

ИЗМЕНЕНИЕ АМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ IgG У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ ДО И ПОСЛЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Исследования последних лет убедительно доказали наличие у антител (АТ) собственных ферментативных свойств. Такие иммуноглобулины (ИГ), получившие название абзимов (antibody+enzyme), оказались способны катализировать весьма обширный ряд биохимических превращений. Первые проведенные в этой области исследования показали, что не существует принципиального запрета на создание самых разнообразных антительных биокатализаторов. В частности, удалось получить абзимы, ускоряющие реакции, не имеющие в природных условиях соответствующих ферментов [14].

Очевидно, что результаты, полученные с применением моноклональных АТ, являются основой для изучения ферментативной активности поликлональных ИГ.

Постепенно накапливались многочисленные доказательства того, что появление каталитических АТ является нормальным компонентом иммунного ответа, причем спектр катализируемых реакций также может быть весьма широким: протеолиз [12], оксидоредуктазная активность [8], гиалуронидазная активность [2], ДНК-азная [11] и РНК-азная активность [1], протеинкиназная активность [4] и т.д. Тем не менее, к настоящему времени опубликовано лишь относительно небольшое количество работ, посвященных взаимосвязи поликлональной абзимной активности с патогенезом и клиническими проявлениями заболеваний, их лечением и возможным прогнозом [6, 12].

Учитывая, что при развертывании иммунного ответа в живом организме возникает широкий спектр АТ, различных по аффинности, представляется необходимым изучить появление поликлональных АТ с каталитической функцией *in vivo*. Их обнаружение особенно вероятно при аутоиммунных заболеваниях, в ходе процессов иммунизации, а также после иммунотерапии.

В настоящей работе нами впервые исследована протеолитическая (амидазная) активность (ПА) поликлональных IgG человека, выделенных из сывороток крови больных atopической бронхиальной астмой (БА) до и после проведенного курса специфической иммунотерапии (СИТ) аллергеном домашней пыли. Исследованиями Paul S. с соавт. уже показано увели-

чение уровня АТ с протеолитической активностью при БА [12]. Взаимосвязь между абзимной активностью ИГ при БА и проводимым специфическим лечением до сих пор не исследовалась.

Материалы и методы. Всего было обследовано 14 больных atopической БА среднего и легкого течения в возрасте от 18 до 47 лет, находившихся на лечении в аллергологическом отделении Витебской областной клинической больницы. У 12 из сыворотки IgG были выделены повторно после проведения СИТ и тестированы на амидазную активность. Специфическую иммунотерапию аллергеном домашней пыли проводили в стационаре классическим способом, вводя его подкожно в нарастающих дозах [9].

В работе были использованы бензоил-аргинин-нитроанилид (БАПНА) производства (Sigma), агароза, конъюгированная с белком *A* золотистого стафилококка (институт им. Пастера, г. С.-Петербург, Россия). Остальные реактивы - производства "Реахим" квалификации "хч" и "чда".

БАПНА-амидазную активность оценивали по методу [7] с нашими модификациями. Реакционная смесь состояла из 0.1 мл IgG на физиологическом растворе (конечная концентрация - 250 мкг/мл) и 0.2 мл раствора субстрата на 0.05 М Tris-HCl буфере pH 7.4. В контроле вместо ИГ добавляли равный объем физиологического раствора. Для определения БАПНА-амидазной активности сывороток к 0.1 мл физиологического раствора добавляли 10 мкл сыворотки. Остальные условия эксперимента не отличались от вышеописанных.

Инкубацию осуществляли в планшетах для иммуноферментного анализа в течение 20 ч. Измерения проводили на аппарате АИФ ЦОИС; результаты выражали в условных единицах (УЕ), эквивалентных единицам оптической плотности продукта реакции при 405 нм.

В качестве материала для исследования были использованы IgG подклассов 1,2 и 4, выделенные из сыворотки крови больных БА. Очистка проводилась в несколько стадий. Первые этапы (осаждение сыворотки крови риванолом, обработка надосадка активированным углем с последующей ДЕАЕ-хрома-

тографией на матрицах Toyopearl 650M или Молселект ДЕАЕ А50) осуществляли согласно рекомендациям [5]. Затем проводили аффинную хроматографию полученного материала на агарозе, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка. Колонку последовательно отмывали 0.1M фосфатным буферным раствором pH 7.2, содержащим 1% раствор Тритона X-305 и 0.02M фосфатным буферным раствором pH 7.2 без детергента до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся IgG вели 0.1M глицин-HCl буфером, pH 2.8. ИГ выделяли переосаждением в 40% растворе сульфата аммония и растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды. Далее препараты ИГ рехроматографировали в диссоциирующих условиях (0.1M глицин-HCl буфер, pH 2.8). Для гель-фильтрации применили колонку с матрицей для эксклюзионной хроматографии Toyopearl HW-55 fine (2,8x80 см). Собирали элюаты по 1.5-2 мл; для реакции использовали аликвоту, соответствующую вершине пика белка.

Контроль чистоты ИГ проводили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4-20% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях по соответствующим методам. В дальнейшем гель окрашивали Кумасси R250 или нитратом серебра.

До проведения анализов образцы сывороток и ИГ замораживали в жидком азоте с последующим хранением при -20°C. Концентрацию IgG в сыворотках определяли по методу Манчини [5].

Результаты и обсуждение

Полученные в результате очистки препараты иммуноглобулина содержали единственную белковую фракцию. Они содержали только IgG без примесей других классов иммуноглобулинов (IgM или IgA). При посеве содержимого препарата IgG на кровяной агар и среде Сабуро роста микроорганизмов обнаружено не было.

Результаты определения протеолитической активности ИГ и сывороток больных БА до и после СИТ приведены на Рис 1 и Рис.2.

Из рисунков 1 и 2 следует, что уровень удельной (на 250 мкг IgG) протеолитической активности ИГ больных астмой до проведения СИТ (M+m) составил 0,041±0,003 УЕ, после проведения СИТ он снизился и составил 0,027±0,003 УЕ (достоверность различий по критерию Стьюдента между группами p=0,004). Аналогичное соотношение сохранилось и после пересчета ПА ИГ на общую концентрацию IgG в сыворотках больных.

При оценке ПА сывороток крови больных до и после СИТ достоверных различий обнаружено не было (p=0,17), причем общая протеолитическая активность сывороток после СИТ имела тенденцию к увеличению. Соответственно, если до проведения иммунотерапии мы обнаружили средней силы положительную корреляцию между уровнем ПА ИГ и ПА сыворотки (r=0.54, p=0.056), то после проведения СИТ такая зависимость не наблюдалась.

Доля протеолитической активности, приходящаяся на ПА ИГ, от общей протеолитической активности сыворотки в изучаемых группах составила от 0.9% до 15,7%. Это в целом соответствует данным, полученным Paul S. с соавт. для протеолитической активности IgG при БА [12].

Таким образом, нами впервые получены результаты, касающиеся возможного участия абзимов в механизме действия специфической иммунотерапии при БА. Этот механизм до настоящего времени полностью не изучен [3]. Большинство исследователей связывают эффект СИТ с увеличением концентрации IgG₄, IgG₁, соответствующим уменьшением содержания IgE и переключением T_H2-зависимого иммунного ответа на T_H1-ответ [3].

В свою очередь, изучение ферментативно активных АТ при БА только начинается и пока нет данных, касающихся роли подобных АТ в патогенезе БА. Показано [13] лишь достоверное увеличение ИГ класса IgG, обладающих протеолитической активностью, при данном заболевании.

Полученные нами данные свидетельствуют, что существует более высокий уровень БАПНА-абзимной активности до проведения СИТ. Можно предположить, что после курса иммунотерапии происходит селекция высокоаффинных клонов лимфоцитов с уменьшением доли каталитически активных ИГ данной БАПНА-специфичности. Вероятно, после СИТ увеличивается количество алергенспецифических IgG-абзимов (антител). На это указывает увеличение протеолитической активности сыворотки крови после СИТ. Такое предположение согласуется с данными [3,9] о нарастании уровня IgG-антител после СИТ. Поэтому можно считать, что нами получено косвенное подтверждение гипотезы о том, что основным механизмом обеспечивающим положительные результаты СИТ является образование изоформ алергенспецифических ферментов [9]. Данное исследование указывает на то, что это могут быть IgG-абзимы.

Считается, что каталитически активные АТ могут быть продуктами germ-line-генов, и, соответственно, они первыми реагируют на поступление АГ в организм. В дальнейшем происходит пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов с отбором высокоафф-

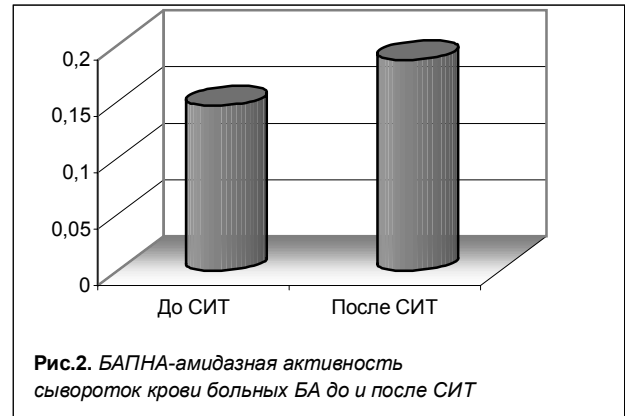
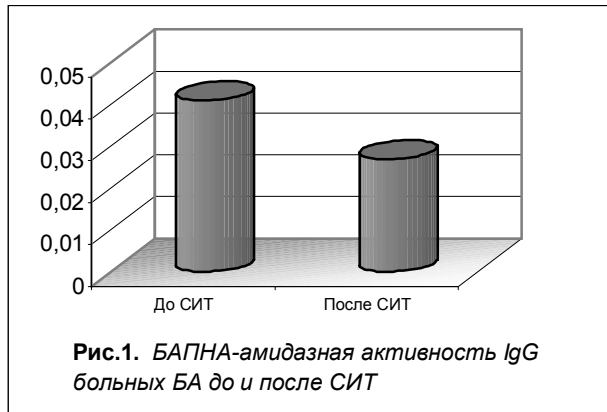
финных клонов. Образующиеся при этом АТ уже прочно связывают АГ без каталитического действия.

БАПНА-амидазная активность ИГ представляет собой аналог общей протеолитической активности АТ. Однако при иммунотерапии применяется ограниченный набор строго специфических для данного больного аллергенов. Отсюда вероятно, что наиболее перспективным направлением для дальнейших исследований следует считать изучение протеолитического действия ИГ на конкретные аллергены, используемые для проведения СИТ.

Выводы

1. После проведения курса специфической терапии аллергеном домашней пыли БАПНА-амидазная активность IgG у больных бронхиальной астмой снижается.

2. IgG-абзимы могут участвовать в механизмах толерантности к аллергену.



Литература

1. Бунева В.Н., Андриевская О.А., Романникова И.В. и др. // Мол.биол. - 1994.- Vol.28, N4. - P.738-743.
2. Генералов И.И., Азаренок К.С., Доценко Э.А., Окулич В.К. //Актуальные вопросы патогенеза и терапии инфекционных и паразитарных болезней. - Л., 1987. - С.10 - 16.
3. Горячкина Л.А., Астафьева Н.Г. Специфическая терапия аллергических заболеваний. - М., 1998.
4. Кит Ю.Я., Семенов Д.В., Невинский Г.А. //Мол.биол. - 1995. - Т.29, N4. - С.893 - 905.
5. Иммунологические методы: Пер. с нем./Под ред. Г.Фримеля. - М., 1987.
6. Козырь А.В., Колесников А.В., Яхнина Е.И. и др.//Бюлл.эксп.биол.мед. - 1996. - N2. - С.204-206.
7. Конорев М.Р., Генералов И.И. //Здравоохр. Беларуси. - 1994. - N3. - С.13-15.
8. Кульберг А.Я., Петяев И.М. //Иммунология. - 1988. - N 6. - С.10 - 13.
9. Новиков Д.К. Клиническая аллергология. – Мн.-Высшая школа-1991.
10. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981.
11. Gololobov G.V., Chernova E.A., Schourov D.V. et al. //Proc.Natl.Acad.Sci.USA. - 1995. - Vol.92 - P.254-257.
12. Kalaga R., Li L., O'Dell J.R., Paul S.//J.Immunol. - 1995. - Vol.155, N5. - P.2695-2702.
13. Paul S., Volle D.J., Beach C.M., Johnson D.R., Powell M.J., Massey R.J. // Science. - 1989. - V.244, N4909. - P.1158.
14. Schultz P.G., Lerner R.A. //Science. - 1995. - V.269, N5232. - P.1835.