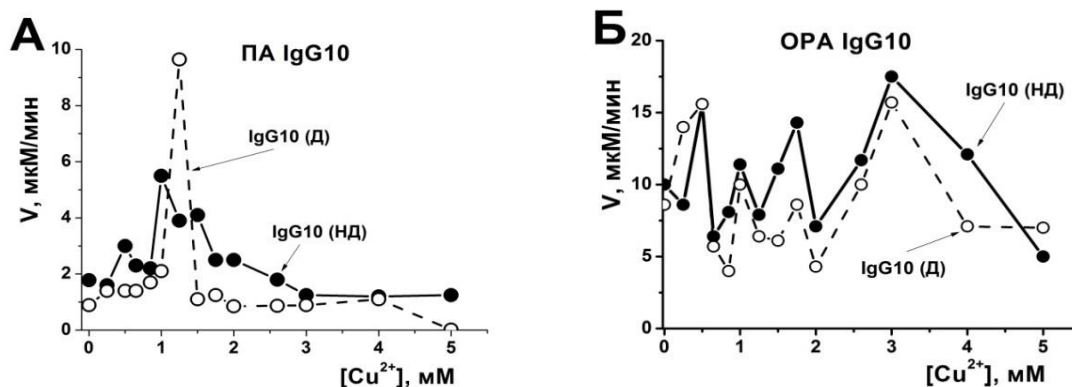
Из представленных данных видно, что в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  происходит рост активности антител, с достижением максимума при 0,65 мМ  $\text{MnCl}_2$ . Дальнейшее увеличение концентрации ионов  $\text{Mn}^{2+}$  приводило к уменьшению пероксидазной активности препарата  $\text{IgG8}$ . На **рис. 38, 39** представлены изменения пероксидазной активности диализованных и недиализованных препаратов  $\text{IgG9}$  и  $\text{IgG10}$  с увеличением концентрации  $\text{MnCl}_2$  и  $\text{CuCl}_2$ .



**Рис. 37.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта реакции пероксидазного окисления DAB (0,93 мМ) недиализованным препаратом IgG-3Д (40 нМ) в присутствии MnCl<sub>2</sub> в различных концентрациях. На кривых 1 и 2 представлен контроль: окисление DAB в отсутствие антител и ионов металлов (1) и в присутствии только 4,0 мМ MnCl<sub>2</sub> (2). Средняя ошибка определения количества образовавшегося продукта реакции в каждый момент времени не превышала 7–15%.



**Рис. 38.** Зависимость пероксидазной активности препарата IgG9 в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации MnCl<sub>2</sub>. Кривые, соответствующие диализованному и недиализованному препарату IgG9 (35 нМ), отмечены как Д и НД, соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций Mn<sup>2+</sup> не превышала 5–10%.



**Рис. 39.** Зависимость пероксидазной (А) и пероксид-независимой оксидоредуктазной (Б) активностей препарата IgG10 в реакции окисления DAB (0,93 мМ) от концентрации CuCl<sub>2</sub>. Кривые, диализованного и недиализованного препарата IgG10 (35 нМ) отмечены как Д и НД соответственно. Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из концентраций Cu<sup>2+</sup> не превышала 5–10%.

Подобные сложные зависимости увеличения пероксидазной и оксидоредуктазной активностей с одним или несколькими выраженными максимумами, наблюдались при возрастании концентраций  $MnCl_2$  и  $CuCl_2$  для пяти проанализированных индивидуальных препаратов поликлональных иммуноглобулинов класса G человека.

Как видно из **рис. 39**, зависимости скорости протекания реакции от концентрации ионов меди для диализованного и недиализованного препаратов отличались. Это можно объяснить следующим образом: удельные активности недиализованных IgG в присутствии экзогенных ионов металлов могут рассматриваться в виде суммы активности металл-независимой фракции IgG, фракций IgG, связанных с различными внутренними ионами металлов, и увеличения активности металл-зависимых фракций IgG, свободных от эндогенных металлов, вследствие их взаимодействия с экзогенными ионами  $Cu^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ .

Как уже упомянуто выше, иммуноглобулины класса G крыс с пероксидазной и оксидоредуктазной активностями могут в большей степени активироваться в присутствии различных комбинаций ионов металлов:  $Cu^{2+} + Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+} + Zn^{2+}$ , поэтому нельзя исключить, что подобно иммуноглобулинам G крыс, некоторые подфракции IgG в составе недиализованных поликлональных абзимов человека могут вносить вклад в суммарную активность недиализованных IgG, вследствие их активации комбинациями  $Cu^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  с другими, изначально с ними связанными, ионами металлов:  $Fe \geq Ca > Cu \geq Zn \geq Mg \geq Mn \geq Pb \geq Co \geq Ni$  [255].

Полученные данные свидетельствуют об индивидуальном репертуаре IgG с пероксидазной и с оксидоредуктазной активностями, присутствующими в крови каждого здорового донора и чрезвычайном разнообразии этих абзимов по их сродству к различным ионам металлов.

#### **3.4.2.2. Хроматография антител на сорбентах, хелатирующих ионы металлов**

На следующем этапе работы с помощью хроматографии антител на сорбенте Chelex-100, хелатирующем ионы металлов, проведено исследование гетерогенности абзимов с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями по их сродству к ионам различных металлов.

Для того чтобы отделить поликлональные IgG-3Д, связанные с ионами металлов, от антител, не содержащих ионы, на колонку Chelex-100, свободную от металлов и уравновешенную водой, наносили эквимольную смесь препаратов поликлональных иммуноглобулинов класса G ( $IgG_{mix}$ ), выделенных из сыворотки крови 10 здоровых доноров. Далее колонку последовательно промывали 10 мМ буфером Трис-HCl,

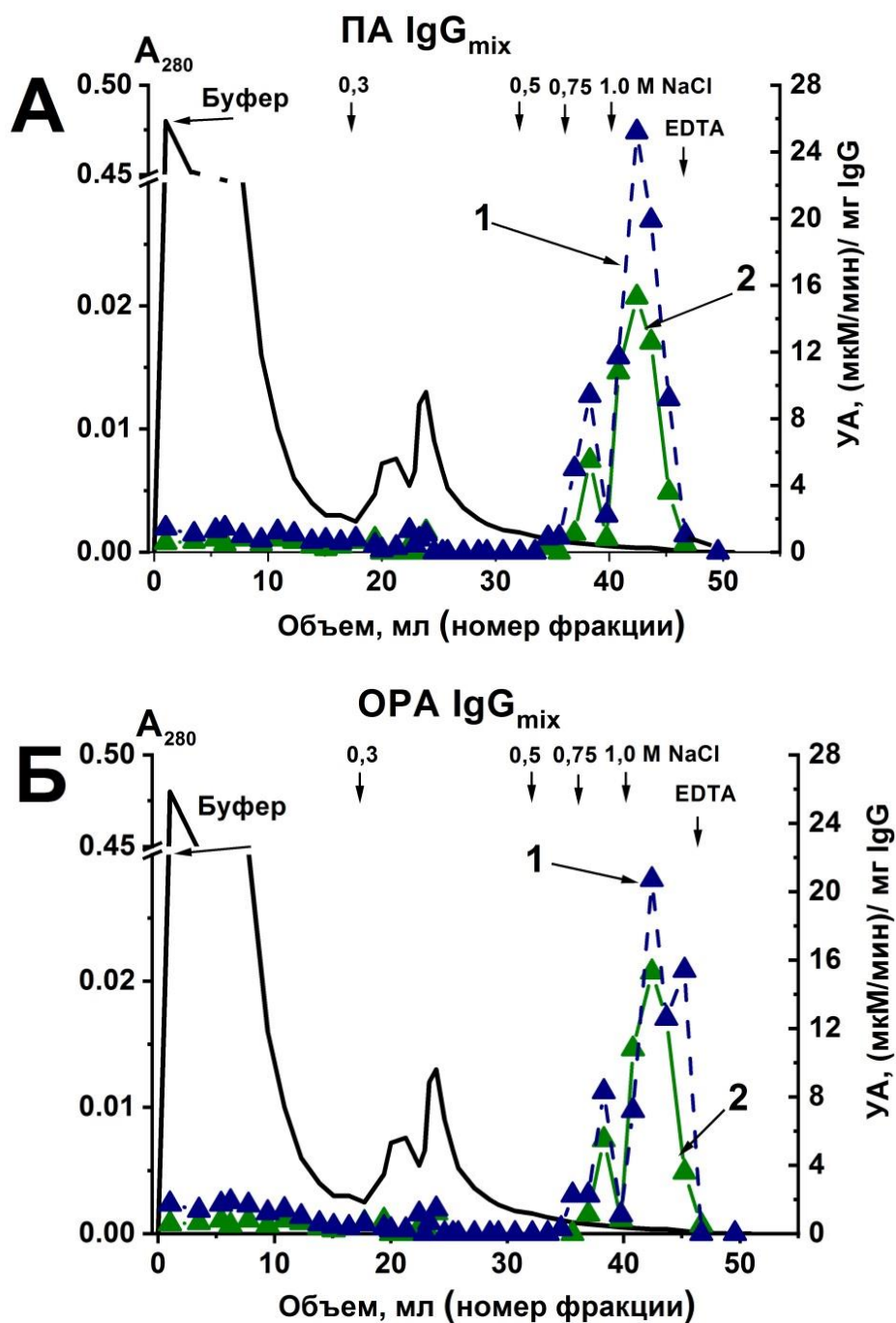


содержащим NaCl в различных концентрациях (0–1,0 М), и, в заключение, этим же буфером, содержащим 100 мМ EDTA. Аликвоты полученных фракций IgG<sub>mix</sub> использовали для определения их удельных пероксидазной или пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей, в реакции окисления DAB (0,93 мМ) в присутствии и в отсутствие экзогенных ионов металлов (**рис 40**). Удельные активности рассчитывали по формуле  $УА = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (мг)}$ . IgG первого пика (фракции 1–16), полученные в результате нанесения и последующей промывки сорбента буфером, содержащим NaCl в низких концентрациях (менее 0,3 М) и соответственно не имеющие сродства к хелатирующему сорбенту (90,9% от общего количества белка), обладали в отсутствие и в присутствии экзогенных ионов  $\text{Cu}^{2+}$  95,1%–95,7% от суммарной пероксидазной (**рис. 40А**) и 95,8%–96,8% от суммарной пероксид-независимой оксидоредуктазной активности соответственно (**рис 40Б**).

Приблизительно 5,1% от суммарного количества белка после адсорбции на сорбенте Chelex–100 элюировалось 0,3–1,0 М NaCl в виде нескольких небольших пиков (фракции 16–30). Эти фракции так же обладали каталитической активностью в реакции оксидоредуктазного окисления DAB в отсутствие (4,2%–4,9%) и в присутствии (4,6%–5,4%) экзогенных ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Небольшая часть от суммарного препарата IgG<sub>mix</sub>, приблизительно 0,6%, элюированная 0,5–1,0 М NaCl, обладала высоким сродством к Chelex-100 и ее удельные оксидоредуктазные активности были от 20 до 50 раз выше активностей фракций, элюированных при нанесении и последующей элюции 0,3 М NaCl. Кроме того, небольшие фракции этих поликлональных иммуноглобулинов класса G демонстрировали высокие активности в присутствии и в отсутствие экзогенных ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 40**).

Известно, что часть антител теряют эндогенные ионы металлов в процессе их выделения. Для того, чтобы оценить относительное количество IgG в сыворотке крови человека, обладающих пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, и, в то же время, не содержащих ионы  $\text{Me}^{2+}$  или утрачивающих их во время очистки, IgG-ЗД, не обладающие сродством к Chelex-100 (фракции 1–16), повторно нанесли на этот сорбент, предварительно заряженный ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 41**).

Приблизительно 37,6% от суммарного количества белка связалось с  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100, в то время как 62,4% антител элюировалось при нанесении. Подобно иммуноглобулинам класса G, не имеющим сродства к Chelex-100, не заряженному ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 40**), IgG, не обладающие сродством к  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100, демонстрировали детектируемые пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности в присутствии или в отсутствие экзогенных ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (**рис. 41А и 41Б**).



**Рис. 40.** Хроматография эквимольной смеси 10 препаратов IgG здоровых доноров на сорбенте Chelex-100: (—) – оптическое поглощение элюата при 280 нм. Удельная пероксидазная активность фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  (А); удельная пероксид-независимая оксидоредуктазная активность фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  (Б). Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из фракций IgGmix не превышала 5–10%.

Интересно, что фракции IgG, элюированные с  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100 с помощью 0,3 М NaCl, 12,9% от суммарного препарата IgG, демонстрировали низкую удельную активность, подобно фракциям, элюированным этой же солью с этого же сорбента, не заряженного ионами меди. Основные фракции, имеющие высокое сродство к  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100 (элюируемые с сорбента с помощью 0,5–1,0 М NaCl; 23,8% от суммарного белка) в

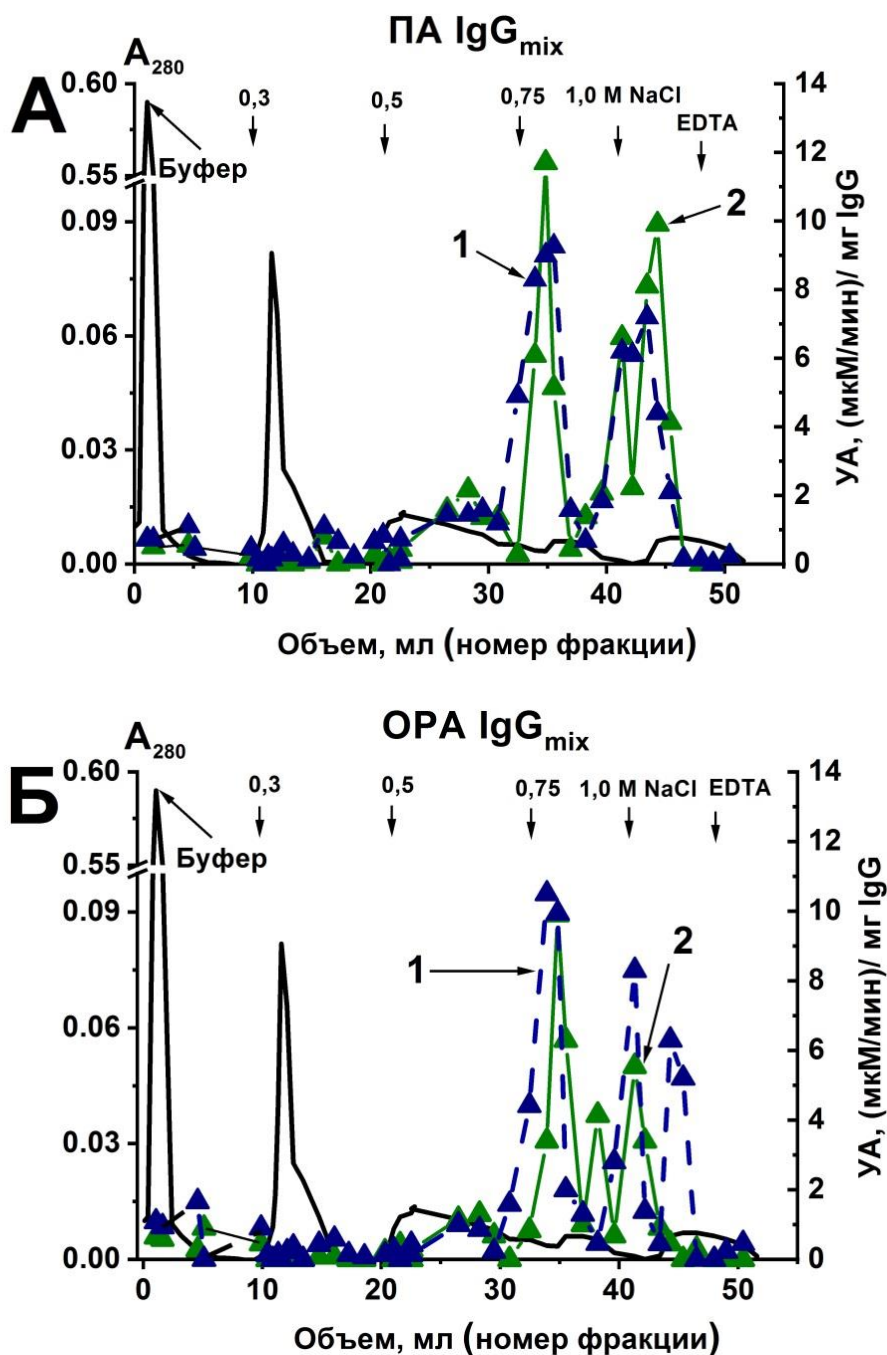
отсутствие экзогенных ионов металлов демонстрировали низкие оксидоредуктазные активности по сравнению с активностями в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$ , их значения зависели от анализируемой фракции. Максимальные удельные активности фракций с пероксидазной активностью в отсутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (15,0 мкМ/мин/мг IgG) и в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (25,2 мкМ/мин/мг IgG) после хроматографии на Chelex-100 (**рис. 40**) были в 1,9–3,5 раза выше активностей, наблюдаемых после хроматографии на  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100 сорбенте, которые составили (8,1 (мкМ/мин)/мг IgG) в отсутствие и (7,2 (мкМ/мин)/мг IgG) в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  соответственно. Уменьшение максимальных удельных активностей до 2,5 раз наблюдалось и в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности при нанесении белка, элюированного с сорбента Chelex-100, на сорбент с  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100. Данное явление может быть следствием отбора на незаряженном хелатирующем сорбенте подфракций IgG с максимальным сродством к различным ионам металлов, обладающих максимальной пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями.

Распределение каталитических активностей IgG-3Д по хроматографическим профилям, свидетельствует об исключительной гетерогенности сродства абзимов с оксидоредуктазными активностями к ионам  $\text{Cu}^{2+}$ , как связанным с антителами, так и экзогенным, что коррелирует с очень сложными зависимостями этих активностей, от концентрации ионов металлов, демонстрирующими несколько выраженных максимумов, при увеличении концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  (**рис. 38, 39**).

Как можно увидеть на **рис. 41**, полного разделения иммуноглобулинов G здоровых доноров с пероксид-независимой оксидоредуктазной и пероксидазной активностями не наблюдается, однако профили удельных пероксид-независимой оксидоредуктазной и пероксидазной активностей в присутствии и в отсутствие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  полностью не совпадают. Например, в области, соответствующей 12,5–15,5 мл элюата (**рис. 41А**), пероксидазная активность полностью отсутствует, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная активность регистрируется, а фракция, соответствующая 38 мл, обладает высокой независимой от пероксида водорода оксидоредуктазной (**рис. 41Б**), и, в то же время, низкой пероксидазной (**рис. 41А**) активностью.

Профили пероксидазной активности, зависящей от ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , в точности не повторяют профиль медь-независимой пероксидазной активности. Подобная ситуация наблюдается и в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности (**рис. 41А, Б**). Например, пероксидазная  $\text{Cu}^{2+}$ -независимая активность нескольких фракций (соответствующих объему элюата: 17, 32, 37 и 42 мл), была значительно ниже  $\text{Cu}^{2+}$ -зависимой активности (**рис. 41А**). В то же время, IgG фракций, соответствующих объему

элюата: 4,5, 31, 44 и 46 мл, были практически неактивны при  $\text{Cu}^{2+}$ -независимом окислении DAB, но при этом обладали низкой ( $\text{УА} = 1,51,7$  мкМ/мин/мг IgG) или высокой ( $\text{УА} = 5,3$  мкМ/мин/мг IgG и  $6,5$  мкМ/мин/мг IgG) пероксид-независимой оксидоредуктазной активностью в присутствии ионов металлов. Для фракции, соответствовавшей 38 мл, наблюдалась обратная ситуация (рис. 41Б).



**Рис 41.** Хроматография IgG эквимольярной смеси 10 препаратов IgG, не имеющих сродства к сорбенту Chelex-100, на сорбенте  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100: (–) – оптическое поглощение элюата при 280 нм. Удельная пероксидазная активность фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  (А); удельная пероксид-независимая оксидоредуктазная активность фракций в присутствии (1) и в отсутствие (2) 2 мМ  $\text{CuCl}_2$  (Б). Средняя ошибка определения начальной скорости реакции в двух экспериментах для каждой из фракций IgGmix не превышала 5–10%.

Так как оксидоредуктазные активности некоторых фракций очень сильно отличаются в присутствии и в отсутствие ионов меди, нельзя исключить, что некоторые подфракции моноклональных IgG в общем пуле поликлональных антител могут обладать только пероксидазной, а другие только пероксид-независимой оксидоредуктазной активностью, зависимой или независимой от ионов металла. Кроме того, возможно, что некоторые подфракции IgG человека, подобно пероксидазе хрена и поликлональным IgG крыс [17, 239] обладают обеими активностями.

Можно предположить, что фракции поликлональных IgG, не содержащие ионы металлов (например, фракции 1–16; **рис. 40**), взаимодействующие с  $\text{Cu}^{2+}$ -Chelex-100 (~ 37,6%, **рис. 40**) представлены не только абзимами с оксидоредуктазными активностями, но и множеством других иммуноглобулинов класса G, способных взаимодействовать с различными ионами металлов с низким средством, но, при этом, не катализирующих окислительные реакции.

Определены значения  $K_m$ , и  $k_{cat}$ , характеризующих окисление DAB, для фракций, полученных в результате разделения  $\text{IgG}_{mix}$  на сорбенте Chelex-100, соответствующих 24 и 43 мл (**рис. 40**). Все полученные данные суммированы в **таблице 6**.

**Таблица 6.** Величины  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующие окисление DAB в присутствии и в отсутствие 5 мМ  $\text{CuCl}_2$  фракциями № 24 и № 43 после разделения  $\text{IgG}_{mix}$  на сорбенте Chelex-100 (**рис. 40**)

Условия	Фракция №24		Фракция №43	
	$K_m$ (М)**	$k_{cat}$ (мин <sup>-1</sup> )**	$K_m$ (М)	$k_{cat}$ (мин <sup>-1</sup> )
<b>Пероксидазная активность</b>				
В отсутствие $\text{Cu}^{2+}$	$(8,5 \pm 1,2) \times 10^{-4}*$	$(3,3 \pm 0,4) \times 10^2$	$(4,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^3$
+ 5 мМ $\text{Cu}^{2+}$	$(7,2 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^2$	$(3,6 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$(2,8 \pm 0,4) \times 10^3$
<b>Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность</b>				
В отсутствие $\text{Cu}^{2+}$	Нет активности	Нет активности	$(8,0 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^3$
+ 5 мМ $\text{Cu}^{2+}$	$(7,5 \pm 1,1) \times 10^{-4}$	$(4,1 \pm 0,6) \times 10^2$	$(5,8 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^3$

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины  $K_m$  и  $k_{cat}$  оценивали с помощью двойных обратных координат Лайнуивера–Берка. Ошибка определения величин не превышала 10–20%.

Показано, что значения  $K_m$  при окислении DAB близки с учетом погрешности для фракции IgG-3Д, элюированной 0,3 М NaCl (фракция 24) и фракции, элюированной 1 М NaCl (фракция 43). В то же время, значения  $k_{cat}$  пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной реакции, катализируемой IgG-3Д, относящимися к фракции 43 (рис. 40), были в 6–10 раз выше этих показателей для фракции 24 (табл. 6). Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе хроматографий, происходит специфическое разделение отдельных фракций антител, имеющих различное сродство к сорбентам, и эти фракции отличаются по эффективности окисления DAB.

Согласно работе [239], значения  $k_{cat}$   $(2-11) \times 10^4$  мин<sup>-1</sup>, характеризующие пероксидазную активность абзимов некоторых подфракций, полученных в результате аффинной хроматографии IgG крыс линии Wistar на сорбенте Chelex-100, заряженном и не заряженном ионами Cu<sup>2+</sup>, были выше в 2–11 раз соответствующей активности пероксидазы хрена ( $1,1 \times 10^4$  мин<sup>-1</sup>).

В случае IgG человека наиболее активные фракции эквимольной смеси препаратов поликлональных антител после хроматографии на Chelex-100 в случае пероксидазного окисления DAB в отсутствие и в присутствии ионов Cu<sup>2+</sup>, характеризовались значениями  $k_{cat}$   $(2,0-2,7) \times 10^3$  мин<sup>-1</sup> соответственно, (табл. 6), в 4,1–5,5 раз более низкими, чем для пероксидазы хрена. Значения  $k_{cat}$  для данных подфракций IgG при пероксид-независимом окислении DAB  $(1,9-2,8) \times 10^3$  мин<sup>-1</sup>, (табл. 6), были от 4 до 6 раз выше  $k_{cat}$  для пероксидазы хрена ( $4,5 \times 10^2$  мин<sup>-1</sup>) [17, 239]. В целом, металл-независимые и металл-зависимые пероксидазные активности различных препаратов поликлональных IgG человека были от 140 до 170 раз ниже соответствующей активности пероксидазы хрена.

Известно несколько причин, позволяющих предположить, что пероксидазная и независимая от пероксида водорода оксидоредуктазная активности иммуноглобулинов G человека значительно выше как наблюдаемых активностей препаратов IgG-3Д (табл. 5), так и разделенного на сорбенте Chelex-100 препарата IgG<sub>mix</sub> (табл. 6). Во-первых, при расчете специфических активностей анализируемых препаратов антител использовали их общую (суммарную) концентрацию. Кроме того, как показано ранее, выделение и очистка антител, проводимая в кислых условиях, приводит к значительной инактивации их каталитических активностей, восстановления которых удастся добиться лишь на 60%–80% от их первоначальной активности [11, 152].

Результаты последовательных хроматографий поликлональных IgG на сорбенте Chelex-100, заряженном и не заряженном ионами Cu<sup>2+</sup>, позволяют предположить, что в сыворотке крови человека может содержаться от около 42% иммуноглобулинов класса G, способных взаимодействовать с ионами меди. В то же время, эти Cu<sup>2+</sup>-зависимые

фракции, вероятно, содержат не только антитела с оксидоредуктазными активностями, но также и молекулы IgG, как обладающие другими активностями, так и их не имеющие. Например, фракции 26–33 (рис. 40), являясь практически неактивными в реакциях окисления DAB, обладают сродством к сорбенту. Следовательно, невозможно оценить вероятный вклад каталитически неактивных IgG в общее количество антител каждой фракции после аффинной хроматографии на заряженном и не заряженном ионами меди Chelex-100.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить существование в общем пуле поликлональных абзимов человека множества специфических моноклональных IgG с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, являющихся как металл-зависимыми, так и металл-независимыми, и обладающих разной степенью сродства к ионам металлов. Эти результаты соответствуют данным о чрезвычайной гетерогенности IgG крыс с оксидоредуктазными активностями [240, 241], а также общей картине чрезвычайного разнообразия поликлональных абзимов с различными каталитическими активностями в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными патологиями и в молоке человека [11, 26, 27, 164, 184, 186, 188]. В ряде работ проведена оценка возможного числа моноклональных антител с ДНКазной и протеазной активностями больных РС и СКВ [187, 188]. С помощью фагового дисплея показано, что поликлональные антитела крови таких больных могут содержать от одной до трех тысяч различных моноклональных абзимов с ДНКазной и протеазной активностями, которые очень сильно отличаются по большому числу самых разных характеристик. Они могут быть зависимыми и независимыми от ионов различных двухвалентных металлов, иметь разное сродство к гидролизуемым антигенам, катализировать реакции с разной скоростью, отличаться по оптимальным для катализа значениям pH среды (pH от 5 до 10). По-видимому, такая же ситуация имеет место в случае антител с окислительно-восстановительными функциями. Не исключено, что и таких моноклональных абзимов с самыми разными свойствами в общем пуле поликлональных антител может быть до нескольких тысяч.

### 3.5. Субстратная специфичность иммуноглобулинов класса G сыворотки крови здоровых доноров при окислении различных соединений

Анализ кинетических параметров катализируемых антителами реакций позволяет характеризовать функционирование абзимов и является важным для исследования возможной гетерогенности антител по сродству к различным субстратам. Пероксидазы и оксидоредуктазы растений и млекопитающих характеризуются широкой субстратной специфичностью и окисляют различные органические соединения, такие как ароматические амины, фенолы, нафтолы и катехоламины [74, 134, 135]. Для анализа субстратной специфичности иммуноглобулинов класса G здоровых доноров (IgG-ЗД) проведено исследование кинетических параметров, характеризующих окисление антителами ароматических соединений различной структуры: 3,3'-диаминобензидина (DAB), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты) (ABTS), *o*-фенилендиамина (OPD), гомованилиновой кислоты (HVA),  $\alpha$ -нафтола, гидрохинона и 3-амино-9-этилкарбазола (АЕС). Кроме того, известно, что пероксидазы млекопитающих способны окислять функционально активные органические субстраты, такие как, например, адреналин, ацетилсалициловую кислоту [136] и стероидные гормоны [137], поэтому в данной работе в качестве субстратов также использовали 5-аминосалициловую кислоту (5-AS) и адреналин (рис. 42).

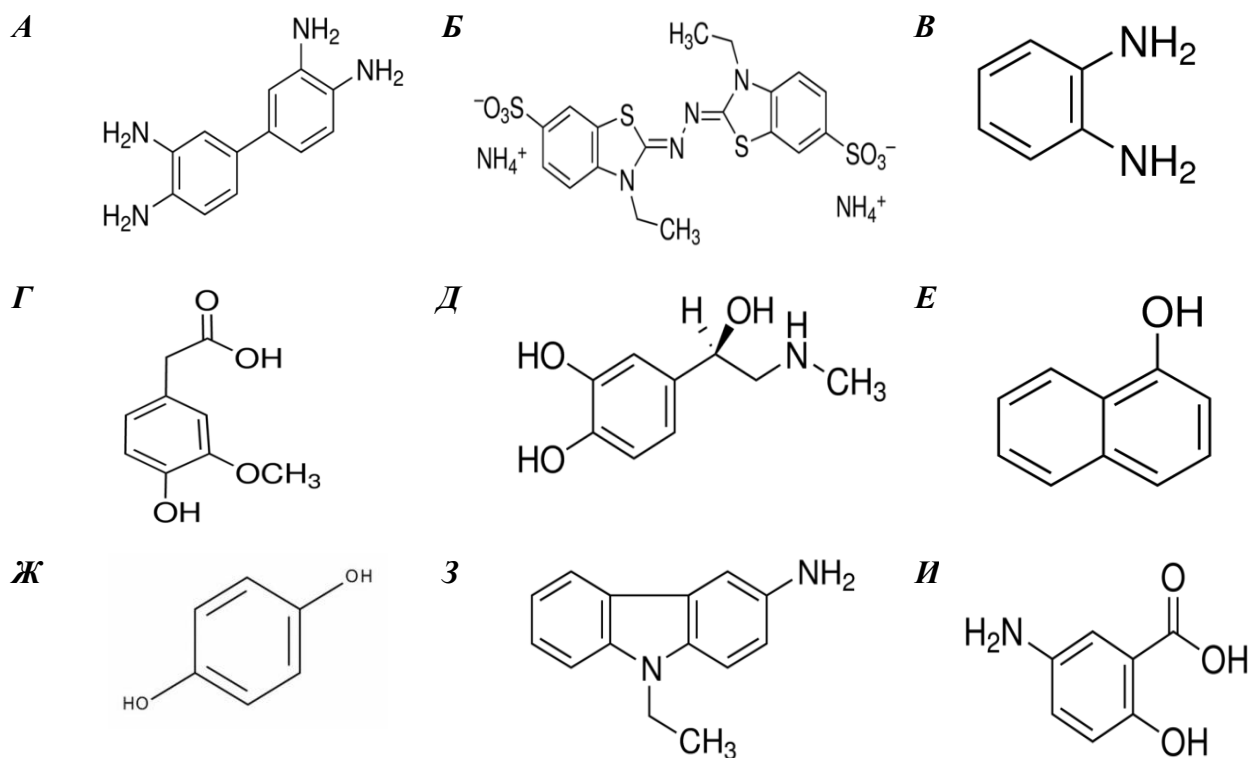
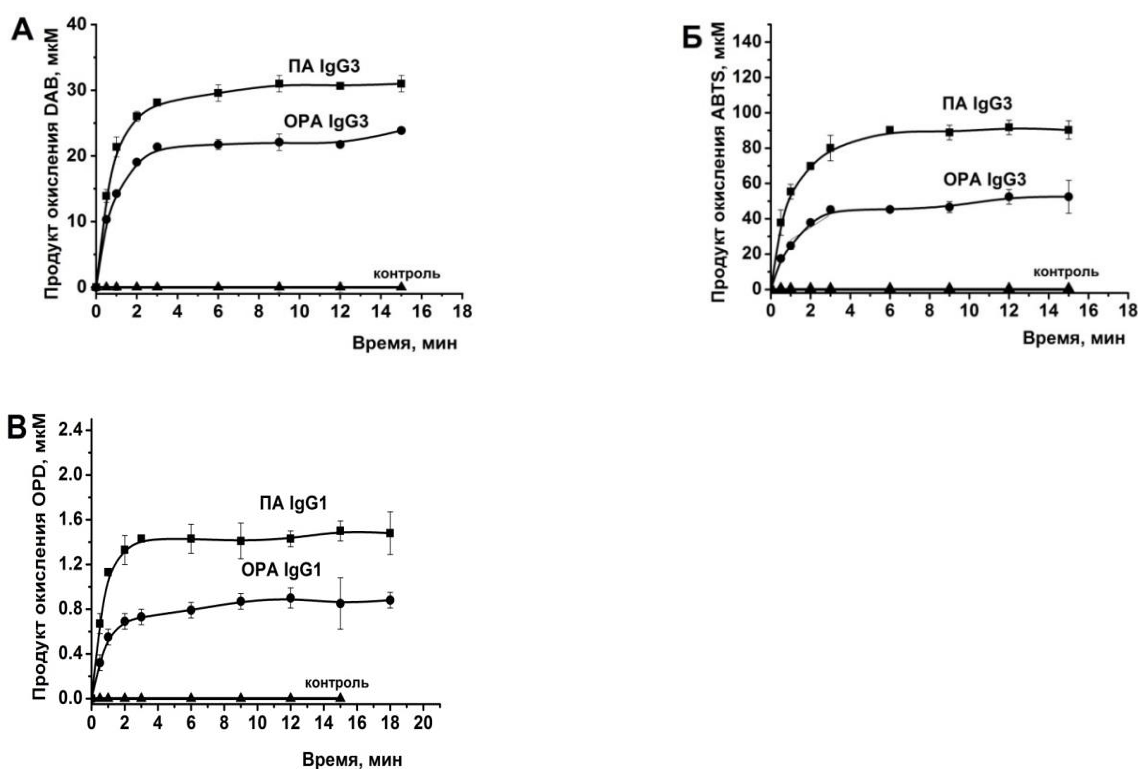


Рис. 42. Структурные формулы субстратов: DAB (А), ABTS (Б), OPD (В), HVA (Г), адреналин (Д),  $\alpha$ -нафтол (Е), гидрохинон (Ж), АЕС (З), 5-AS (И).



Для получения кинетических кривых окисления некоторых субстратов использовали максимально возможные концентрации веществ, исключающие образование осадка во время реакции. Это было необходимо, поскольку в некоторых случаях при высоких концентрациях антител возможно выпадение осадка в результате образования комплексов субстратов, продуктов их окисления и антител, что затрудняет регистрацию истинных показателей реакции. При оценке активности препаратов IgG-3Д для каждого из них подбирали такую концентрацию, при которой наблюдалась линейная зависимость скорости реакции окисления субстрата от концентрации антител.

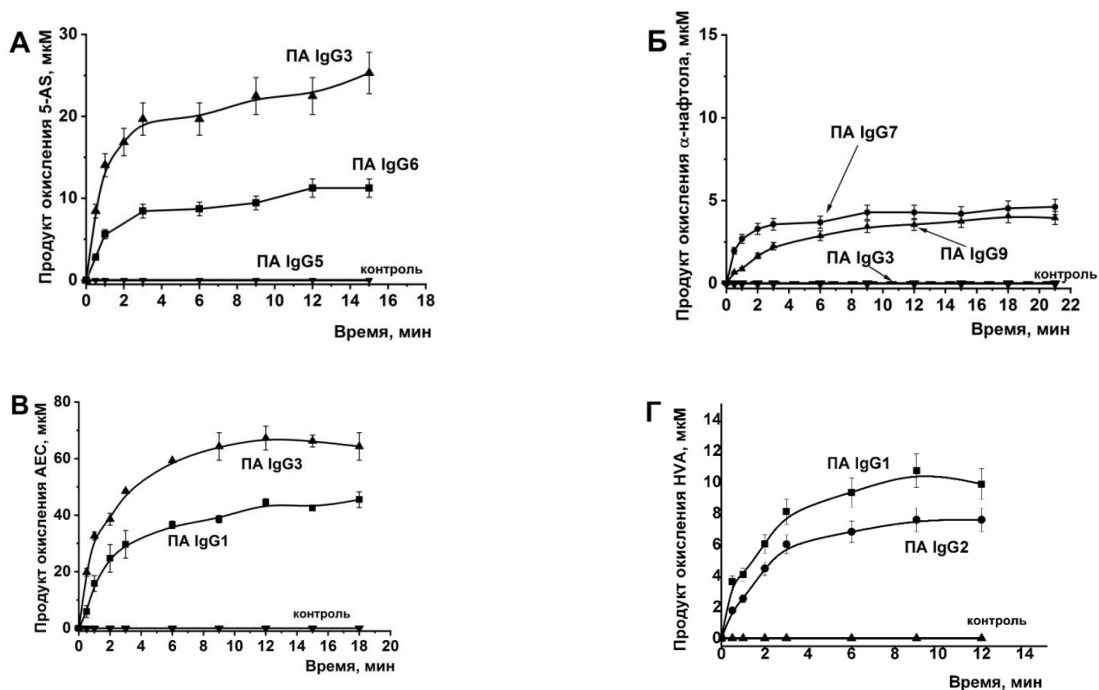
На **рис. 43** представлены примеры зависимостей накопления продукта от времени окисления DAB, ABTS, и OPD в реакциях, катализируемых различными индивидуальными препаратами IgG-3Д в присутствии и в отсутствие пероксида водорода.



**Рис. 43.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта пероксидазного и пероксид-независимого оксидоредуктазного окисления DAB (0,93 мМ) (**A**), ABTS (0,36 мМ) (**Б**) и OPD (0,19 мМ, **В**) препаратами здоровых доноров IgG1 (667 нМ) и IgG3 (667 нМ и 1,3 мкМ для DAB и ABTS соответственно).

На **рис. 44** представлены кинетические кривые окисления 5-AS,  $\alpha$ -нафтола, HVA и АЕС различными препаратами IgG-3Д в присутствии пероксида водорода. Согласно полученным данным, эффективность окисления антителами здоровых доноров различных субстратов в присутствии и в отсутствие пероксида водорода так же, как и в случае IgG крысы линии Wistar, очень сильно зависела, как от типа субстрата, так и от используемого препарата антител. Показано, что IgG в присутствии  $H_2O_2$  окисляли восемь различных

субстратов, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная активность IgG выявлена только при окислении трех различных соединений, таких, как DAB, ABTS и OPD. В работах [240, 241] показано, что IgG крыс линии Wistar неактивны в окислении адреналина, препараты IgG-3Д также не окисляли данный субстрат, как в присутствии, так и в отсутствие пероксида водорода.



**Рис. 44.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта пероксидазного окисления 5-АС (0,38 мМ, **А**),  $\alpha$ -нафтола (0,07 мМ, **Б**), АЕС (0,19 мМ, **В**) и НВА (0,55 мМ, **Г**) препаратами здоровых доноров IgG1 (667 нМ и 6,7 мкМ для АЕС и НВА соответственно), IgG2 (6,7 мкМ), IgG3 (3,3 мкМ для 5-АС и 667 нМ для  $\alpha$ -нафтола и АЕС), IgG5 (3,3 мкМ), IgG6 (3,3 мкМ), IgG7 (667 нМ), IgG9 (667 нМ).

Определены значения кажущихся  $k_{cat}$  для всех препаратов иммуноглобулинов класса G здоровых доноров, характеризующие окисление восьми субстратов при их фиксированной концентрации (**Приложение табл. 1–6**). Соотношение пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей для девяти индивидуальных препаратов IgG-3Д в случае всех восьми субстратов отличалось. В отсутствие пероксида водорода ни один из препаратов антител не окислял гомованилиновую кислоту,  $\alpha$ -нафтол, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Кроме того, только два из девяти препаратов IgG-3Д, окисляли гидрохинон в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$ . Медианные значения кажущихся  $k_{cat}$  девяти препаратов IgG-3Д в присутствии пероксида водорода уменьшались в следующем порядке ( $мин^{-1}$ ): ABTS (76,5)  $\geq$  DAB (65,3) > АЕС (39,6) >  $\alpha$ -нафтол (5,3) > НВА (0,7)  $\geq$  OPD (0,65)  $\geq$  5-АС (0,2). В отсутствие пероксида водорода медианные значения кажущихся  $k_{cat}$  уменьшались в следующем порядке ( $мин^{-1}$ ): DAB (54,7)  $\geq$  ABTS (48,9) > OPD (0,21). Пять остальных соединений не являлись субстратами

абзимов с пероксид-независимой оксидоредуктазной активностью. Пероксидазная активность иммуноглобулинов класса G выше активности в отсутствие пероксида водорода для таких субстратов, как DAB, ABTS и OPD в 1,2, 1,6 и 3,1 раза соответственно.

Согласно принятым в литературе подходам, проведен корреляционный анализ пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG здоровых доноров при окислении различных субстратов. Значимая корреляция ( $R = +0,70$ ) обнаружена при пероксид-зависимом окислении 5-AS и АЕС. В остальных случаях коэффициенты корреляции не были статистически значимыми.

На следующем этапе работы определено сродство наиболее эффективно окисляемых антителами соединений к IgG-3Д и сравнение каталитической активности абзимов с пероксид-зависимой и пероксид-независимой оксидоредуктазными активностями пероксидазы хрена (ПХ). Для этого найдены значения  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующие окисление DAB, ABTS, АЕС и OPD одним из препаратов иммуноглобулинов (IgG4) (рис. 45) и ПХ в аналогичных условиях. Все полученные данные суммированы в таблице 7.

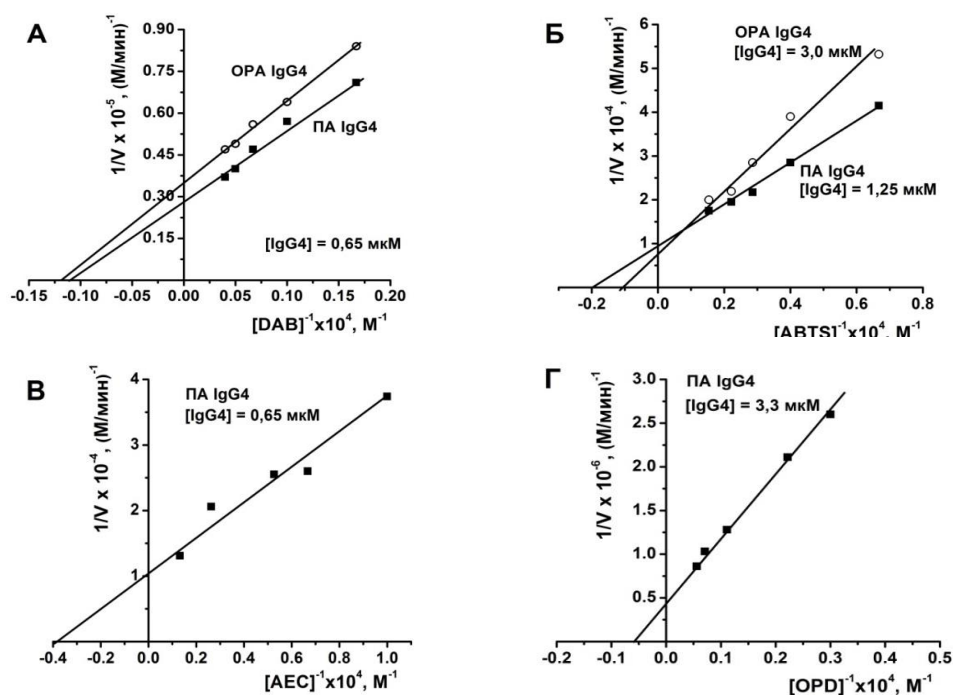
Интересно, что значения  $K_m$  для DAB, ABTS, АЕС и OPD сопоставимы, также, как и значения  $k_{cat}$  для DAB и ABTS в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$ , в то время как значения  $k_{cat}$  для АЕС и OPD в присутствии пероксида водорода значительно отличались. В то же время, поскольку выбранные фиксированные концентрации субстратов были близки к насыщающим, значения  $k_{cat}$ , определяемые из графика зависимости  $1/V$  от  $1/[S]$  и рассчитанные как  $V_{max}/[IgG]$ , где  $[IgG]$  – общая концентрация белка в реакционной смеси, хорошо согласовывались со значениями кажущихся  $k_{cat}$ , оцененных при фиксированных концентрациях этих субстратов. Сродство препарата IgG4-3Д и пероксидазы хрена ко всем исследуемым субстратам оказалось близким, в то время как активность антител по сравнению с ферментом была на 2-3 порядка ниже (табл. 7). Однако стоит отметить, что невозможно оценить вероятный вклад каталитически неактивных IgG при расчете  $k_{cat}$ , так как согласно ранее представленным данным только небольшие фракции поликлональных IgG (примерно 1 – 7% по оценке содержания абзимов с другими каталитическими функциями) могут обладать оксидоредуктазными активностями. Соответственно кинетические параметры, характеризующие окисление различных субстратов препаратом IgG4-3Д, могут быть на 1 – 2 порядка выше представленных в таблице 7.

**Таблица 7.** Значения величин  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующих окисление DAB, ABTS, АЕС и OPD препаратом IgG4 сыворотки крови здорового донора и ПХ в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$

Субстрат	IgG4-ЗД		ПХ	
	$K_m, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$K_m, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$
<b>DAB</b> + $H_2O_2$	$(9,3 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$57,0 \pm 5,0$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}*$	$11000 \pm 300*$
<b>DAB</b> – $H_2O_2$	$(8,5 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	$44,0 \pm 4,0$	$(10 \pm 2,5) \times 10^{-4}*$	$450 \pm 20*$
<b>ABTS</b> + $H_2O_2$	$(5,3 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$64,0 \pm 6,0$	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$10520 \pm 740$
<b>ABTS</b> – $H_2O_2$	$(8,9 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$41,6 \pm 3,5$	$(4,7 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$9302 \pm 560$
<b>АЕС</b> + $H_2O_2$	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$153,0 \pm 15,0$	$(8,6 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	$6250 \pm 750$
<b>OPD</b> + $H_2O_2$	$(1,8 \pm 0,15) \times 10^{-3}$	$0,78 \pm 0,06$	$(5,4 \pm 1,3) \times 10^{-4}*$	$21000 \pm 300*$

Приведены средние значения трех независимых измерений, погрешность не превышала 20 %.

\* Данные значения определены в работах [17, 240].



**Рис. 45.** Определение значений  $K_m$  и  $k_{cat}$  реакций окисления DAB (А), ABTS (Б), АЕС (В) и OPD (Г) препаратом IgG4 из крови здорового донора, в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$  методом двойных обратных координат Лайнуивера–Берка. Ошибка определения величин не превышала 10–20%.

Ранее показано, что абзимы с ДНКазной и РНКазной активностями больных с аутоиммунными заболеваниями представляют собой смесь антител непосредственно к ДНК и РНК и антиидиотипических антител против активных центров ДНКазы I, ДНКазы II, РНКазы и других ферментов, гидролизующих нуклеиновые кислоты [26, 186, 263, 264,

265, 266]. Абзимы больных аутоиммунными заболеваниями с протеолитической и полисахаридгидролизующей активностями являются антителами против различных белков и олигосахаридов [26, 164, 183, 186]. Однако на данный момент остается неясным, какие антигены здоровых доноров могут вызывать образование абзимов с пероксидазной и оксидоредуктазной активностями.

Данные, полученные в результате постоянно растущего количества исследований, позволяют предположить, что аутоиммунные заболевания возникают вследствие дефектов в гемопоэтических стволовых клетках [267]. Так, например, показано, что появление абзимов у мышей с такими аутоиммунными заболеваниями, как системная красная волчанка и экспериментальный энцефаломиелит (имитирующий РС у людей), связано как со значительными изменениями в профиле дифференциации и уровне пролиферации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга мышей, так и с увеличением уровня пролиферации лимфоцитов в различных органах [268]. Тем не менее, не исключено, что образование абзимов может быть и не связано с дефектами гемопоэтических стволовых клеток. Иммунизация здоровых мышей без признаков аутоиммунных заболеваний с помощью ДНК и других антигенов также приводит к образованию каталитических антител [269]. Но этот процесс не связан с изменениями в профиле дифференциации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга мышей; он является результатом дальнейшей дифференциации ранее дифференцированных клеток костного мозга и подавления уровня апоптоза лимфоцитов в различных органах [269]. Возможно, что генерация абзимов с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями у здоровых людей не связана с какими-либо изменениями в профиле дифференциации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Этот процесс может быть вызван различными, в том числе токсическими, мутагенными и канцерогенными соединениями, попадающими в организм человека и стимулирующими дополнительную дифференцировку лимфоцитов и возрастание их пролиферации.

Кроме того, антиидиотипические антитела против активных центров различных ферментов, могут также обладать различными каталитическими активностями [26]. Таким образом, нельзя исключить, что, возможно, параллельно с образованием антител к различным соединениям могут набираться различные абзимы с оксидоредуктазными активностями, как следствие возникновения антиидиотипических антител против активных центров таких канонических ферментов, как глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, пероксидазы и других энзимов, окисляющих различные субстраты. В данной работе продемонстрировано каталитическое разнообразие абзимов по отношению ко всем исследованным субстратам в случае изучения препаратов антител

различных людей. Нельзя исключить, что данное разнообразие является следствием того, что множество различных веществ попадает в организм и приводит к образованию абзимов с различной субстратной специфичностью.

Согласно полученным данным, IgG сывороток девяти здоровых доноров, обладающие пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями, могут эффективно окислять не только DAB, но и другие типичные субстраты различных ферментов с окислительными активностями, а их субстратная специфичность в случае пероксидазного окисления субстратов гораздо шире, нежели их пероксид-независимая оксидоредуктазная специфичность. В работах [22, 231, 236] показано, что в сыворотке человека содержатся абзимы с каталазной и супероксиддисмутазной активностями. Следовательно, абзимы с супероксиддисмутазной активностью могут восстанавливать кислород от  $\cdot\text{O}_2^-$  до  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в то время как антитела с каталазной или пероксидазной активностями могут нейтрализовать пероксид водорода и параллельно разрушать опасные соединения. Можно предположить, что абзимы с окислительно-восстановительными функциями, в отличие от антител с нуклеазными и протеазными активностями, которые появляются только у больных с различными АИЗ, играют важную роль в регуляции уровня АКМ и у здоровых людей. Таким образом, нельзя исключить, что специфический репертуар поликлональных антител человека может выступать в качестве дополнительной природной системы детоксикации активных форм кислорода, а также мутагенных, токсичных и канцерогенных соединений.

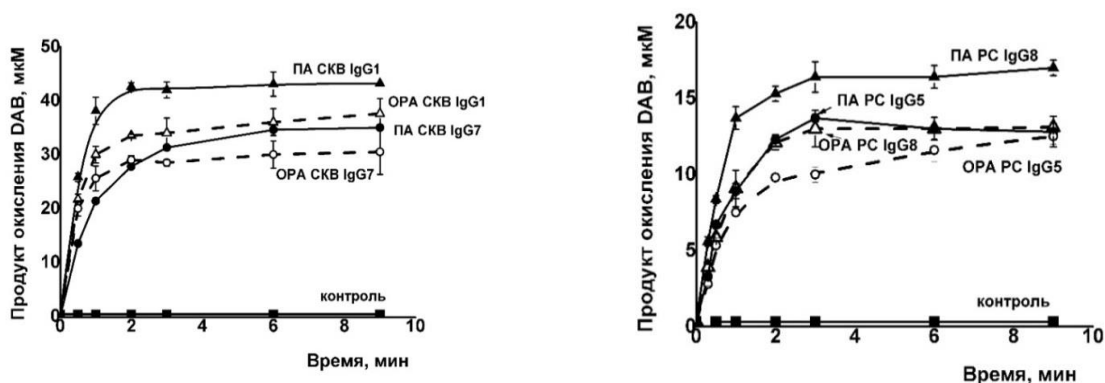
### **3.6. Субстратная специфичность иммуноглобулинов класса G сыворотки крови больных рассеянным склерозом и системной красной волчанкой при окислении различных соединений**

Как указано выше, абзимы с различными каталитическими активностями присутствуют обычно только в крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка (СКВ) [150, 154, 155], аутоиммунный тиреоидит (АИТ) [156], рассеянный склероз (РС) [157, 270]; у больных некоторыми вирусными (вирусный гепатит [160], клещевой энцефалит [161]) заболеваниями, а также у больных лимфопролиферативными заболеваниями (В-клеточный лейкоз, мантийноклеточная лимфома, множественная миелома) [271]. Антитела из крови здоровых доноров, напротив, обычно не проявляют достоверно тестируемых каталитических активностей. К исключениям можно отнести абзимы, иногда обнаруживаемые в крови здоровых доноров, способные гидролизовать тиреоглобулин [186], вазоактивный интестинальный пептид [13] и олигосахариды [14]. Однако стоит отметить, что каталитическая активность

данных антител очень низкая по сравнению с таковой у больных АИЗ. В тоже время, согласно приведенным выше данным, оксидоредуктазные активности антител обнаружены в сыворотке крови здоровых крыс линии Wistar [17, 239, 240, 241], а также у здоровых доноров. Поэтому важно было проанализировать, как развитие аутоиммунных заболеваний может влиять на относительную активность и субстратную специфичность IgG с оксидоредуктазными активностями.

Для этого проведено исследование субстратной специфичности десяти препаратов иммуноглобулинов класса G больных СКВ (IgG-СКВ) и одиннадцати больных РС (IgG-РС) и сравнение кинетических параметров, характеризующих окисление DAB, ABTS, OPD, HVA,  $\alpha$ -нафтола, адреналина, гидрохинона, 5-AS и АЕС с кинетическими параметрами, полученными ранее для препаратов IgG-ЗД.

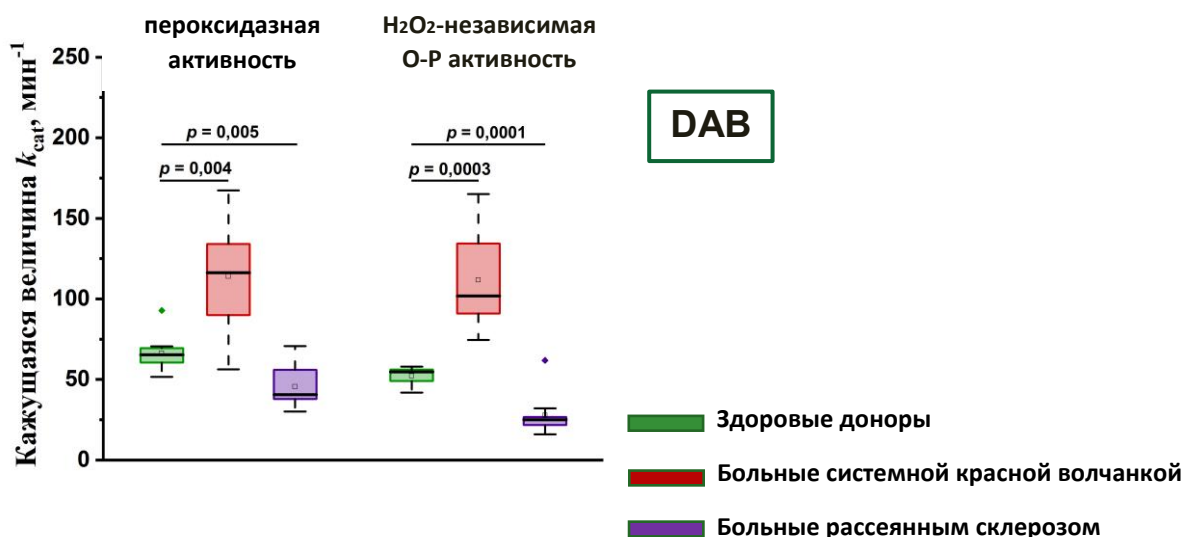
На первом этапе работы проанализировано окисление 3,3'-диаминобензидина отдельными препаратами IgG пациентов с СКВ (IgG-СКВ) и РС (IgG-РС) в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$ . На **рис. 46** представлены несколько типичных кинетических кривых окисления DAB. Абзим-зависимое окисление DAB зависело от препарата IgG. Эффективность окисления DAB рассчитывали по линейным участкам кривых накопления окрашенного продукта окисления DAB. Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующие окисление 3,3'-диаминобензидина при его фиксированной концентрации, рассчитывали по формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (М)}$ . Значения кажущихся  $k_{cat}$  окисления DAB и других субстратов индивидуальными препаратами IgG не подчинялись нормальному распределению Гаусса. Поэтому отличия между различными выборками оценивали с использованием критерия Манна-Уитни.



**Рис. 46.** Кинетические кривые накопления окрашенного продукта реакции окисления DAB (0,93 мМ) препаратами IgG1 и IgG7 (667 нМ) крови больных СКВ и препаратами IgG8 и IgG5 (667 нМ) сыворотки крови больных РС в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$ .

Согласно полученным данным, медианное значение кажущихся  $k_{cat}$ , характеризующее пероксидазную активность препаратов IgG крови больных системной

красной волчанкой (IgG-СКВ) ( $116,2 \text{ мин}^{-1}$ ) статистически значимо ( $p = 0,004$ ) в 1,8 раза выше соответствующей активности иммуноглобулинов класса G здоровых доноров ( $65,3 \text{ мин}^{-1}$ ). При проявлении антителами пероксид-независимой оксидоредуктазной активности медианное значение кажущихся  $k_{\text{cat}}$  IgG-СКВ ( $101,8 \text{ мин}^{-1}$ ) было выше в 1,9 раз ( $p = 0,0003$ ) значения  $k_{\text{cat}}$  здоровых доноров ( $54,7 \text{ мин}^{-1}$ ) (рис. 47).



**Рис. 47.** Сравнение уровня активности IgG здоровых доноров, больных СКВ и больных РС при окислении DAB в присутствии пероксида водорода (пероксидазная активность) и в его отсутствие ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -независимая O-P активность).

В то же время медианный уровень активности препаратов антител больных рассеянным склерозом (IgG-PC) в присутствии пероксида водорода ( $40,6 \text{ мин}^{-1}$ ) ниже, чем у здоровых людей и больных СКВ в 1,6 и 2,8 раз соответственно ( $p < 0,05$ ). Примерно такая же ситуация наблюдалась и в случае пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG-PC, медианный уровень значений кажущихся  $k_{\text{cat}}$  которой ( $25,0 \text{ мин}^{-1}$ ) в 2,2 и 4,0 раза ниже ( $p < 0,05$ ) значений, характеризующих окисление DAB антителами здоровых доноров и IgG-СКВ соответственно (рис. 47). Корреляционный анализ данных активностей антител при окислении DAB выявил статистически значимую корреляцию между пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями IgG пациентов с РС (+0,70).

Ранее в данной работе показано, что IgG теряют часть связанных с ними ионов металлов во время стандартной процедуры выделения и очистки и их оксидоредуктазные активности частично определяются этими ионами металлов, причем  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  лучше остальных ионов активировали данные активности диализованных и недиализованных IgG из крови здоровых людей. Проанализировано влияние ионов  $\text{Mn}^{2+}$  (1 мМ) и  $\text{Cu}^{2+}$  (1 мМ) на активность окисления DAB всех недиализованных IgG-СКВ и нескольких препаратов антител из сывороток пациентов с рассеянным склерозом (табл. 8).



**Таблица 8.** Значения кажущихся  $k_{cat}$ , характеризующих оксидоредуктазные активности IgG крови больных РС и СКВ, в присутствии и в отсутствие ионов  $Cu^{2+}$  и  $Mn^{2+}$

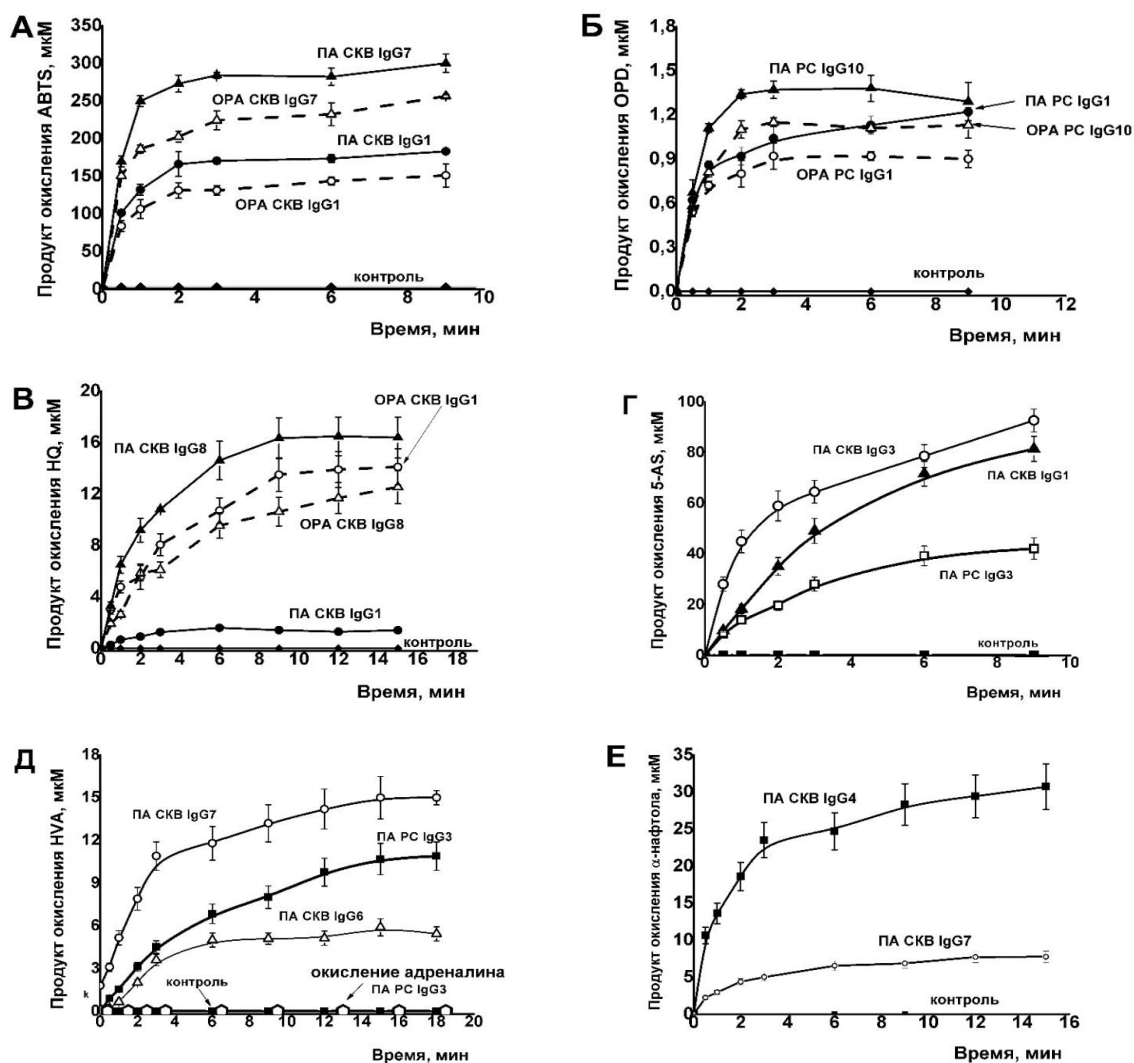
Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1**</sup>			
	1 мМ $Cu^{2+}$		1 мМ $Mn^{2+}$	
	+ $H_2O_2$	- $H_2O_2$	+ $H_2O_2$	- $H_2O_2$
	СКВ			
	1	2	3	4
IgG-1	198,9*	145,2	190,2	147,6
IgG-2	104,6	91,7	111,2	97,7
IgG-3	151,4	123,6	134,2	104,1
IgG-4	161,2	117,5	152,9	107,3
IgG-5	125,9	101,0	228,4	137,6
IgG-6	254,4	207,9	175,0	176,7
IgG-7	163,9	274,6	154,1	198,3
IgG-8	248,6	180,8	109,8	115,1
IgG-9	181,4	159,0	157,0	79,7
IgG-10	111,2	182,3	140,5	134,4
Медианное значение $[Q_1, Q_3]$ + $Me^{2+}$ (1)	162,6 [132,3; 194,5]	152,1 [119,0; 181,9]	153,5 [135,8; 170,5]	124,7 [104,9; 145,1]
Медианное значение $[Q_1, Q_3]$ - $Me^{2+}$ (2)	116,2 [92,6; 130,8]	101,8 [91,8; 126,8]	116,2 [92,6; 130,8]	101,8 [91,8; 126,8]
Отношение медианных значений (1) и (2)	1,4	1,5	1,3	1,2
Достоверность отличий ( $p$ )***	0,045	0,045	0,026	0,161
	РС			
IgG-1	139,3	137,4	70,9	76,4
IgG-2	66,0	92,3	62,0	23,3
IgG-3	99,0	93,2	74,7	69,8
Медианное значение $[Q_1, Q_3]$ + $Me^{2+}$ (1)	99,2 [82,5; 119,2]	93,2 [92,8; 115,3]	70,9 [66,5; 72,8]	69,8 [46,6; 73,1]
Медианное значение $[Q_1, Q_3]$ - $Me^{2+}$ (2)	58,6 [48,3; 64,7]	25,0 [24,4; 43,4]	58,6 [48,3; 64,7]	25,0 [24,4; 43,4]
Отношение медианных значений (1) и (2)	1,7	3,7	1,2	2,8
Значимость отличий ( $p$ )***	0,19	0,08	0,19	0,66

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации  $H_2O_2$  (10 мМ) и DAB (0,93 мМ) в присутствии ионов металлов и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V / [IgG]$ , где  $[IgG]$  – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Достоверность отличий между группами ( $p$ ) определена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

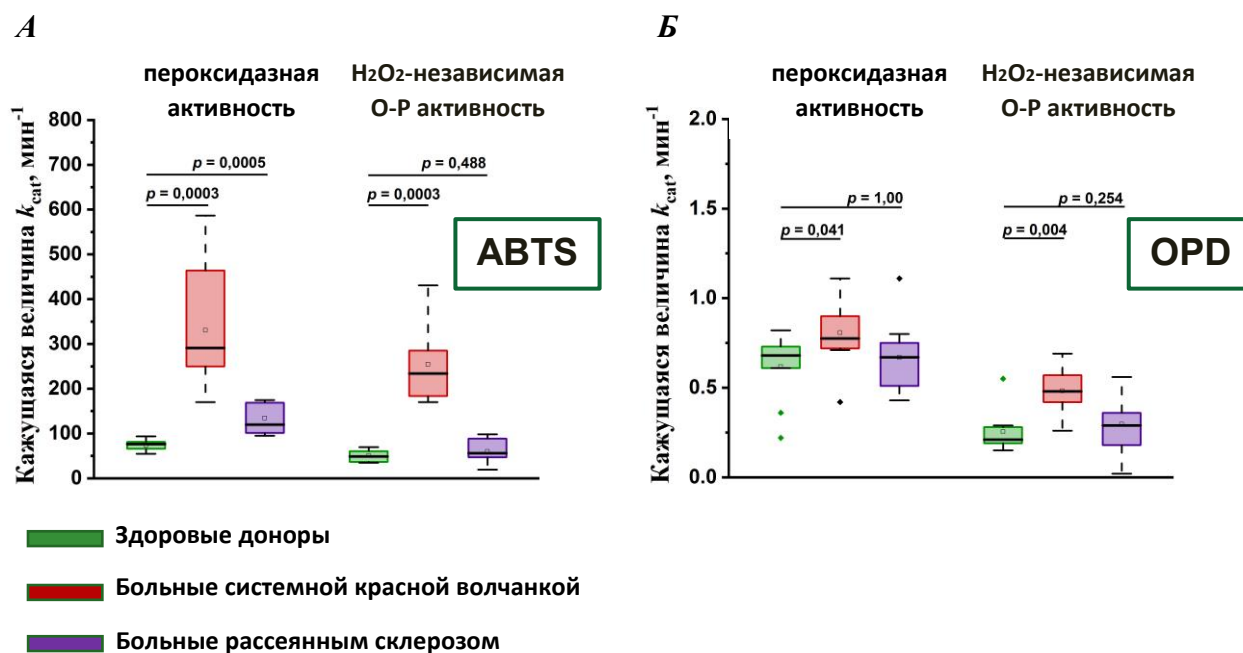
Согласно полученным данным, средняя пероксидазная активность недиализованных IgG пациентов с СКВ увеличивалась после добавления  $MnCl_2$  и  $CuCl_2$  в 1,3 и 1,4 раза ( $p = 0,026$ ,  $p = 0,045$ ) соответственно, в то время как пероксид-независимая оксидоредуктазная значимо возрастала в 1,5 раз только в присутствии 1 мМ  $Cu^{2+}$  ( $p = 0,045$ ). У IgG больных РС наблюдалась тенденция к увеличению обеих активностей в 1,2–3,7 раз, однако в виду ограниченной выборки достоверность отличий в большинстве случаев оказалась незначимой (табл. 8).



**Рис. 48.** Кинетические кривые образования продуктов реакции окисления ABTS (0,36 мМ, **А**), OPD (0,19 мМ, **Б**), гидрохинона (0,12 мМ, **В**), 5-AS (0,38 мМ, **Г**),  $\alpha$ -нафтола (0,07 мМ, **Д**) и HVA (0,55 мМ) и адреналина (0,14 мМ, **Д**) препаратами IgG-PC и IgG-СКВ

На следующем этапе работы исследованы оксидоредуктазные активности препаратов IgG-СКВ и IgG-РС по отношению к ABTS, OPD, гидрохинону, 5-AS,  $\alpha$ -нафтолу, HVA и адреналину (рис. 48). Скорость антител-зависимого окисления различных соединений в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$  сильно зависела от конкретного субстрата. Иммуноглобулины класса G крови больных системной красной волчанкой

окисляли ABTS в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$  в 3,8 и 4,8 раз быстрее, чем IgG здоровых людей. Препараты IgG-PC окисляли ABTS, благодаря пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностям, в 1,6 и 1,2 раз эффективнее IgG здоровых доноров. Разница между кажущимися значениями  $k_{cat}$  при окислении ABTS для всех групп антител была статистически значимой ( $p < 0,05$ ), за исключением пероксид-независимой оксидоредуктазной активности IgG здоровых доноров и пациентов с РС ( $p = 0,488$ ) (рис. 49А).

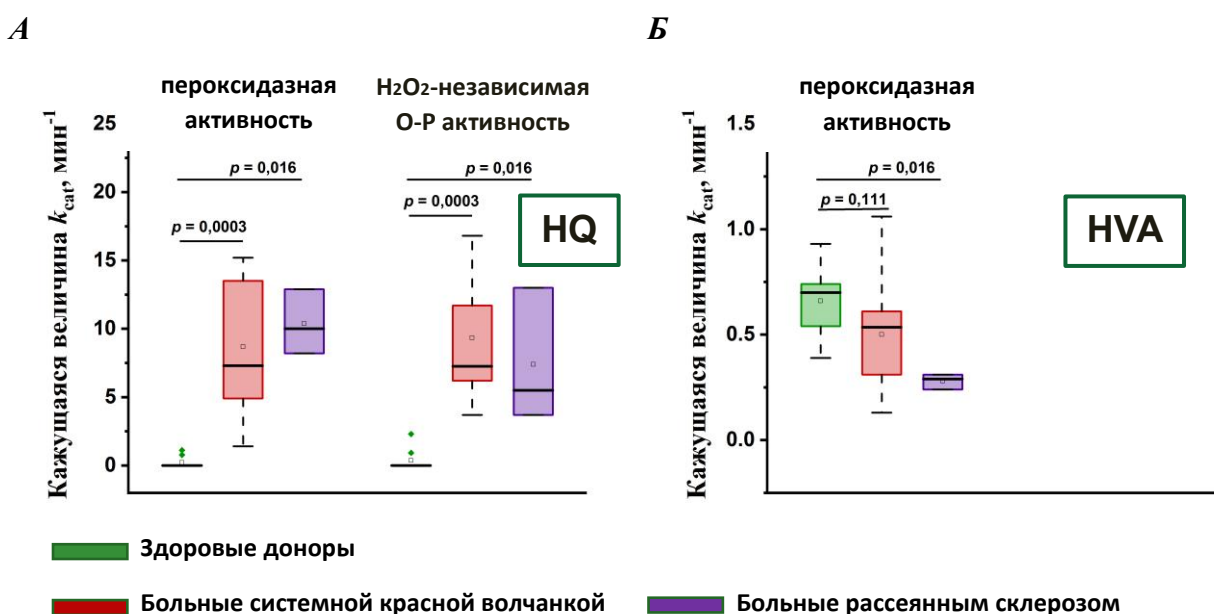


**Рис. 49.** Сравнение уровня активности IgG здоровых доноров, больных СКВ и больных РС при окислении ABTS (А) и OPD (Б) в присутствии пероксида водорода (пероксидазная активность) и в его отсутствие ( $H_2O_2$ -независимая O-P активность).

Значения  $k_{cat}$  реакции окисления о-фенилендиамина всеми препаратами иммуноглобулинов класса G пациентов с РС, СКВ и здоровых людей были относительно низкими. Статистически достоверные различия обнаружены только для IgG здоровых людей и пациентов с СКВ (пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активность) (рис. 49Б).

Из девяти препаратов IgG здоровых доноров в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$  гидрохинон окисляли только два, однако, все препараты IgG-СКВ и IgG-РС оказались способными использовать его в качестве субстрата. В целом средняя активность препаратов СКВ при окислении HQ в 41,4–25,8 раз выше, чем у здоровых доноров. При окислении гидрохинона различными препаратами антител не наблюдалось достоверных различий только в случае пероксидазной и оксидоредуктазной активностей IgG пациентов с СКВ и РС ( $p = 0,67$  и  $0,4$ , соответственно). Возможно, это связано с тем, что при оценке активности антител, в случае HQ использовали только три препарата IgG пациентов с РС (рис. 50А). Как показано выше, четыре соединения окислялись большинством

используемых препаратов IgG как в присутствии, так и в отсутствие  $H_2O_2$ . Однако четыре типичных субстрата канонических оксидоредуктаз, а именно HVA,  $\alpha$ -нафтол, 5-AS и АЕС окислялись всеми препаратами IgG только в присутствии пероксида водорода. Важно отметить, что антитела пациентов с аутоиммунными заболеваниями более эффективно окисляли упомянутые выше субстраты, чем IgG здоровых доноров. Например, уровень пероксидазной активности IgG здоровых доноров ниже активности антител пациентов, больных СКВ в 3,2 раза для  $\alpha$ -нафтола, в 23,5 раза для 5-AS и в 2,2 раза для АЕС ( $p < 0,05$  для всех значений) (рис. 51). В случае HVA наблюдалась противоположная ситуация: пероксидазная активность IgG здоровых доноров и пациентов с СКВ были близкими ( $p = 0,1$ ) (рис. 50Б).



**Рис. 50.** Сравнение уровня активности IgG здоровых доноров, больных СКВ и больных РС при окислении HQ (А) и HVA (Б) в присутствии пероксида водорода (пероксидазная активность) и в его отсутствие ( $H_2O_2$ -независимая О-Р активность).

Значения кажущиеся  $k_{cat}$  для трех проанализированных препаратов РС-IgG варьировали в диапазоне (мин<sup>-1</sup>):  $\alpha$ -нафтол (9,0–15,5; медианное значение 13,8), 5-AS (0,0–2,7; медианное значение 0,16), АЕС (53,8–89; медианное значение 75,0). Данные значения также были выше, чем у IgG здоровых доноров: для  $\alpha$ -нафтола в 2,6 раз и для АЕС в 1,9 раз ( $p < 0,05$  для всех соединений).

Ранее показано, что IgG сыворотки крыс линии Wistar [240] и здоровых людей не активны в реакции окисления адреналина. Все препараты IgG-СКВ и IgG-РС человека также не окисляли этот субстрат и в присутствии, и в отсутствие  $H_2O_2$  (рис. 48Д).

Для оценки сродства различных субстратов к IgG, определены значения  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующие окисление трех субстратов одним из препаратов IgG-СКВ и IgG-РС в

присутствии и в отсутствие пероксида водорода (рис. 52). Полученные данные представлены в таблице 9.

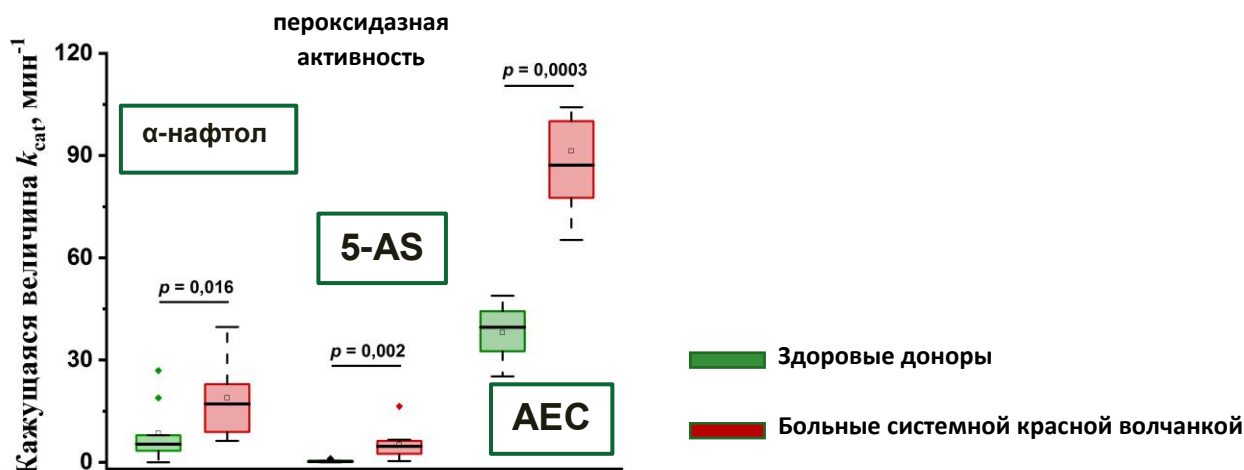


Рис. 51. Сравнение уровня пероксидазной активности IgG здоровых доноров и больных СКВ при окислении  $\alpha$ -нафтола, 5-AS и АЕС.

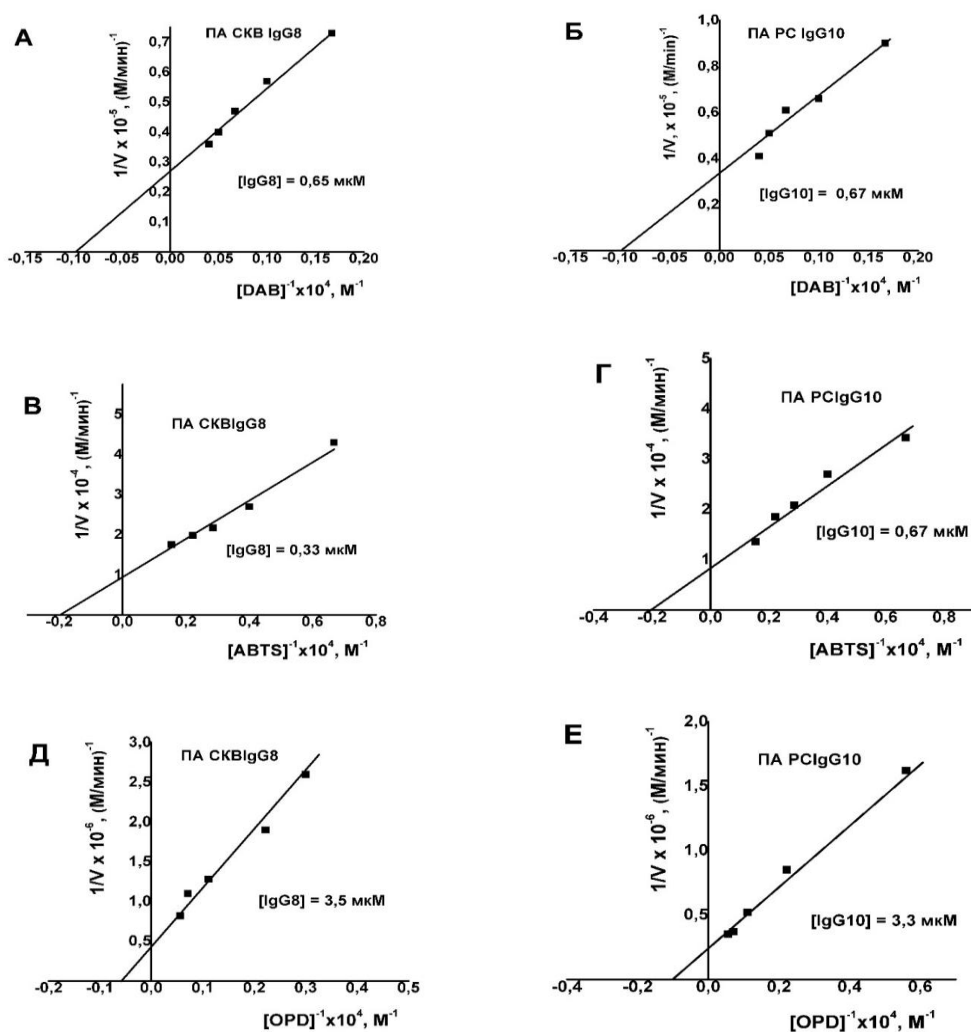


Рис. 52. Определение значений  $K_m$  и  $k_{cat}$  реакций пероксидазного окисления DAB, ABTS и OPD препаратом IgG8 сыворотки крови больного СКВ (А, В, Д) и препаратом IgG10 сыворотки крови больного РС (Б, Г, Е) методом двойных обратных координат Лайнуивера–Берка. Ошибка определения величин не превышала 10–20%.

**Таблица 9.** Величины  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующие окисление DAB, ABTS и OPD препаратом IgG8 крови больного СКВ и препаратом IgG10 крови больного РС в присутствии и в отсутствие  $H_2O_2$ .

Субстрат	IgG-СКВ 8		IgG-РС 10	
	$K_m, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$K_m, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$
DAB + $H_2O_2$	$(10 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	$62,0 \pm 5,8$	$(9,6 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$45,4 \pm 5,0$
DAB – $H_2O_2$	$(8,4 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$51,0 \pm 4,9$	$(7,4 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$30,3 \pm 2,9$
ABTS + $H_2O_2$	$(5,0 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$321,0 \pm 25,0$	$(4,7 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$169,0 \pm 14,0$
ABTS – $H_2O_2$	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$385,0 \pm 31,0$	$(5,9 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$68,0 \pm 5,2$
OPD + $H_2O_2$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$1,2 \pm 0,2$	$(9,3 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$1,6 \pm 0,2$

\* Каждая величина определена как среднее значение трех измерений, погрешность не превышала 20 %.

Значения  $K_m$  для реакции пероксид-зависимого окисления DAB ( $(10 \pm 1,0) \times 10^{-4}$  M), ABTS ( $(5,0 \pm 0,4) \times 10^{-4}$  M) и OPD ( $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$  M) сопоставимы, кроме того,  $K_m$ , полученные для субстратов в присутствии и в отсутствие пероксида водорода практически совпадали. Следует отметить, что значения  $k_{cat}$  для DAB, ABTS и OPD значительно различались между собой, но, в то же время, были близки значениям кажущихся  $k_{cat}$ , найденным при фиксированной концентрации этих субстратов.

Проведена оценка коэффициентов корреляции ( $R$ ) пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей препаратов IgG-СКВ и IgG-РС, а также данных активностей антител пациентов с аутоиммунными заболеваниями в реакциях окисления различных субстратов. Значимая корреляция между пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями обнаружена при окислении ABTS ( $R = +0,75$ ) препаратами IgG-СКВ и DAB ( $R = +0,70$ ) препаратами IgG-РС. Также значимая корреляция выявлена при пероксид-независимом окислении DAB–ABTS ( $+0,69$ ) и DAB–OPD ( $+0,67$ ) препаратами IgG больных системной красной волчанкой. Остальные коэффициенты корреляции статистически не значимы. Таким образом, согласно полученным данным, однозначно четкой корреляции образования абзимов с пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями окисления различных субстратов у здоровых доноров и у пациентов с СКВ и РС не обнаружено. Тем не менее, можно отметить, что относительно высокие положительные коэффициенты

корреляции чаще всего обнаруживались при окислении различных субстратов в отсутствие пероксида водорода препаратами антител больных системной красной волчанкой.

Кажущиеся значения  $k_{\text{cat}}$  для природных абзимов из сыворотки пациентов с АИЗ варьируют, за некоторыми исключениями, в диапазоне  $10^{-5} - 4 \times 10^1 \text{ мин}^{-1}$  [164, 27, 186, 188]. Таким образом, средние оксидоредуктазные активности поликлональных IgG здоровых людей, пациентов с СКВ и РС при окислении всех субстратов значительно выше активности многих известных природных абзимов.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что максимальное увеличение пероксидазной активности абзимов по сравнению со здоровыми донорами наблюдалось для IgG пациентов с СКВ в следующем порядке: OPD (в 1,2 раза) < DAB (в 1,8 раз)  $\leq$  АЕС (в 2,2 раза) <  $\alpha$ -нафтол (в 3,2 раза)  $\leq$  АВТС (в 3,8 раз) < 5-AS (в 23,5 раза), а пероксид-независимой оксидоредуктазой в следующем: OPD (в 1,8 раз)  $\leq$  DAB (в 1,9 раз) < АВТС (в 4,8 раз).

При окислении некоторых субстратов использовали только три препарата IgG пациентов с РС, поэтому на основании полученных данных можно сделать вывод только о достоверно тестируемом возрастании пероксидазной активности IgG в реакции окисления АВТС в 1,6 раз и ее уменьшении в 2,1 раза при окислении DAB. Пероксид-независимая активность антител при рассеянном склерозе была достоверно в 1,9 раз ниже по сравнению с активностью иммуноглобулинов класса G здоровых доноров. Во всех остальных случаях стоит говорить только о тенденции к повышению активности IgG из сыворотки пациентов с рассеянным склерозом по сравнению с активностью абзимов здоровых доноров.

Опубликовано множество работ, согласно которым, в патохимическом комплексе, формирующемся при РС и СКВ, существенная роль отводится дезинтеграции метаболизма, активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и угнетению антиоксидантных систем [272, 273, 274, 275, 276, 277]. Так, например, обнаружено снижение концентрации GSH и  $\alpha$ -токоферола в очагах демиелинизации при РС [278, 279].

Представленные в литературе данные об уровне активности ферментов антиоксидантной защиты при РС и СКВ по сравнению со здоровыми людьми достаточно противоречивы [277, 280, 281]. Показано, что активность глутатионредуктазы у пациентов с РС в 2,8 раза ниже, а каталазная активность, напротив, достоверно ( $p < 0,05$ ) повышена в 3,1 раз по сравнению с лицами контрольной группы [282]. Увеличение каталазной активности при РС отмечено и в работах [283, 284]. Обнаружено значительное уменьшение активности глутатионпероксидазы эритроцитов и лимфоцитов больных

рассеянным склерозом [285, 286], в то же время некоторые авторы наблюдали увеличение активности данных ферментов по сравнению со здоровыми донорами [281]. В ряде работ отмечена повышенная экспрессия SOD1 макрофагов и SOD2 астроцитов в активных участках демиелинизации при РС [280, 281]. М. Turgay с соавторами сообщили об уменьшении активности антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза у пациентов с СКВ, как в крови, так и в эритроцитах [274]. О снижении уровня активности этих ферментов при системной красной волчанке свидетельствуют данные, полученные и в других работах [287, 288]. Согласно результатам проведенного метаанализа [289], установлено, что при СКВ наблюдается снижение уровня восстановленного глутатиона и активности каталазы. Следовательно, нельзя исключить, что иммуноглобулины класса G с оксидоредуктазными активностями наряду с ферментами антиоксидантной защиты, такими как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза (особенно в условиях пониженного уровня активности ферментов), могут служить дополнительной системой детоксикации активных форм кислорода у пациентов с системной красной волчанкой и рассеянным склерозом.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено исследование пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных иммуноглобулинов класса G здоровых доноров, а так же больных системной красной волчанкой и больных рассеянным склерозом. Применение набора ранее разработанных строгих критериев, (анализ пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей IgG *in situ*, сохранение данных активностей после гель-фильтрации антител в условиях «кислого шока», полная сорбция ферментативной активности иммуноглобулинов в результате специфического взаимодействия абзимов с аффинными сорбентами и выявление активности Fab- и F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов), позволило однозначно доказать принадлежность данных активностей иммуноглобулинам класса G. Впервые продемонстрировано, что IgG человека могут эффективно окислять различные субстраты, такие как 3,3'-диаминобензидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоокислоту), о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, α-нафтол, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол, причем на использованном наборе соединений субстратная специфичность IgG с пероксидазной активностью является более широкой, нежели их пероксид-независимая оксидоредуктазная специфичность. Установлено, что при системной красной волчанке и рассеянном склерозе происходит, за некоторым исключением, увеличение активности антител по отношению к большинству исследуемых субстратов.

Принимая во внимание данные о том, что активность многих оксидоредуктаз зависит от одного или нескольких ионов переходных металлов или их сочетания с металлом с постоянной валентностью, исследована зависимость оксидоредуктазных активностей антител от концентрации различных ионов металлов. Полученные данные позволяют предположить, что IgG человека активируются в присутствии экзогенных ионов Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>. Наиболее интересным результатом является тот факт, что IgG людей содержат не только металл-зависимые, но так же и металл-независимые подфракции антител, обладающих пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностями.

Окислительные повреждения компонентов клетки рассматриваются как важный фактор мутагенеза, канцерогенеза и старения. Считается, что канонические антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы) обеспечивают критические защитные механизмы для предотвращения окислительных модификаций клеточных компонентов. Несмотря на то, что все данные канонические ферменты млекопитающих присутствуют в основном в клетках, низкая ферментативная

активность некоторых из них может быть обнаружена и в крови, однако там эти ферменты быстро инактивируются. Согласно полученным в работе результатам, IgG с окислительно-восстановительными функциями, подобно другим каталитически активным антителам, обладают 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 сохраняться там относительно долго (время жизни составляет от 2 до 3 и более недель). 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)<sub>2</sub>-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<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, так и от их различных комбинаций друг с другом, а также с ионами Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, и Zn<sup>2+</sup>. Оптимальными для катализа являются пары Cu<sup>2+</sup>+Mn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup>+Zn<sup>2+</sup>.

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<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>.

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-сульфоуксиду), 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 пероксидажной 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-сульфоуксиду) и 5-аминосалициловая кислота, а пероксид-независимая оксидоредуктазная выше при окислении о-фенилендиамина, 3,3'-диаминобензидина и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксиду).
- Уровень пероксидажной активности IgG больных рассеянным склерозом выше по сравнению со здоровыми донорами при окислении 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксиду) и ниже при окислении 3,3'-диаминобензидина. Пероксид-независимая оксидоредуктазная активность IgG

больных рассеянным склерозом ниже по сравнению со здоровыми донорами при окислении 3,3'-диаминобензидина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

---

1. Cavalcante A.K., Martinez G.G., Mascio P.D., Mensk C.F., Anges-Lima L.F. Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains // *DNA Repair*. – 2002. – V. 1. – №. 12. – P. 1051-1056.
2. Sánchez-Rodríguez M. A., Ruiz-Ramos M., Correa-Muñoz E., Mendoza-Núñez V. M. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes // *BMC Musculoskeletal Disorders*. – 2007. – V. 8. – №. 1. – P. 124.
3. Sendur O. F., Turan Y., Tastaban E., Serter, M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study // *Joint Bone Spine*. – 2009. – V. 76. – №. 5. – P. 514-518.
4. Zinnuroglu M., Dincel A. S., Kosova F., Sepici V., Karatas G. K. Prospective evaluation of free radicals and antioxidant activity following 6-month risedronate treatment in patients with postmenopausal osteoporosis // *Rheumatology International*. – 2012. – V. 32. – №. 4. – P. 875-880
5. Flatow J., Buckley P., Miller B. J. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia // *Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 74. – №. 6. – P. 400-409
6. Simon D. K., Tanner C. M., Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology // *Clinics in Geriatric Medicine*. – 2020. – V. 36. – №. 1. – P. 1-12
7. Mendonca H. R., Carpi-Santos R., da Costa Calaza K., Martinez A. M. B. Neuroinflammation and oxidative stress act in concert to promote neurodegeneration in the diabetic retina and optic nerve: galectin-3 participation // *Neural Regeneration Research*. – 2020. – V. 15. – №. 4. – P. 625.
8. Kertys M., Grendar M., Kosutova P., Mokra D., Mokry J. Plasma based targeted metabolomic analysis reveals alterations of phosphatidylcholines and oxidative stress markers in guinea pig model of allergic asthma // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2020. – V. 1866. – №. 1. – P. 165572.
9. Antunes G. L., Silveira J. S., Kaiber D. B., Luft C., da Costa M. S., Marques E. P., Ferreira F.S., Breda R.V., Wyse A.T., Stein R.T., Pitrez P. M., da Cunha A. A. Cholinergic anti-inflammatory pathway confers airway protection against oxidative damage and attenuates inflammation in an allergic asthma model // *Journal of Cellular Physiology*. – 2020. – V. 235. – №. 2. – P. 1838-1849.
10. Glanz V. Y., Sobenin I. A., Grechko A. V., Yet S. F., Orekhov A. N. The role of mitochondria in cardiovascular diseases related to atherosclerosis // *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*. – 2020. – V. 12. – P. 102-112.

- 
11. Невинский Г. А., Канышкова Т. Г., Бунева В. Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – №. 11. – С. 1245-1255
12. Бунева В. Н., Андриевская О. А., Романникова И. В., Гололобов Г. В., Ядав Р. П., Ямковой В. И., Невинский Г. А. Взаимодействие каталитически активных антител с олигорибонуклеотидами // Молекулярная биология. – 1994. – Т. 28. – С. 738-743.
13. Paul S., Volle D. J., Beach C. M., Johnson D. R., Powell M. J., Massey R. J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // Science. – 1989. – V. 244. – №. 4909. – P. 1158-1162
14. Savel'ev A. N., Eneyskaya E. V., Shabalin K. A., Filatov M. V., Neustroev K. N. Autoantibodies with amyolytic activity // Protein and Peptide Letters. – 1999. – V. 6. – P. 179-184.
15. Semenov D. V., Karotaeva N. A., Kanyshkova T. G., Krasnorutskii M. A., Kuznetsova I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Catalytic nucleotide-hydrolyzing antibodies in milk and serum of clinically healthy human mothers // Medical Science Monitor. – 2004. – V. 10. – №. 2. – P. BR23-BR33.
16. Wentworth A. D., Jones L. H., Wentworth P., Janda K. D., Lerner R. A. Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97. – №. 20. – P. 10930-10935.
17. Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgG antibodies with peroxidase-like activity from the sera of healthy Wistar rats // FEBS Letters. – 2005. – V. 579. – №. 18. – P. 3960-3964.
18. Волкова М. В. Каталитическая активность поликлональных IgG у пациентов с острым реактивным артритом // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – №. 1 (33).
19. Волкова М. В., Кундер Е. В., Генералов И. И. Ферментативная активность антител при ранних артритах: патогенетическая роль и диагностические перспективы // Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал. – 2014. – №. 6. – С. 31-40.
20. Генералов И. И., Коротина О. Л., Жерулик С. В., Генералова А. Г., Волкова М. В. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – Т. 1. – С. 6-17.

- 
21. Жерулик С. В., Луд Н. Г., Генералов С. И., Орлова Е. Г., Генералов И. И. Ферментативная активность сыворотки крови, абзимная активность IgG и IgA, свободная сывороточная ДНК и образование внеклеточных ловушек нейтрофилами у пациенток с новообразованиями молочной железы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2017. – №. 3. – С. 41.
22. Ermakov E. A., Smirnova L. P., Bokhan N. A., Semke A. V., Ivanova S. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A Catalase activity of IgG antibodies from the sera of healthy donors and patients with schizophrenia // PloS One. – 2017. – V. 12. – №. 9. – P. e0183867
23. Жильцов И. В., Генералов И. И., Доценко М. Л., Матвеев А. А. Ферментативная активность препаратов IgG при вирусных гепатитах // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 1998. – №. 4. – С. 73-77.
24. Коротина О. Л. Железняк Н. В., Жерулик С. В., Денисенко А. Г., Генералова А. Г. Каталитическая активность IgA и ферментов ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 14. – №. 1.
25. Konorev M. R., Generalov I. I., Litvjakov A. M., Okulich V. K. BAPNA-amidase and peroxidase IgG activity of patients with Helicobacter pylori // International Review of Allergology and Clinical Immunology. – 1999. – V. 5. – №. 4. – P. 243-245
26. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies—abzymes // Catalytic Antibodies. – 2005. – P. 503-567.
27. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases // Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment. USA: Nova Science Publishers, Inc. – 2010. – P. 1-107.
28. Frei B., Stocker R., Ames B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – V. 85. – №. 24. – P. 9748-9752.
29. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин, В. А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – Фирма "Слово", 2006
30. Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life // Current Medicinal Chemistry. – 2003. – V. 10. – №. 23. – P. 2495-2505.

- 
31. Checa J., Aran J. M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes // *Journal of Inflammation Research*. – 2020. – V. 13. – P. 1057.
32. Loschen G., Flohe L. Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria // *FEBS Letters*. – 1971. – V. 18. – №. 2. – P. 261-264.
33. Li C.Y., R.M. Jackson Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2002. – V. 282. – №. 2. – P. C227-C241.
34. Conner E. M., Grisham M. B. Inflammation, free radicals, and antioxidants // *Nutrition*. – 1996. – V. 12. – №. 4. – P. 274-277.
35. Stohs S. J., Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1995. – V. 18. – №. 2. – P. 321-336
36. Nathan C., Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls // *Cell*. – 1994. – V. 78. – №. 6. – P. 915-918.
37. Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // *Chemico-Biological Interactions*. – 2006. – V. 160. – №. 1. – P. 1-40
38. Demple B., Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology // *Annual Review of Biochemistry*. – 1994. – V. 63. – №. 1. – P. 915-948.
39. Møller P., Wallin H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 1998. – V. 410. – №. 3. – P. 271-290.
40. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – V. 32. – №. 11. – P. 1102-1115.
41. Umeno A., Biju V., Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes // *Free Radical Research*. – 2017. – V. 51. – №. 4. – P. 413-427.
42. Levine R. L., Mosoni L., Berlett B. S., Stadtman E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – №. 26. – P. 15036-15040.
43. Eiserich J. P., Hristova M., Cross C. E., Jones A. D., Freeman B. A., Halliwell B., Van Der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils // *Nature*. – 1998. – V. 391. – №. 6665. – P. 393.



- 
44. Gallelli C. A., Calcagnini S., Romano A., Koczwara J. B., De Ceglia M., Dante D., Gaetani S. Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues // *Antioxidants*. – 2018. – V. 7. – №. 7. – P. 93.
45. Fritz K. S., Petersen D. R. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – V. 59. – P. 85-91.
46. Marnett L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1999. – V. 424. – №. 1-2. – P. 83-95.
47. Winczura A., Zdżalik D., Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability // *Free Radical Research*. – 2012. – V. 46. – №. 4. – P. 442-459.
48. Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Castro J. P. Happily (n) ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence // *Redox Biology*. – 2017. – V. 11. – P. 482-501.
49. Marí M., de Gregorio E., de Dios C., Roca-Agüjetas V., Cucarull B., Tutusaus A., Colell A. Mitochondrial glutathione: recent insights and role in disease // *Antioxidants*. – 2020. – V. 9. – №. 10. – P. 909.
50. Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – V. 66. – P. 3-12.
51. Nikolaidis M. G., Margaritelis N. V., Matsakas A. Quantitative Redox Biology of Exercise // *International Journal of Sports Medicine*. – 2020.
52. Gutierrez-Mariscal F. M., Arenas-de Larriva A. P., Limia-Perez L., Romero-Cabrera J. L., Yubero-Serrano E. M., López-Miranda J. Coenzyme Q10 Supplementation for the Reduction of Oxidative Stress: Clinical Implications in the Treatment of Chronic Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – №. 21. – P. 7870.
53. Belenguer-Varea Á., Tarazona-Santabalbina F. J., Avellana-Zaragoza J. A., Martínez-Reig M., Mas-Bargues C., Inglés M. Oxidative stress and exceptional human longevity: systematic review // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – V. 149. – P. 51-63.
54. Arnér E. S. J., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – V. 267. – №. 20. – P. 6102-6109.
55. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – V. 66. – P. 75-87.

- 
56. Balsera M., Buchanan B. B. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – V. 140. – P. 28-35.
57. Zhang L., Zhu J. H., Zhang X., Cheng W. H. The thioredoxin-like family of selenoproteins: Implications in aging and age-related degeneration // *Biological Trace Element Research*. – 2019. – V. 188. – №. 1. – P. 189-195.
58. Heo S., Kim S., Kang D. The Role of Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins throughout the Cell Cycle // *Antioxidants*. – 2020. – V. 9. – №. 4. – P. 280.
59. Szeliga M. Peroxiredoxins in Neurodegenerative Diseases // *Antioxidants*. – 2020. – V. 9. – №. 12. – P. 1203.
60. Li Y. R., Zhu H., Danelisen I. Role of Peroxiredoxins in Protecting Against Cardiovascular and Related Disorders // *Cardiovascular Toxicology*. – 2020. – V. 20. – №. 5. – P. 448-453.
61. Rhee S. G., Chae H. Z., Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2005. – V. 38. – №. 12. – P. 1543-1552.
62. Hofmann B., Hecht H. J., Flohé L. Peroxiredoxins // *Biological Chemistry*. – 2002. – V. 383. – №. 3-4. – P. 347-364.
63. Wood Z. A., Schröder E., Harris J. R., Poole L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2003. – V. 28. – №. 1. – P. 32-40.
64. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – V. 244. – №. 22. – P. 6049-6055.
65. Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), superoxide dismutases, and related matters // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – №. 30. – P. 18515-18517.
66. Warner H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1994. – V. 17. – №. 3. – P. 249-258.
67. Fukui T., Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – V. 15. – №. 6. – P. 1583-1606.
68. Sheng Y., Abreu I. A., Cabelli D. E., Maroney M. J., Miller A. F., Teixeira M., Valentine J. S. Superoxide dismutases and superoxide reductases // *Chemical Reviews*. – 2014. – V. 114. – №. 7. – P. 3854-3918.

- 
69. Landis G. N., Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2005. – V. 126. – №. 3. – P. 365-379.
70. Perry J. J., Shin D. S., Getzoff E. D., Tainer J. A. The structural biochemistry of the superoxide dismutases // *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2010. – V. 1804. – №. 2. – P. 245-262
71. Antonyuk S. V., Strange R. W., Marklund S. L., Hasnain S. S. The structure of human extracellular copper–zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding // *Journal of Molecular Biology*. – 2009. – V. 388. – №. 2. – P. 310-326.
72. Griess B., Tom E., Domann F., Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. – V. 112. – P. 464-479.
73. Buschfort C., Müller M. R., Seeber S., Rajewsky M. F., Thomale J. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level // *Cancer Research*. – 1997. – V. 57. – №. 4. – P. 651-658.
74. Matés J. M., Pérez-Gómez C., De Castro I. N. Antioxidant enzymes and human diseases // *Clinical Biochemistry*. – 1999. – V. 32. – №. 8. – P. 595-603.
75. Azadmanesh J., Borgstahl G. E. A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase // *Antioxidants*. – 2018. – V. 7. – №. 2. – P. 25.
76. Demicheli V., Moreno D. M., Radi R. Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: a paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration in vitro and in vivo // *Metallomics*. – 2018. – V. 10. – №. 5. – P. 679-695.
77. Gabbianelli R., D’Orazio M., Pacello F., O’Neill P., Nicolini L., Rotilio G., Battistoni A. Distinctive functional features in prokaryotic and eukaryotic Cu, Zn superoxide dismutases // *Biological Chemistry*. – 2004. – V. 385. – №. 8. – P. 749-754.
78. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1986. – V. 247. – №. 1. – P. 1-11.
79. Quan F., Korneluk R. G., Tropak M. B., Gravel R. A. Isolation and characterization of the human catalase gene // *Nucleic Acids Research*. – 1986. – V. 14. – №. 13. – P. 5321-5335.
80. Deisseroth A., Dounce A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role // *Physiological Reviews*. – 1970. – V. 50. – №. 3. – P. 319-375.
81. Obinger C., Maj M., Nicholls P., Loewen, P. Activity, Peroxide Compound Formation, and Heme d Synthesis in *Escherichia coli* HPII Catalase // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1997. – V. 342. – №. 1. – P. 58-67.

- 
82. Nagem R. A., Martins E. A., Gonçalves V. M., Aparicio R., Polikarpov I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human catalase // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 1999. – V. 55. – №. 9. – P. 1614-1615.
83. Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., Tainer J. A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – V. 296. – №. 1. – P. 295-309.
84. Díaz A., Loewen P. C., Fita I., Carpena X. Thirty years of heme catalases structural biology // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – V. 525. – №. 2. – P. 102-110.
85. Jones P., Dunford H. B. The mechanism of Compound I formation revisited // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2005. – V. 99. – №. 12. – P. 2292-2298.
86. Vlasits J., Jakopitsch C., Schwanninger M., Holubar P., Obinger C. Hydrogen peroxide oxidation by catalase-peroxidase follows a non-scrambling mechanism // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – №. 2. – P. 320-324.
87. Zámocký M., Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 1999. – V. 72. – №. 1. – P. 19-66.
88. Bauer G. Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells // *Redox Biology*. – 2015. – V. 6. – P. 353-371.
89. Gabdoulline R. R., Kummer U., Olsen L. F., Wade R. C. Concerted simulations reveal how peroxidase compound III formation results in cellular oscillations // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 85. – №. 3. – P. 1421-1428.
90. Kono Y., Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – V. 258. – №. 10. – P. 6015-6019.
91. Stich T. A., Whittaker J. W., Britt R. D. Multifrequency EPR studies of manganese catalases provide a complete description of proteinaceous nitrogen coordination // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – V. 114. – №. 45. – P. 14178-14188.
92. Flohé L. The selenoprotein glutathione peroxidase // *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. – 1989. – P. 644-731.

- 
93. Marinho H. S., Antunes F., Pinto R. E. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1997. – V. 22. – №. 5. – P. 871-883.
94. Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafeman D. G., Hoekstra, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // *Science*. – 1973. – V. 179. – №. 4073. – P. 588-590.
95. Quintana-Cabrera R., Fernandez-Fernandez S., Bobo-Jimenez V., Escobar J., Sastre J., Almeida A., Bolaños J. P.  $\gamma$ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor // *Nature Communications*. – 2012. – V. 3. – №. 1. – P. 1-8.
96. Chu F. F., Doroshov J. H., Esworthy R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – V. 268. – №. 4. – P. 2571-2576.
97. Esworthy R. S., Swiderek K. M., Ho Y. S., Chu F. F. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1998. – V. 1381. – №. 2. – P. 213-226.
98. Florian S., Wingler K., Schmehl K., Jacobasch G., Kreuzer O. J., Meyerhof W., Brigelius-Flohé R. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue // *Free Radical Research*. – 2001. – V. 35. – №. 6. – P. 655-663.
99. Chang C., Worley B. L., Phaëton R., Hempel N. Extracellular Glutathione Peroxidase GPx3 and Its Role in Cancer // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – №. 8. – P. 2197.
100. Schomburg L., Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health // *Molecular Nutrition & Food Research*. – 2008. – V. 52. – №. 11. – P. 1235-1246.
101. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – V. 27. – №. 9-10. – P. 951-965.
102. Avissar N., Finkelstein J. N., Horowitz S., Willey J. C., Coy E., Frampton M. W., Watkins R. H., Khullar P., Xu Y. L., Cohen, H. J. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 1996. – V. 270. – №. 2. – P. L173-L182.

- 
103. Maeda K., Okubo K., Shimomura I., Mizuno K., Matsuzawa Y., Matsubara, K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue // *Gene*. – 1997. – V. 190. – №. 2. – P. 227-235.
104. Malinouski M., Kehr S., Finney L., Vogt S., Carlson B. A., Seravalli J., Hatfield D. L. High-resolution imaging of selenium in kidneys: a localized selenium pool associated with glutathione peroxidase 3 // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2012. – V. 16. – №. 3. – P. 185-192.
105. Burk R. F., Olson G. E., Winfrey V. P., Hill K. E., Yin D. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2011. – V. 301. – №. 1. – P. G32-G38.
106. Thomas J. P., Geiger P. G., Maiorino M., Ursini F., Girotti A. W. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. – 1990. – V. 1045. – №. 3. – P. 252-260
107. Thomas J. P., Maiorino M., Ursini F., Girotti A. W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – №. 1. – P. 454-461.
108. Maiorino M., Roveri A., Benazzi L., Bosello V., Mauri P., Toppo S., Ursini, F. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – №. 46. – P. 38395-38402.
109. Rejraji H., Vernet P., Drevet J. È. R. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations // *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. – 2002. – V. 63. – №. 1. – P. 96-103.
110. Utomo X., Jiang S., Furuta J., Yun D. S., Levin Y. C., Wang K. V., Desai J. E., Green P. L., Chen W. H. Lee Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – №. 42. – P. 43522-43529.

- 
111. Toppo S., Vanin S., Bosello V., Tosatto S. C. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2008. – V. 10. – №. 9. – P. 1501-1514.
112. Nguyen V. D., Saaranen M. J., Karala A. R., Lappi A. K., Wang L., Raykhel I. B., Ruddock L. W. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – V. 406. – №. 3. – P. 503-515.
- 113 Guillin O. M., Vindry, C., Ohlmann T., Chavatte L. Selenium, selenoproteins and viral infection // *Nutrients*. – 2019. – V. 11. – №. 9. – P. 2101.
- 114 Buday K., Conrad M. Emerging roles for non-selenium containing ER-resident glutathione peroxidases in cell signaling and disease // *Biological Chemistry*. – 2020. – V. 1. – №. ahead-of-print.
115. Epp O., Ladenstein R., Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution // *European Journal of Biochemistry*. – 1983. – V. 133. – №. 1. – P. 51-69.
116. Borchert A., Kalms J., Roth S. R., Rademacher M., Schmidt A., Holzhutter H. G., Scheerer, P. Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2018. – V. 1863. – №. 9. – P. 1095-1107.
117. Toppo S., Flohé L., Ursini F., Vanin S., Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2009. – V. 1790. – №. 11. – P. 1486-1500.
118. Flohé L., Toppo S., Cozza G., Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms // *Antioxidants & Redox signaling*. – 2011. – V. 15. – №. 3. – P. 763-780.
119. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione transferases // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2005. – V. 45. – P. 51–88.
120. Cooray R., Petersson C. G. B., Holmberg O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 1993. – V. 38. – №. 3-4. – P. 261-272.
121. Wever R., Hamers M. N., Weening R. S., Roos D. Characterization of the peroxidase in human eosinophils // *European Journal of Biochemistry*. – 1980. – V. 108. – №. 2. – P. 491-495.

- 
122. Taurog A., Dorris M. L., Yokoyama N., Slaughter C. Purification and characterization of a large, tryptic fragment of human thyroid peroxidase with high catalytic activity // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1990. – V. 278. – №. 2. – P. 333-341.
123. Sharma S., Singh A. K., Kaushik S., Sinha M., Singh R. P., Sharma P., Singh T. P. Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition // *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2013. – V. 4. – №. 3. – P. 108-28.
124. Fiedler T. J., Davey C. A., Fenna R. E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – №. 16. – P. 11964-11971.
125. Sakamaki K, Tomonaga M, Tsukui K, Nagata S. Molecular cloning and characterization of a chromosomal gene for human eosinophil peroxidase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – V. 264. – №. 28. – P. 16828-16836.
126. Furtmüller P. G., Zederbauer M., Jantschko W., Helm J., Bogner M., Jakopitsch C., Obinger C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – V. 445. – №. 2. – P. 199-213.
127. Colas C., Ortiz de Montellano P. R. Autocatalytic radical reactions in physiological prosthetic heme modification // *Chemical Reviews*. – 2003. – V. 103. – №. 6. – P. 2305-2332.
128. Singh P. K., Iqbal N., Sirohi H. V., Bairagya H. R., Kaur P., Sharma S., Singh T. P. Structural basis of activation of mammalian heme peroxidases // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2018. – V. 133. – P. 49-55.
129. Nicolussi A., Auer M., Sevcnikar B., Paumann-Page M., Pfanzagl V., Zámocký M., Obinger C. Posttranslational modification of heme in peroxidases—Impact on structure and catalysis // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – V. 643. – P. 14-23.
130. Захарова Г. С., Упоров И. В., Тишков В. И. Peroxidaza iz kornej khrena: modulirovaniye svoystv khimicheskoy modifikatsiyey belkovoy globuly i gemma // *Uspexi biologicheskoy khimii*. – 2011. – T. 51. – S. 37-64.
131. Bhunia S., Rana A., Dey S. G., Ivancich A., Dey A. A designed second-sphere hydrogen-bond interaction that critically influences the O–O bond activation for heterolytic cleavage in ferric iron–porphyrin complexes // *Chemical Science*. – 2020. – V. 11. – №. 10. – P. 2681-2695.
132. Sheikh I. A., Singh A. K., Singh N., Sinha M., Singh S. B., Bhushan A., Singh, T. P. Structural evidence of substrate specificity in mammalian peroxidases structure of the



---

thiocyanate complex with lactoperoxidase and its interactions at 2.4 Å resolution // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – №. 22. – P. 14849-14856.

133. Singh A. K., Pandey N., Sinha M., Kaur P., Sharma S., Singh T. P. Structural evidence for the order of preference of inorganic substrates in mammalian heme peroxidases: crystal structure of the complex of lactoperoxidase with four inorganic substrates, SCN, I, Br and Cl // *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2011. – T. 2. – №. 4. – C. 328-339.

134. Monzani E., Gatti A. L., Profumo A., Casella L., Gullotti M. Oxidation of phenolic compounds by lactoperoxidase. Evidence for the presence of a low-potential compound II during catalytic turnover // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – №. 7. – P. 1918-1926.

135. Ferrari R. P., Laurenti E., Casella L., Poli S. Oxidation of catechols and catecholamines by horseradish peroxidase and lactoperoxidase: ESR spin stabilization approach combined with optical methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. – 1993. – V. 49. – №. 9. – P. 1261-1267.

136. Singh A. K., Singh N., Sinha M., Bhushan A., Kaur P., Srinivasan A., Sharma S., Singh T. P. Binding Modes of Aromatic Ligands to Mammalian Heme Peroxidases with Associated Functional Implications crystal structures of lactoperoxidase complexes with acetylsalicylic acid, salicylhydroxamic acid, and benzylhydroxamic acid // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – №. 30. – P. 20311-20318.

137. Ghibaudi E. M., Laurenti E., Beltramo P., Ferrari R. P. Can estrogenic radicals, generated by lactoperoxidase, be involved in the molecular mechanism of breast carcinogenesis? // *Redox Report*. – 2000. – V. 5. – №. 4. – P. 229-235.

138. Azzi A., Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles // *Progress in Lipid Research*. – 2000. – V. 39. – №. 3. – P. 231-255.

139. Herrera E., Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2001. – V. 57. – №. 1. – P. 43-56.

140. Burkart V., Groß-Eick A., Bellmann K., Radons J., Kolb H. Suppression of nitric oxide toxicity in islet cells by  $\alpha$ -tocopherol // *FEBS Letters*. – 1995. – V. 364. – №. 3. – P. 259-263.

141. Beyer R. E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant // *Biochemistry and Cell Biology*. – 1992. – V. 70. – №. 6. – P. 390-403.

142. Halliwell B. Albumin—an important extracellular antioxidant? // *Biochemical Pharmacology*. – 1988. – V. 37. – №. 4. – P. 569-571.

- 
143. Mühlhoff U., Braymer J. J., Christ S., Rietzschel N., Uzarska M. A., Weiler B. D., Lill R. Glutaredoxins and iron-sulfur protein biogenesis at the interface of redox biology and iron metabolism // *Biological Chemistry*. – 2020. – V. 1. – №. ahead-of-print.
144. Balla G., Jacob H. S., Balla J., Rosenberg M., Nath K., Apple F., Eaton J. W., Vercellotti G. M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – №. 25. – P. 18148-18153.
145. Pauling L. Nature of forces between large molecules of biological interest // *Nature*. – 1948. – V. 161. – №. 4097. – P. 707-709.
146. Jencks W. P. *Catalysis in chemistry and enzymology*. – Courier Corporation, 1987.
147. Raso V., Stollar B. D. Antibody-enzyme analogy. Comparison of enzymes and antibodies specific for phosphopyridoxyltyrosine // *Biochemistry*. – 1975. – V. 14. – №. 3. – P. 591-599.
148. Lerner R. A., Benkovic S. J., Schultz P. G. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies // *Science*. – 1991. – V. 252. – №. 5006. – P. 659-667.
149. Schultz P. G., Lerner R. A. From molecular diversity to catalysis: lessons from the immune system // *Science*. – 1995. – V. 269. – №. 5232. – P. 1835-1842.
150. Shuster A. M., Gololobov G. V., Kvashuk O. A., Bogomolova A. E., Smirnov I. V., Gabibov A. G. DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science*. – 1992. – V. 256. – №. 5057. – P. 665-667.
151. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Human catalytic RNA-and DNA-hydrolyzing antibodies // *Journal of Immunological Methods*. – 2002. – V. 269. – №. 1-2. – P. 235-249.
152. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2003. – V. 7. – №. 3. – P. 265-276.
153. Vlassov A., Florentz C., Helm M., Naumov V., Buneva V., Nevinsky G., Giege R. Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human serum with RNase activity // *Nucleic Acids Research*. – 1998. – V. 26. – №. 23. – P. 5243-5250.
154. Andrievskaya O. A. Buneva V. N., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus // *Medical Science Monitor*. – 2000. – V. 6. – №. 3. – P. 460-470.
155. Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Baranovsky A. G., Gal'vita A. V., Benzo E. S., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG

---

antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus // *Immunology Letters*. – 2002. – V. 81. – P. 191-198.

156. Nevinsky G. A., Breusov A. A., Baranovskii A. G., Prints A. V., Kanyshkova T. G., Galvita A. V., Naumov V. A., Buneva V. N. Effect of different drugs on the level of DNA-hydrolyzing polyclonal IgG antibodies in sera of patients with Hashimoto's thyroiditis and nontoxic nodal goiter // *Medical Science Monitor*. 2001. – V. 7. – P. 201-211

157. Барановский, А. Г., Канышкова, Т. Г., Могильницкий, А. С., Наумов, В. А., Бунева, В. Н., Гусев, Е. И., Бойко, А. Н., Заргарова, Т. А., Фаворова, О. О., Невинский, Г. А. Поликлональные антитела из сыворотки крови и спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом эффективно гидролизуют РНК и ДНК // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63. – С. 1459-1469.

158. Baranovskii A.G., Ershova N.A., Buneva V.N., Kanyshkova T.G., Mogelnitskii A.S., Doronin B.M., Boiko A.N., Gusev E.I., Favorova O.O., Nevinsky G.A. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunology Letters*. – 2001. – V. 76. – P. 163-167.

159. Гальвита А. В., Барановский А. Г., Кузнецова И. А., Виншу Н. В., Галенок В. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Особенности гидролиза ДНК антителами из крови пациентов с сахарным диабетом // *Российский иммунологический журнал*. – 2007. – Т. 1. – №. 2. – С. 116-131.

160. Барановский А. Г., Матюшин В. Г., Власов А. В., Забара В. Г., Наумов В. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусного гепатита // *Биохимия*. 1997. – Т. 62. – С.1590-1599.

161. Parkhomenko T. A., Buneva V. N., Tyshkevich O. B., Generalov I. I., Doronin B. M., Nevinsky G. A. DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with tick-borne encephalitis // *Biochimie*. – 2010. – V. 92. – №. 5. – P. 545-554.

162. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Parkhomenko T.A., Dmitrenok P.S., Krotenko N.M., Fattakhov N.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A., DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia // *Open Biology*. – 2015. – V. 5. – №. 9. – P. 150064

163. Одинцова Е. С., Харитоновна М. А., Барановский А. Г., Сизякина Л. П., Бунева В. Н., Невинский Г. А. ДНК-гидролизующие IgG-антитела из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // *Молекулярная биология*. – 2006. – Т. 40. – №. 5. – С. 857-864.

---

164. Бунева В. Н., Невинский Г. А. Исключительное многообразие каталитических антител с различными активностями в крови пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – №. 6. – С. 969-984.

165. Lekchnov E. A., Dmitrenok P. S., Zakharova O. D., Sedykh S. E., Buneva V. N., Nevinsky G. A. The DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from human placenta // *Placenta*. – 2018. – V. 68. – P. 1-8.

166. Savel'ev, A. N., Ivanen, D. R., Kulminskaya, A. A., Ershova, N. A., Kanyshkova T. G., Buneva, V. N., Mogelnitskii A. S., Favorova O. O., Nevinsky G. A., Neustroev K. N. Amylolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis // *Immunology Letters*. – 2003. – V. 86. – №. 3. – P. 291-297.

167. Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Kulminskaya A. A., Buneva V. N., Eneyskaya E. V., Filatov M. V., Nevinsky G. A., Neustroev K. N. Amylolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk // *Clinica Chimica Acta*. – 2001. – V. 314. – №. 1-2. – P. 141-152.

168. Doronin V. B., Parkhomenko T. A., Castellazzi M., Cesnik E., Buneva V. N., Granieri E., Nevinsky G. A. Comparison of antibodies with amylase activity from cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis // *PloS One*. – 2016. – V. 11. – №. 5. – P. e0154688.

169. Mei S., Mody B., Eklund S. H., Paul S. Vasoactive intestinal peptide hydrolysis by antibody light chains // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – №. 24. – P. 15571-15574.

170. Polosukhina D. I., Kanyshkova T. G., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E.I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2004. – V. 8. – №. 3. – P. 359-368.

171. Polosukhina D. I.; Buneva V. N., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky, G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Medical Science Monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2005. – V. 11. – №. 8. – P. BR266-72.

172. Gonzalez-Gronow M., Cuchacovich M., Francos R., Cuchacovich S., Blanco A., Sandoval R., Gomez C. F., Valenzuela J. A., Ray R., Pizzo S. V. Catalytic autoantibodies against myelin basic protein (MBP) isolated from serum of autistic children impair in vitro

---

models of synaptic plasticity in rat hippocampus // *Journal of Neuroimmunology*. – 2015. – V. 287. – P. 1-8.

173. Parshukova D., Smirnova L. P., Ermakov E. A., Bokhan N. A., Semke A. V., Ivanova S. A., Buneva V.N., Nevinsky G. A. Autoimmunity and immune system dysregulation in schizophrenia: IgGs from sera of patients hydrolyze myelin basic protein // *Journal of Molecular Recognition*. – 2019. – V. 32. – №. 2. – e2759.

174. Одинцова Е. С., Харитоновна М. А., Барановский А. Г., Сизякина Л. П., Бунева В. Н., Невинский, Г. А. Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // *Биохимия*. – 2006. – Т. 71. – №. 3. – С. 320-332.

175. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parissi V., Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients // *Biochimie*. – 2009. – V. 91. – №. 9. – P. 1081-1086.

176. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parissi V., Zakharova O. D., Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing IgM antibodies from sera of HIV-infected patients // *International Immunology*. – 2010. – V. 22. – №. 8. – P. 671-680.

177. Baranova S. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies from the sera of HIV-infected patients efficiently hydrolyze all human histones // *Journal of Molecular Recognition*. – 2016. – V. 29. – №. 8. – P. 346-362.

178. Baranova S. V., Dmitrienok P. S., Ivanisenko N. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies to H1 histone from the sera of HIV-infected patients recognize and catalyze site-specific degradation of this histone // *Journal of Molecular Recognition*. – 2017. – V. 30. – №. 3. – P. e2588.

179. Baranova S. V., Dmitrienok P. S., Ivanisenko N. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies to H2a and H2b histones from the sera of HIV-infected patients catalyze site-specific degradation of these histones // *Molecular BioSystems*. – 2017. – V. 13. – №. 6. – P. 1090-1101.

180. Baranova S. V., Dmitrenok P. S., Zubkova A. D., Ivanisenko N. V., Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against H3 and H4 histones from the sera of HIV-infected patients catalyze site-specific degradation of these histones // *Journal of Molecular Recognition*. – 2018. – V. 31. – №. 7. – С. e2703.

- 
181. Baranova S. V., Mikheeva E. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies from the Sera of Multiple Sclerosis Patients Efficiently Hydrolyze Five Histones // *Biomolecules*. – 2019. – V. 9. – №. 11. – P. 741.
182. Nevinsky G. A., Favorova O. O., Buneva V. N. Catalytic antibodies: New characters in the protein repertoire. Protein-protein interactions. A molecular cloning manual. Ed. by Golemis. - Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York. 2002, 523-534.
183. Keinan E. Catalytic antibodies. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. – 2005.– P.1-586.
184. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies in norm, autoimmune, viral, and bacterial diseases // *The Scientific World Journal*. – 2010. – V. 10. – P. 1203-1233.
185. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients // *Understanding HIV/AIDS Management and Care—Pandemic Approaches the 21st Century*. – 2011. – P. 151-192.
186. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Autoantibodies and natural catalytic antibodies in health, multiple sclerosis, and some other diseases // *Advances in Neuroimmune Biology*. – 2012. – V 3. – №. 2. – P. 157-182.
187. Nevinsky G. A. Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation // *Trending Topics in Multiple Sclerosis*. – 2016. – C. 99-148.
188. Nevinsky G. A. Catalytic antibodies in norm and systemic lupus erythematosus // *Lupus*. Rijeka, Croatia: InTech. – 2017. – P. 41-101.
- 189 Ermakov E. A., Nevinsky G. A., Buneva V. N. Immunoglobulins with non-canonical functions in inflammatory and autoimmune disease states // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – №. 15. – P. 5392.
190. Jerne N. K. Towards a network theory of the immune system // *Ann. Immunol.* – 1974. – V. 125. – P. 373-389.
191. Avalle B., Friboulet A., Thomas D. Catalysis by anti-idiotypic antibodies // *Chemical Immunology*. – 2000. – V. 77. – P. 80-88.
192. Collins A. M., Jackson K. J. L. On being the right size: antibody repertoire formation in the mouse and human // *Immunogenetics*. – 2018. – V. 70. – №. 3. – P. 143-158.
193. Paul S., Planque S. A., Nishiyama Y., Hanson, C. V., Massey, R. J. Nature and nurture of catalytic antibodies // *Naturally Occurring Antibodies (NAbs)*. – Springer, New York, NY, 2012. – P. 56-75.

- 
194. Mahendra A., Sharma M., Rao D. N., Peyron I., Planchais C., Dimitrov J. D., Lacroix-Desmazes S. Antibody-mediated catalysis: induction and therapeutic relevance // *Autoimmunity Reviews*. – 2013. – V. 12. – №. 6. – P. 648-652.
195. Fournel S., Muller S. Anti-nucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus // *Annales de Medecine Interne*. – 2002. – V. 153. – №. 8. – P. 513-519.
196. Chen R., Kang R., Fan X. G., Tang D. Release and activity of histone in diseases // *Cell Death & Disease*. – 2014. – V. 5. – №. 8. – P. e1370-e1370
197. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky, G. A. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus // *Journal of Molecular Recognition*. – 2011. – V. 24. – №. 6. – P. 960-974.
198. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgGs containing light chains of the  $\lambda$ -and  $\kappa$ -type and of all subclasses (IgG1–IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein // *International Immunology*. – 2012. – V. 24. – №. 12. – P. 759-770.
199. Odintsova E. S., Dmitrenok P. S., Timofeeva A. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Why specific anti-integrase antibodies from HIV-infected patients can efficiently hydrolyze 21-mer oligopeptide corresponding to antigenic determinant of human myelin basic protein // *Journal of Molecular Recognition*. – 2014. – V. 27. – №. 1. – P. 32-45.
200. Buneva V. N., Kanyshkova T. G., Vlassov A. V., Semenov D. V., Khlimankov D., Breusova L. R., Nevinsky, G. A. Catalytic DNA-and RNA-hydrolyzing antibodies from milk of healthy human mothers // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 63-76.
201. Taguchi H., Planque S., Nishiyama Y., Symersky J., Boivin S., Szabo P., Friedland R. P., Ramsland P. A., Edmundson A. B., Weksler M. E., Paul S. Autoantibody-catalyzed hydrolysis of amyloid  $\beta$  peptide // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – №. 8. – P. 4714-4722.
202. Wootla B., Christophe O. D., Mahendra A., Dimitrov J. D., Repessé Y., Ollivier V., Andre S. Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – V. 117. – №. 7. – P. 2257-2264.
203. Wootla B, Dasgupta S, Dimitrov J. D., Bayry J., Levesque H., Borg J. Y., Borel-Derlon A., Rao D. N., Friboulet A, Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Factor VIII hydrolysis

---

mediated by anti-factor VIII autoantibodies in acquired hemophilia // *The Journal of Immunology*. – 2008. – V. 180. – №. 11. – P. 7714-7720.

204. Lacroix-Desmazes S., Moreau A., Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Kaveri S. V. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A // *Nature Medicine*. – 1999. – V. 5. – №. 9. – P. 1044-1047.

205. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., Kazatchkine M. D., Kaveri S. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies // *The Journal of Immunology*. – 1995. – V. 154. – №. 7. – P. 3328-3332.

206. Odintsova E. S., Baranova S. V., Buneva V. N., Calmels C., Parissi V., Andreola M. L., Zakharova O. D., Nevinsky G.A. Catalytic antibodies from HIV-infected patients specifically hydrolyzing viral integrase suppress the enzyme catalytic activities // *Journal of Molecular Recognition*. – 2011. – V. 24. – №. 6. – P. 1067-1076.

207. Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // *Journal of Molecular Recognition*. – 2005. – V. 18. – №. 5. – P. 413-421.

208. Кит Ю. Я., Шипицин М. В., Семенов Д. В., Рихтер В. А., Невинский Г. А. Фосфорилирование липидов, прочно связанных с секреторным иммуноглобулином А, в препаратах антител из молока человека, обладающих протеинкиназной активностью // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63. – С. 852-858.

209. Gorbunov D. V., Karataeva N. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Lipid kinase activity of antibodies from milk of clinically healthy human mothers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2005. – V. 1735. – №. 3. – P. 153-166.

210. Karataeva N. A., Gorbunov D. V., Prokudin I. V., Buneva V. N., Kulminskaya A. A., Neustroev K. N., Nevinsky G. A. Human milk antibodies with polysaccharide kinase activity // *Immunology Letters*. – 2006. – V. 103. – №. 1. – P. 58-67.

211. Schroeder Jr H. W., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2010. – V. 125. – №. 2. – P. S41-S52.

212. Nezlin RS. 1998. The immunoglobulins: structure and function. Academic Press, San Diego, CA

213. Cochran A. G., Schultz P. G. Peroxidase activity of an antibody-heme complex // *Journal of the American Chemical Society*. – 1990. – V. 112. – №. 25. – P. 9414-9415.



- 
214. Romesberg F. E., Santarsiero B. D., Spiller B., Yin J., Barnes D., Schultz P. G., Stevens R. C. Structural and kinetic evidence for strain in biological catalysis // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – №. 41. – P. 14404-14409.
215. Feng Y., Liu Z., Gao G., Gao S.J., Liu X.Y., Yang T.S. Study of the abzyme with catalytic peroxidase activity // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1995. – V. 750. – P. 271-276.
216. Kawamura-Konishi Y., Asano A., Yamazaki M., Tashiro H., Suzuki H. Peroxidase activity of an antibody–ferric porphyrin complex // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 1998. – V. 4. – №. 4. – P. 181-190.
217. Quilez R., de Lauzon S., Desfosses B., Mansuy D., Mahy J. P. Artificial peroxidase-like hemoproteins based on antibodies constructed from a specifically designed ortho-carboxy substituted tetraarylporphyrin hapten and exhibiting a high affinity for iron-porphyrins // *FEBS Letters*. – 1996. – V. 395. – №. 1. – P. 73-76.
218. de Lauzon S., Desfosses B., Mansuy D., Mahy J. P. Studies of the reactivity of artificial peroxidase-like hemoproteins based on antibodies elicited against a specifically designed ortho-carboxy substituted tetraarylporphyrin // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 443. – №. 2. – P. 229-234.
219. Robles V. M., Marechal J. D., Bahloul A., Sari M. A., Mahy J. P., Golinelli-Pimpaneau B. Crystal structure of two anti-porphyrin antibodies with peroxidase activity // *PloS One*. – 2012. – V. 7. – №. 12. – C. e51128.
220. Ricoux R., Sauriat-Dorizon H., Girgenti E., Blanchard D., Mahy J. P. Hemoabzymes: towards new biocatalysts for selective oxidations // *Journal of Immunological Methods*. – 2002. – V. 269. – №. 1-2. – P. 39-57.
221. Sun Y., Li T., Chen H., Zhang K., Zheng K., Mu Y., Yan G., Li W., Shen J., Luo G. Selenium-containing 15-mer peptides with high glutathione peroxidase-like activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – №. 36. – P. 37235-37240.
222. Messerschmidt K., Degen J., Micheel B. Oxidoreductase activity of multifunctional monoclonal antibody B13-DE 1 // *Journal of Molecular Recognition*. – 2011. – V. 24. – №. 6. – P. 930-934.
223. Luo G. M., Zhu Z. Q., Ding L., Gao G., Sun Q. A., Liu Z., Shen J. C. Generation of selenium-containing abzyme by using chemical mutation // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – V. 198. – №. 3. – P. 1240-1247.

- 
224. Ding L., Liu Z., Zhu Z., Luo G., Zhao D., Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic // *Biochemical Journal*. – 1998. – V. 332. – №. 1. – P. 251-255.
225. Su D., Ren X. J., You D. L., Li D., Mu Y., Yan G. L., Luo Y. M., Xue Y., Liu Z., Shen, J. C., Luo G. M. Generation of three selenium-containing catalytic antibodies with high catalytic efficiency using a novel hapten design method // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2001. – V. 395. – №. 2. – P. 177-184.
226. Su D., You D. L., Ren X. J., Luo G. M., Mu Y., Yan G. L., Xue Y. Shen J. C. Kinetics study of a selenium-containing ScFv catalytic antibody that mimics glutathione peroxidase // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2001. – V. 286. – №. 1. – P. 189-194.
227. You D., Ren X., Xue Y., Luo G., Yang T., Shen J. A selenium-containing single-chain abzyme with potent antioxidant activity // *European Journal of Biochemistry*. – 2003. – V. 270. – №. 21. – P. 4326-4331.
228. Huo R., Wei J., Xu J., Lv S., Zheng Q., Yan F., Su J., Fan, J., Li S., Duan Y., Yu Y., Jin H., Sun G., Shi Y., Cong D., Li W., Yan G., Luo M. Human catalytic antibody Se-scFv-B3 with high glutathione peroxidase activity // *Journal of Molecular Recognition*. – 2008. – V. 21. – №. 5. – P. 324-329.
229. Xu J., Song J., Su J., Wei J., Yu Y., Lv S., Li W., Nie G. A new human catalytic antibody Se-scFv-2D8 and its selenium-containing single domains with high GPX activity // *Journal of Molecular Recognition*. – 2010. – V. 23. – №. 4. – P. 352-359.
230. Генералов И. И., Новиков Д. К. Поликлональные каталитические антитела и их возможное биологическое значение // *Усп. соврем. биол.* – 1998. – Т. 118. – №. 2. – С. 178-193.
231. Wentworth P., Jones L. H., Wentworth A. D., Zhu X., Larsen N. A., Wilson I. A., Xu X., Goddard W. A., Janda, K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A. Antibody catalysis of the oxidation of water // *Science*. – 2001. – V. 293. – №. 5536. – P. 1806-1811.
232. Datta D., Vaidehi N., Xu X., Goddard W. A. Mechanism for antibody catalysis of the oxidation of water by singlet dioxygen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99. – №. 5. – P. 2636-2641.
233. Xu X., Goddard W. A. Peroxone chemistry: Formation of H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ring-(HO<sub>2</sub>)(HO<sub>3</sub>) from O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99. – №. 24. – P. 15308-15312.

---

234. Wentworth P., McDunn J. E., Wentworth A. D., Takeuchi C., Nieva J., Jones T., Babior B. M. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation // *Science*. – 2002. – V. 298. – №. 5601. – P. 2195-2199.

235. Щеглова Т. В. и др. Супероксиддисмутазная, каталазная, пероксидазная и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимая оксидоредуктазная активности IgG антител из крови здоровых крыс Wistar // *Российский иммунологический журнал*. – 2011. – Т. 5. – №. 1. – С. 11-20.

236. Smirnova L. P., Mednova I. A., Krotenko N. M., Alifirova V. M. Ivanova S. A. IgG-Dependent Dismutation of Superoxide in Patients with Different Types of Multiple Sclerosis and Healthy Subjects // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – V. 2020.

237. Generalov I. I., Novikov D. K., Zhiltsov I. V. Catalytic activity of antibodies // *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi, Seryya Biyalagichnykh Nauk*. – 1999. – V. 1. – P. 90-96.

238. Генералов И. И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и онкологических заболеваниях // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2000. – №. 3. – С. 7-12.

239. Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Metal ions-dependent peroxidase and oxidoreductase activities of polyclonal IgGs from the sera of Wistar rats // *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*. – 2006. – V. 19. – №. 2. – P. 91-105.

240. Ikhmyangan, E. N., Vasilenko, N. L., Sinitsina, O. G. I., Buneva, V. N., & Nevinsky, G. A. Substrate specificity of rat sera IgG antibodies with peroxidase and oxidoreductase activities // *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*. – 2006. – V. 19. – №. 5. – P. 432-440.

241. Ихмянган Э. Н., Василенко Н. Л., Синицина О. И., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Каталитическая гетерогенность иммуноглобулинов класса G с пероксидазной активностью, выделенных из крови здоровых крыс Wistar // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2006. – №. 2. – С. 32-48.

242. Yudelevich I. G., Cherevko A. S., Engelsht V. S., Pikalov V. V., Tagiltsev A. P., Zheenbajev Z. Z. A two-jet plasmatron for the spectrochemical analysis of geological samples // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. – 1984. – V. 39. – №. 6. – P. 777-785.

243. Trunova V. A., Zvereva V. V. XRFA-SR studies of the distribution of macro and microelements in myocardium and vessel samples from cardiosurgery patients // *Journal of Structural Chemistry*. – 2008. – V. 49. – №. 1. – P. 211-216.

---

244 Fanouriakis A., Kostopoulou M., Alunno A., Aringer M., Bajema I., Boletis J. N., Houssiau F. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2019. – V. 78. – №. 6. – P. 736-745.

245 McDonald W. I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H. P., Lublin F. D., Sandberg-Wollheim, M. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2001. – V. 50. – №. 1. – P. 121-127.

246. Pace C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein // *Protein Science*. – 1995. – T. 4. – №. 11. – C. 2411-2423.

247. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – №. 5259. – P. 680-685.

248. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York). – 2001.

249. Merrill C. R., Goldman D., Van Keuren M. L. Gel protein stains: Silver stain // *Methods in enzymology*. – Academic Press, – 1984. – V. 104. – P. 441-447.

250. Harlow E., Lane D. *Antibodies: A laboratory manual* // Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. – 1988. – P. 630- 631.

251. Jones R. G. A., Landon J. A protocol for ‘enhanced pepsin digestion’: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum // *Journal of Immunological Methods*. – 2003. – V. 275. – №. 1-2. – P. 239-250.

252. Конорев М. Р., Генералов И. И., Литвяков А. М., Окулич В. К., Сенбкович С. А. Ферментативная активность IgG антител к *Helicobacter pylori* // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 1999. – №. 1. – С. 119-123.

253. Parkhomenko T. A., Doronin V. B., Castellazzi M., Padroni M., Pastore M., Buneva V. N., Granieri E., Nevinsky G. A. Comparison of DNA-hydrolyzing antibodies from the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 4.

254. Kozyr A. V., Kolesnikov A. V., Aleksandrova E. S., Sashchenko L. P., Gnuchev N. V., Favorov P. V., Alekberova Z. S Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 45-61.

- 
255. Polosukhina D. I., Kanyshkova T. G., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E. I., Nevinsky G. A., Favorova O. O. Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunology Letters*. – 2006. – V. 103. – №. 1. – P. 75-81.
256. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgGs containing light chains of the  $\lambda$ -and  $\kappa$ -type and of all subclasses (IgG1–IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein // *International Immunology*. – 2012. – V. 24. – №. 12. – P. 759-770.
257. Zhu X., Wentworth P., Wentworth A. D., Eschenmoser A., Lerner R. A., Wilson, I. A. Probing the antibody-catalyzed water-oxidation pathway at atomic resolution // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – №. 8. – P. 2247-2252.
258. Di Jeso B., Arvan P. Thyroglobulin from molecular and cellular biology to clinical endocrinology // *Endocrine reviews*. – 2016. – V. 37. – №. 1. – P. 2-36.
259. Callewaert L., Michiels C. W. Lysozymes in the animal kingdom // *Journal of biosciences*. – 2010. – V. 35. – №. 1. – P. 127-160.
260. Wu T., Jiang Q., Wu D., Hu Y., Chen S., Ding T., Chen J. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 274. – P. 698-709.
261. Fontecilla-Camps J. C., Volbeda A., Cavazza C., Nicolet Y. Structure/function relationships of [NiFe]-and [FeFe]-hydrogenases // *Chemical Reviews*. – 2007. – V. 107. – №. 10. – P. 4273-4303.
262. Kryukov G. V., Castellano S., Novoselov S. V., Lobanov A. V., Zehtab O., Guigó R., Gladyshev V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes // *Science*. – 2003. – V. 300. – №. 5624. – P. 1439-1443.
263. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA // *International Immunology*. – 2008. – V. 20. – №. 8. – P. 1031-1040.
264. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*. – 2008. – V. 21. – №. 4. – P. 233-242.
265. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase II leads to formation of polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *International Immunology*. – 2009. – V. 21. – №. 4. – P. 349-360.

---

266. Красноруцкий М. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А. ДНКазная, РНКазная и фосфатазная активности антител, образующихся при иммунизации ДНК, ДНКазой I и ДНКазой II // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – №. 9. – С. 1305-1314.

267. Ikehara S., Kawamura M., Takao F., Inaba M., Yasumizu R., Than S., Yoshida T. O. Organ-specific and systemic autoimmune diseases originate from defects in hematopoietic stem cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – V. 87. – №. 21. – P. 8341-8344.

268. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Buneva V. N., Toporkova L. B., Sakhno L. V., Tikhonova M. A., Chernykh E. R., Orlovskaya I. A., Nevinsky G. A. Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors // Journal of cellular and molecular medicine. – 2007. – V. 11. – №. 3. – P. 531-551.

269. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Orlovskaya I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Nucleotide-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice // International immunology. – 2009. – V. 21. – №. 8. – P. 935-945.

270. Parkhomenko T. A., Doronin V. B., Castellazzi M., Padroni M., Pastore M., Buneva V. N., Granieri E., Nevinsky G. A. Comparison of DNA-hydrolyzing antibodies from the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis // PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 4.

271. Kozyr A. V., Kolesnikov A. V., Aleksandrova E. S., Sashchenko L. P., Gnuchev N. V., Favorov P. V., Alekberova Z. S Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 45-61.

272. Луцкий М. А., Есауленко И. Э. Оксидантный стресс в патогенезе рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2006. – Т. 106. – №. 3. – С. 26-30.

273. Okuda Y., Apatoff B. R., Posnett D. N. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis // Journal of Neuroimmunology. – 2006. – V. 171. – №. 1-2. – P. 163-170.

274. Turgay M., Durak I., Erten S., Ertugrul E., Devrim E., Avci A., Turgay F. Oxidative stress and antioxidant parameters in a Turkish group of patients with active and inactive systemic lupus erythematosus // APLAR Journal of Rheumatology. – 2007. – V. 10. – №. 2. – P. 101-106.

- 
275. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2013. – V. 9. – №. 11. – P. 674.
276. Bartova R., Petrlenicova D., Oresanska K., Prochazkova L., Liska B., Turecky L., Durfinova M. Changes in levels of oxidative stress markers and some neuronal enzyme activities in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // *Neuro Endocrinol Lett*. – 2016. – V. 37. – P. 102-106.
277. Zhang S. Y., Gui L. N., Liu Y. Y., Shi S., Cheng Y. Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study // *Front Neurosci*. – 2020. – V. 14. – P. 823.
278. Ortiz G. G., Pacheco-Moisés F. P., Bitzer-Quintero O. K., Ramírez-Anguiano A. C., Flores-Alvarado L. J., Ramírez-Ramírez V., Torres-Sánchez E. D. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach // *Clinical and developmental immunology*. – 2013. – V. 2013.
279. Ferreira B., Mendes F., Osorio N., Caseiro A., Gabriel A., Valado A. Glutathione in multiple sclerosis // *British journal of biomedical science*. – 2013. – V. 70. – №. 2. – P. 75-79.
280. Ibitoye R., Kemp K., Rice C., Hares K., Scolding N., Wilkins A. Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review // *Biomark Med*. – 2016. – V. 10. – №. 8. – P. 889-902.
281. Tavassolifar M. J., Vodjgani M., Salehi Z., Izad M. The Influence of Reactive Oxygen Species in the Immune System and Pathogenesis of Multiple Sclerosis // *Autoimmune Diseases*. – 2020. – V 2020. – P. 5793817-5793817
282. Кротенко Н. В., Алифирова В. М., Иванова С. А. Окислительный стресс-характерная особенность патогенеза рассеянного склероза // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2008. – Т. 7. – №. 5-1.
283. Van Horssen J., Witte M. E., Schreibelt G., de Vries H. E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* – 2011. – V. 1812. – №. 2. – P. 141-150.
284. Singh I. et al. Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment // *Brain research*. – 2004. – V. 1022. – №. 1-2. – P. 1-11.
285. Szeinberg A., Golan R., Ezzer J. B., Sarova-Pinhas I., Sadeh M., Braham J. Decreased erythrocyte glutathione peroxidase activity in multiple sclerosis // *Acta Neurol Scand*. – 1979. – V. 60. – №. 5. – P. 265-271.

---

286. Tasset I., Agüera E., Sánchez-López F., Feijóo M., Giraldo A. I., Cruz A. H., Túnez I. Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis // *Clin Biochem.* – 2012. – V. 45. – №. 6. – P. 440-444.

287. Mohan I. K., Das U. N. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus // *Prostaglandins, Lleukotrienes and Essential Fatty Acids.* – 1997. – V. 56. – №. 3. – P. 193-198.

288. Serban M. G., Tănăseanu S., Bâră C. Oxidant stress and antioxidant protection in lupus nephropathy // *Romanian journal of internal medicine. Revue roumaine de medecine interne.* – 1996. – V. 34. – №. 1-2. – P. 105-109.

289. Sam N. B., Li B. Z., Leng R. X., Pan H. F., Ye D. Q. Circulating antioxidant levels in systemic lupus erythematosus patients: a systematic review and meta-analysis // *Biomarkers in medicine.* – 2019. – V. 13. – №. 13. – P. 1137-1152.



## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Таблица 1.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих окисление DAB индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров, больных рассеянным склерозом и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры		СКВ		РС	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	1	2	3	4	5	6
IgG-1	54,2*	49,0	154,0	134,4	37,9	23,7
IgG-2	69,4	41,8	100,5	90,0	58,6	25,0
IgG-3	70,5	55,4	117,2	91,0	70,7	61,8
IgG-4	51,6	54,7	134,1	101,5	51,5	26,2
IgG-5	92,8	58,0	115,2	94,2	30,1	21,8
IgG-6	60,5	56,6	167,4	161,0	37,9	23,7
IgG-7	65,3	49,4	56,3	165,1	42,5	21,4
IgG-8	69,3	48,1	121,1	102,2	56,0	32,1
IgG-9	63,3	56,1	84,0	74,5	34,7	16,0
IgG-10	-	-	90,0	104,1	40,6	26,7
IgG-11	-	-	-	-	39,5	26,2
Среднее значение	66,3±12,0	52,1±5,3	114,0±33,2	111,8±31,0	45,5±12,2	27,7±12,0
Me [Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> ]	65,3 [60,5; 69,4]	54,7 [49; 56,1]	116,2 [92,6; 130,8]	101,8 [91,8; 126,8]	40,6 [37,9; 53,7]	25,0 [22,8; 26,5]
Отношение медианных значений	1–3: 1,8; 1–5: 1,6; 2–4: 1,9; 2–6: 2,1					
Коэффициент корреляции (R)***	+0,10		+0,25		<u>+0,70</u>	
Значимость отличий (p)****	1–3: 0,004; 1–5: 0,005; 2–4: 0,0003; 2–6: 0,0001; 3–5: 0,0002; 4–6: 0,0001					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), DAB (0,93 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V$  (М/мин)/ [IgG] (М), где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Коэффициенты корреляции (R) рассчитаны с помощью критерия Спирмана, статистически значимые подчеркнуты.

\*\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U-критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

**Таблица 2.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих окисление АВТС индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров, больных рассеянным склерозом и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры		СКВ		РС	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	1	2	3	4	5	6
IgG-1	93,7*	57,9	314,2	234,0	101,5	56,1
IgG-2	81,6	60,5	250,4	229,8	161,9	52,0
IgG-3	76,7	36,6	170,1	170,2	169,3	78,9
IgG-4	59,9	34,9	249,9	234,0	107,0	98,2
IgG-5	54,7	34,9	464,1	284,1	174,6	48,0
IgG-6	72,3	61,3	492,6	285,2	119,9	19,4
IgG-7	81,5	69,5	586,8	430,8	95,0	88,7
IgG-8	66,0	48,9	268,1	318,8	100,4	91,7
IgG-9	76,5	46,9	174,4	172,1	161,7	21,8
IgG-10	-	-	334,1	183,5	116,7	47,1
IgG-11	-	-	-	-	168,8	56,7
Среднее значение	73,7±12,0	50,2±12,9	330,5±140,2	254,3±79,9	134,3±32,5	59,8±26,7
Me [Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> ]	76,5 [66,0; 81,5]	48,9 [36,6; 60,5]	291,2 [250; 452,6]	234,0 [195,1; 285]	119,9 [104,3; 165,4]	56,1 [47,6; 83,8]
Отношение медианных значений	1–3: 3,8; 1–5: 1,6; 2–4: 4,8; 2–6: 1,1					
Коэффициент корреляции (R)***	+0,63		<u>+0,75</u>		-0,39	
Значимость отличий (p)****	1–3: 0,0003; 1–5: 0,0005; 2–4: 0,0003; 2–6: 0,488; 3–5: 0,0002; 4–6: 0,0002					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), АВТС (0,36 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (М)}$ , где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Коэффициенты корреляции (R) рассчитаны с помощью критерия Спирмана, статистически значимые подчеркнуты.

\*\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

**Таблица 3.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих окисление **OPD** индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров, больных рассеянным склерозом и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры		СКВ		РС	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>IgG-1</b>	0,64*	0,24	0,90	0,57	0,46	0,29
<b>IgG-2</b>	0,79	0,21	1,05	0,26	0,59	0,30
<b>IgG-3</b>	0,68	0,15	0,72	0,42	0,61	0,36
<b>IgG-4</b>	0,73	0,21	0,76	0,69	0,43	0,56
<b>IgG-5</b>	0,22	0,19	0,42	0,46	0,67	0,18
<b>IgG-6</b>	0,36	0,17	0,78	0,53	0,69	0,02
<b>IgG-7</b>	0,61	0,28	0,71	0,5	1,11	0,36
<b>IgG-8</b>	0,82	0,29	0,85	0,46	0,80	0,28
<b>IgG-9</b>	0,71	0,55	0,77	0,30	0,73	0,29
<b>IgG-10</b>	-	-	1,11	0,63	0,75	0,47
<b>IgG-11</b>	-	-	-	-	0,51	0,15
<b>Среднее значение</b>	0,64±0,20	0,25±0,12	0,77±0,17	0,46±0,13	0,67±0,19	0,3±0,15
<b>Me [Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>]</b>	0,65 [0,61; 0,73]	0,21 [0,19; 0,28]	0,78 [0,73; 0,89]	0,48 [0,43; 0,56]	0,67 [0,50; 0,74]	0,29 [0,23; 0,36]
<b>Отношение медианных значений</b>	1–3: 1,2; 1–5: 1,0; 2–4: 1,8; 2–6: 1,4					
<b>Коэффициент корреляции (R)***</b>	+0,43		0,12		-0,05	
<b>Значимость отличий (p)****</b>	1–3: 0,041; 1–5: 1,00; 2–4: 0,004; 2–6: 0,254; 3–5: 0,067; 4–6: 0,017					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), OPD (0,19 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V$  (М/мин)/ [IgG] (М), где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Коэффициенты корреляции (R) рассчитаны с помощью критерия Спирмана, статистически значимые подчеркнуты.

\*\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

**Таблица 4.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих окисление **HQ** индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров, больных рассеянным склерозом и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры		СКВ		РС	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>IgG-1</b>	~0,0*	~0,0	1,4	7,1	8,2	3,7
<b>IgG-2</b>	~0,0	~0,0	6,8	16,8	10,0	5,5
<b>IgG-3</b>	~0,0	~0,0	7,8	11,4	12,9	13,0
<b>IgG-4</b>	~0,0	~0,0	5,3	5,7	–	–
<b>IgG-5</b>	~0,0	~0,0	15,2	3,7	–	–
<b>IgG-6</b>	~0,0	~0,0	13,2	7,0	–	–
<b>IgG-7</b>	1,12	2,30	13,5	16,3	–	–
<b>IgG-8</b>	0,0	~0,0	14,2	6,2	–	–
<b>IgG-9</b>	0,77	0,92	4,6	11,7	–	–
<b>IgG-10</b>	-	-	4,9	7,4	–	–
<b>Среднее значение</b>	~0,21±0,42	~0,36±0,79	8,7±4,9	9,3±4,5	10,4±2,4	7,4±4,9
<b>Отношение средних значений</b>	1–3: 41,4; 1–5: 49,5; 2–4: 25,8; 2–6: 20,6					
<b>Me [Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>]</b>	0 [0; 0]	0 [0; 0]	7,3 [5,0; 13,4]	7,3 [6,4; 11,6]	10,0 [9,1; 11,45]	5,5 [4,6; 9,25]
<b>Коэффициент корреляции (R)***</b>	<u>1</u>		-0,32		–	
<b>Значимость отличий (p)****</b>	1–3: 0,0003; 1–5: 0,016; 2–4: 0,0003; 2–6: 0,016; 3–5: 0,673; 4–6: 0,398					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), HQ (0,12 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V \text{ (M/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (M)}$ , где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Коэффициенты корреляции (R) рассчитаны с помощью критерия Спирмана, статистически значимые подчеркнуты.

\*\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

**Таблица 5.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих окисление НВА индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров, больных рассеянным склерозом и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры		СКВ		РС	
	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	1	2	3	4	5	6
IgG-1	0,74*	~0,0	0,57	~0,0	0,24	~0,0
IgG-2	0,39	~0,0	0,55	~0,0	0,29	~0,0
IgG-3	0,93	~0,0	0,35	~0,0	0,31	~0,0
IgG-4	0,88	~0,0	0,52	~0,0	–	–
IgG-5	0,44	~0,0	1,06	~0,0	–	–
IgG-6	0,7	~0,0	0,13	~0,0	–	–
IgG-7	0,54	~0,0	0,68	~0,0	–	–
IgG-8	0,60	~0,0	0,22	~0,0	–	–
IgG-9	0,72	~0,0	0,31	~0,0	–	–
IgG-10	–	~0,0	0,61	~0,0	–	–
Среднее значение	0,66±0,18	~0,0	0,50±0,27	~0,0	0,28±0,04	~0,0
Me [Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> ]	0,7 [0,54; 0,74]	0 [0; 0]	0,54 [0,32; 0,6]	0 [0; 0]	0,29 [0,27; 0,3]	0 [0; 0]
Отношение медианных значений	1–3: 1,3; 1–5: 2,4;					
Значимость отличий (p)***	1–3: 0,111; 1–5: 0,016; 2–4: 1,00; 2–6: 1,00; 3–5: 0,229; 4–6: 1,00					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ), НВА (0,55 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)} / [\text{IgG}] \text{ (М)}$ , где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U–критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.

**Таблица 6.** Кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующих пероксидазное окисление  $\alpha$ -нафтола, 5-AS и АЕС индивидуальными препаратами IgG сыворотки крови здоровых доноров и больных системной красной волчанкой

Номер препарата IgG	Кажущиеся величины $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> **					
	Здоровые доноры			СКВ		
	$\alpha$ -нафтол	5-AS	АЕС	$\alpha$ -нафтол	5-AS	АЕС
	1	2	3	4	5	6
IgG-1	18,9*	0,16	26,0	8,9	6,6	77,6
IgG-2	5,3	0,0	32,6	11,1	6,3	65,2
IgG-3	0,0	0,93	48,9	21,0	16,4	90,5
IgG-4	7,6	0,18	43,1	39,7	5,6	104,2
IgG 5	3,4	0,0	25,2	8,3	0,4	65,2
IgG-6	26,9	0,45	45,7	22,9	3,4	100,1
IgG-7	7,9	0,35	44,3	6,3	2,5	90,5
IgG-8	5,3	2,03	36,9	36,3	0,32	155,2
IgG-9	1,7	0,19	39,6	14,7	5,6	80,7
IgG-10	–	–	–	19,5	3,8	83,9
Среднее значение	8,6±8,5	0,48±0,65	38,0±8,5	18,9±11,6	5,1±4,6	91,3±25,9
Me [Q <sub>1</sub> , Q <sub>3</sub> ]	5,3 [3,4; 7,9]	0,2 [0,16; 0,45]	39,6 [32,6; 44,3]	17,1 [9,45; 22,4]	4,7 [2,7; 6,1]	87,2 [78,4; 97,7]
Отношение медианных значений	1–4: 3,2; 2–5: 23,5; 3–6: 2,2					
Значимость отличий (p)***	1–4: 0,016; 2–5: 0,002; 3–6: 0,0003					

\* Приведены средние значения трех измерений, погрешность не превышала 7–15 %.

\*\* Величины кажущихся  $k_{cat}$  определены при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мМ),  $\alpha$ -нафтола (0,07 мМ), 5-AS (0,38 мМ), АЕС (0,19 мМ) и рассчитаны по формуле  $k_{cat} = V (M/мин) / [IgG] (M)$ , где [IgG] – общая концентрация белка в реакционной смеси.

\*\*\* Достоверность отличий между группами (p) определена с помощью U-критерия Манна-Уитни, значения  $p < 0.05$  считались статистически достоверными.