

ОКУЛИЧ В.К.,
КОСИНЕЦ А.Н.,
МОСКАЛЕВ К.В.,
СЕНЬКОВИЧ С. А.
Витебский Государственный
медицинский университет,
Витебск, Беларусь

УДК 617-089:616.9

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ IgG У БОЛЬНЫХ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Исследование гнойно-воспалительных заболеваний остается актуальным, так как даже использование современных схем комплексного хирургического лечения, включая этиотропное, во многих случаях не приводит к быстрому выздоровлению больных. Разработка патогенетической терапии возможна только на основе знания глубоких механизмов взаимодействия микроорганизма с иммунной системой макроорганизма. Исследование известных показателей иммунной системы (уровень IgG, М, А, фагоцитоза, специфических антител (АТ) к антигенам микроорганизма и т. п.) не всегда отражает реальное взаимодействие между микро- и макроорганизмом. Так, обычно не учитывается эффект воздействия условно патогенной флоры и ее ферментов инвазии и агрессии как на прилежащие к гнойно-септическому очагу здоровые ткани, так и их воздействие на системы организма больного в целом. В клинической практике используются только сравнительно небольшой спектр иммунологических показателей, связанных с ответом иммунной системы организма на ферменты микроорганизмов, например, определяют антитела к стрептококковой гиалуронидазе, антистрептолизину. В то же время многие аспекты иммунного ответа на факторы агрессии и инвазии микроорганизмов остаются малоизученными.

В последние годы выявлены антитела, обладающие собственными ферментными свойствами [15]. Данные антитела, в результате идиотип-антиидиотипических взаимодействий и посттрансляционной ковалентной модификация иммуноглобулинов, могут вызывать образование ИГ,

которые способны приобретать свойства первичного антигена (АГ), в том числе и ферментативные [12]. Данные ИГ получили название абзимы (от английской аббревиатуры antibody-enzyme) или каталитически активные АТ [11]. К настоящему времени выделены природные абзимы из сывороток больных с различными аутоиммунными заболеваниями и вирусными инфекциями, обладающие протеолитической, эндонуклеазной, гиалуронидазной, пероксидазной, амилазной активностью [1,2,3,4,15]. Каталитические АТ являются нормальным компонентом иммунного ответа. Опубликован обзор, посвященный природным каталитическим ИГ [13]. Их образование связано с феноменом антиидиотипического взаимодействия [6, 12]. В итоге образуются АТ, имеющие активный центр, подобный активному центру фермента – абзим. Отмечено, что уровень ферментативной активности АТ, при иммунизации различными АГ, зависит от генетических факторов организма, определяющих каталитический иммунный ответ [16]. Существует мнение, что каталитическая инактивация АГ представляется гораздо более эффективной, чем обычное образование иммунного комплекса [17]. Удалось также получить абзимы, ускоряющие реакции и не имеющие в природных условиях соответствующих ферментов [14].

На ферменты инвазии и агрессии микроорганизмов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями согласно этой теории должны образовываться АТ, имеющие ферментативную активность подобную этим факторам. Процесс их инак-

тивации в условиях макроорганизма длительный и практически зависит от периода полураспада ИГ. Подобные абзимы могут оказывать свое воздействие на макроорганизм очень длительно и более “мягко”, по сравнению с ферментами макро- и микроорганизма. Воздействие их может носить как отрицательный эффект, расщепляя биологические субстраты, необходимые макроорганизму для жизнедеятельности, или, способствуя агрессии микроорганизмов (разрушая, например гиалуроновую кислоту, белки, ДНК и т.п.), так и, возможно, положительное воздействие, инактивируя микроорганизм и изменяя среду его обитания.

Материалы и методы. В нашей работе мы исследовали амилазную и бензоил-аргинин-*p*-нитроамидазную (БАПНА)-амидазную активности (трипсин подобную) поликлональных ИГ и сывороток больных с хирургической инфекцией и контрольной группы без гнойно-воспалительных осложнений. Всего было обследовано 82 больных, в возрасте от 18 до 47 лет, находившихся на лечении в 1-ой и 2-ой хирургическом отделениях Витебской областной клинической больницы (см. таблицу 1).

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

Кровь брали утром натощак из локтевой вены в количестве 15-20 мл. Все ИГ выделялись из сывороток в день забора крови.

Очистка проводилась в несколько стадий. Первый этап - осаждение сыворотки крови риванолом, обработка надосадка активированным углем [5]. Затем проводили аффинную хроматографию полученного материала на агарозе, конъюгированной с протеином *A* золотистого стафилококка. Колонку последовательно отмывали 0.01 М фосфатным буферным раствором pH 7.2, содержащим 1% раствор твин 20 и 0.01М фосфатным буферным раствором pH 7.2 без детергента до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся IgG вели 0.1 М глицин-HCl буфером, pH 2.8, которую контролировали по выходу белка с помощью метода Бредфорда [9,10]. Полученные ИГ концентрировали и дополнительно очищали - переосаждением в 40% растворе сульфата аммония, растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и диализовали против 2,5 л 0,9% NaCl минимум четыре раза. Препарат ИГ для исследований содержал только IgG подклассов 1, 2 и 4.

До проведения анализов образцы сывороток и ИГ замораживали в жидком азоте с последующим хранением в нем или при -20°C в холодильнике.

Контроль чистоты ИГ проводили с помощью электрофореза в 10% и градиентном 4-20% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а гель окрашивали Кумасси R250 или нитратом серебра [8].

БАПНА-амидазную активность фракции IgG сыворотки крови определяли по методу Эрлангера в нашей модификации [7]. В качестве субстрата протеолиза использовали бензоиларгинин-*p*-нитроанилид (БАПНА). Выбор субстрата обусловлен тем, что распад БАПНА происходит только в результате расщепления амидной (аналога пептидной) связи по аминокислотам Arg-Lis. Реакционная смесь состояла из 0.1 мл IgG на физиологическом растворе (конечная концентрация - 750 мкг/мл) и 0.1 мл раствора субстрата на 0.05 М Tris-HCl буфере pH 7.4. В контроле вместо ИГ добавляли равный объем физиологического раствора. Инкубацию осуществляли в планшетах для иммуноферментного анализа или культивирования клеток в течение 20 ч. Измерения проводили на анализаторе иммуноферментном фотоэлектрическом АИФ-Ц-01С; результаты выражали в ркат. Для определения БАПНА-амидазной активности сывороток к 200 мкл раствора БАПНА добавляли 5 мкл исследуемой сыворотки и инкубировали 20ч. Активность определяли, вычитая результат оптической плотности до инкубации от результата после инкубации. Полученные данные по калибровочной кривой переводили в пкат.

Амилазная активность сывороток и IgG определялась следующим образом. В лунки планшеты добавляли 100 мкл исследуемой пробы IgG на 0,9% NaCl в концентрации 0,5 мг/мл и 100 мкл раствора крахмала. Раствор предварительно готовили, добавляя к 200 мг крахмала 5 мл 1,8% NaCl и 5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,4 (подогревают до образования прозрачного раствора). Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 часов и 20 мкл пробы добавляли к 2 мл йодного раствора, содержащего 40 мкл 0,5 М раствора KJ₂ и 1 мл 1N HCl в 100 мл дистиллированной воды. Измерение проб проводили на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda=650$ нм. Полученные данные, используя калибровку по графику [$\varepsilon=exp(a+bx)$] с коэффициентом корреляции $r=0,95$, переводили в условные единицы (УЕ) по стандартному ферменту амилазе.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере модели IBM PC AT/586 используя пакеты прикладных программ.

Результаты и обсуждение

Полученные в результате очистки препараты иммуноглобулина содержали только IgG без примесей других классов иммуноглобулинов (IgM или IgA). При выборочном контроле стерильности полученных препаратов IgG роста микроорганизмов не получено.

Значимой корреляции между уровнями активности сывороток и соответствующих им препаратов IgG выявлено не было. Также не прослеживалось явной зависимости уровня каталитической активности антител от вида микроорганизма, выявленного от больного с гнойно-воспалительным заболеванием.

В результате исследования достоверной разницы в уровнях амилазной активности сывороток и препаратов IgG опытной и контрольной группы обнаружено не было (соответственно для сывороток 228,72±13,28 и 241,56±17,88 УЕ, для IgG 1,76±0,29 и 1,8±0,229 УЕ; см таблицу 1).

При исследовании БАПНА-амидазной активности сывороток достоверной разницы между группами также обнаружено не было (опытная - 1,04±0,12 пкат, контрольная - 1,33±0,13 пкат).

Средний уровень БАПНА-амидазной активности препаратов IgG опытной группы достоверно ($p < 0,05$) превышал таковой контрольной группы (опытная 0,47±0,088 пкат, контрольная - 0,16±0,03 пкат). При этом пациенты с БАПНА-амидазной активностью IgG превышающим средний уровень активности контрольной группы более чем на 3 раза встречались только в опытной группе (11 наблюдений - 22%).

Таблица 1

Результаты исследования амилазной и БАПНА-амидазной активности сывороток и ИГ

Исследуемая активность	Больные без гнойно-септических осложнений	Больные с гнойно-септическими осложнениями
Амилазная активность сывороток	241,56±17,88 УЕ (n=39)	228,72±13,28 УЕ (n=39)
Амилазная активность ИГ	1,8±0,229 УЕ (n=35)	1,76±0,29 УЕ (n=57)
БАПНА-амидазная активность сывороток	1,33±0,13 пкат (n=40)	1,04±0,12 пкат (n=40)
БАПНА-амидазная активность ИГ	0,16±0,03 пкат (n=32)	0,47±0,088 пкат (n=50)

В данной работе приведены промежуточные данные, которые нуждаются в детализации по группам в зависимости от выраженности воспалительного процесса, проводимого лечения, состояния больного, других показателей системы иммунитета. Полученные результаты только подтверждают достоверное увеличение лиц с повы-

шенным уровнем БАПНА-амидазной активности среди больных с гнойно-септическими процессами в сравнении с больными без гнойно-воспалительных осложнений. В связи с этим предстоит уточнить роль ИГ с протеолитической активностью в патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний.

Литература

1. Азаренок К.С., Генералов И.И., Доценко Э.А. Иммуноглобулины класса G с гиалуронидазной активностью и возможные механизмы их образования // Иммунология. - 1989. - №2. - С. 15-17.
2. Барановский А.Г., Матушин В.Г., Власов А.В. и др. ДНК- и РНК-гидролизующие антитела из крови пациентов с различными формами вирусных гепатитов // Биохимия. - 1997. - Т.62, N12. - С.1358-1366.
3. Генералов И.И., Шур И.И., Железняк Н.В. ДНК-азная активность иммуноглобулинов // Реферативный журнал. Иммунология. Аллергология. - Витебск, 1992. - 5С.- Деп. в ВИНТИ 14.07.92, №2290 - В92.

4. Жильцов И.В., Генералов И.И., Доценко М.Л. Ферментативная активность препаратов IgG у больных вирусными гепатитами // Проблемы современной медицины и фармации. - тез.докл. 53-й научной сессии ВГМИ. - Витебск, 1998. - Ч.1. - С. 109.
5. Иммунологические методы: Пер. с нем./Под ред. Г.Фримеля. - М., 1987. - 5.
6. Иммунология. / под ред У. Пола. - М., 1988. - Т.2.
7. Москалев К.В., Конорев М.Р., Азаренок К.С. Гидролиз бензоиларгинин-р-нитроанилида поликлональными антителами // Реферативный журнал. Иммунология. Аллергология. - 1990. - №12. - С. 44.
8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). - М., 1981.
9. Шишкин С.С. Использование связывания красителей для количественного определения содержания белка в растворах (обзор). // Вопросы медхимии. - 1982 - №5. - С.134-141.
10. Bradford M. M. - Ibid., 1976. - Vol.72. - P.248.
11. Leatherbarrow R.J. Designer catalytic antibodies // Nature. - 1989. - Vol. 338. - P. 206-207.
12. Monroe J.G., Green M.I. Anti-idiotypic antibodies and disease // Immunol. Invest. - 1986. - Vol. 15, № 3. - P. 263-286.
13. Paul S. Natural catalytic antibodies // Mol.Biotechnol. - 1996. - Vol.5, №3. - P. 197-207.
14. Schultz P.G., Lerner R.A. //Science. - 1995. - V.269., N5232. - P.1835.
15. Shuster A.M., Gololobov G.V., Kvashuk O.A. DNA hydrolyzing autoantibodies // Science. - 1992. - Vol.256, №5057. - P. 665-667.
16. Stephens D.B., Thomas R.E., Stanton J.F., Iverson B.L. Polyclonal antibody catalytic variability // Biochem J. - 1998, Vol.332, Pt.1. - P. 127-134. .
17. Sun M., Gao Q.S., Li L. Proteolytic activity of an antibody light chain. // J. Immunol. - 1994. - Vol.153, №11. - P. 5121-5126.