УДК 612.017.11 : 616 - 07

Цыбиков Н.Н., Терешков П.П., Кузник Б.И.

АУТОАНТИТЕЛА-АБЗИМЫ К ЭНДОТЕЛИНУ-1 (1-22)

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г.Чита

Из пулированной сыворотки крови доноров методом аффинной хромотографии выделены аутоантитела к эндотелену-1(1-21) и доказана их абзимная активность.
***Ключевые слова**: эндотелин-1(1-21), аутоантитела, абзимы.*

Tsybikov N.N., Tereshkov P.P., Kuznik B.I.
AUTOANTIBODIES-ABZYMES TO ENDOTHELIN-1 (1-22)
Antibodies to endothelin-1(1-21) were isolated from donors' pooled blood serum by affinity chromatography, with their abzyme activity being proved.
***Key words:** endothelin-1(1-21), autoantibodies, abzymes.*

Ранее нами показано, что к различным соединениям в организме образуются аутоантитела (аАТ), выполняющие гомеостатическую функцию. Такие аАТ описаны к активным факторам свертывания крови [3, 4], нейромаркерам [11], интерлейкинам [7], эндотелину-1 (Эн-1) [10]. Аутоантитела закономерно обнаруживались в различных компартментах организма (кровь, ликвор, назальный секрет, слезная и десневая жидкости, смешанная слюна) [13]. В сыворотке крови аутоантитела в основном были представлены IgG, в секретах - sIgA [8, 12]. Вместе с тем, в последние годы, описаны так называемые антитела-абзимы (антитела с ферментативной активностью), способные не только связывать антигенные эпитопы, но и каталитическим образом разрушать их. Впервые они были открыты в лаборатории А.Я. Кульберга и др. [6], которые показали, что при хранении чистых антител кролика наступает протеолиз иммуноглобулинов. Они же предложили, что подобная закономерность связана с экспонированием на молекуле антител-антиидиотипов ферментативного центра с протеазной активностью. Позже антитела-абзимы были обнаружены как в норме, так и при разнообразной патологии [2].

При взаимодействии абзимов с антигенами происходит реакция фермент-субстрат без привлечения компонентов комплемента и рекрутирования цитолитических лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, т.е. без развития эффекторной "бури", характерной для реакции антиген-антитело. На наш взгляд, такой способ элиминации антигенов и аутоантигенов представляется оптимальным в регуляции уровня биологически активных веществ (цитокинов, нейромаркеров, ферментов, вазомоторных соединений), создающих наибольшую опасность в инициации нарушений гомеостаза организма и поэтому подлежащих жесткой регуляции. Одним из таких соединений является Эн-1 (1-21), гиперпродукция которого сопровождается как местной, так и общей вазоконстрикцией [5]. Однако до настоящего времени не описан абзимный механизм элиминации Эн-1 (1-21), что и явилось основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования состояла в обнаружении аутоАТ к Эн-1 (1-21) в сыворотке крови здоровых доноров.

Материал и методы. Выделение IgG к Эн-1 (1-21) проводили с помощью последовательной аффинной хроматографии сывороточных протеинов (пулированная сыворотка доноров, 10 образцов). Аффинную колонку готовили из патрона ДИАПАК ("Биохиммак СТ", Россия), заполненного бромцианактивированной сефарозой (4B CNBr-activated ("Pharmacia", Швеция). Активацию аффинного абсорбента и посадку лиганда проводили по методике M. Page, R. Thorpe (2002) [14]. В качестве лиганда

использовали стандарт Эн-1(1-21) 4,3 kD из ИФА набора ENDOTHELIN (1-21) ("Biomedica", США), предварительно очищенного от белков плазмы человека ультрацентирифугированием через целлюлозный мембранный фильтр 10 kD ("Millior", Ирландия). Активированную аффинную колонку промывали натрийфосфатным буфером (PBS: 0,14 M NaCI,2,7 m M KCI, 1,5 mM KH2PO4, 8,1 mM Na_2HPO_4) до нулевой оптической плотности (A_{280}). Сыворотку крови, разбавленную 1:4 буфером PBS, вводили в колонку и инкубировали 2 ч. при комнатной температуре. Колонку промывали буфером PBS от неспецифически связанных белков до нулевой оптической плотности. Иммуноглобулины были элюированы 8М мочевиной, фракции помещены в охлажденные пробирки. Освобождение от мочевины и концентрирование иммуноглобулинов проводили ультроцентрифугированием через целлюлозный мембранный фильтр 10 kD с последующим промыванием буфером PBS. Белок, соответствующий фракции иммуногболулинов, был собран и доведен до объема 100 мкл буфером PBS с NaN_3.

Определение концентрации и фракционного состава иммуноглобулинов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке для гельфильтрационной/гельэксклюзионной хроматографии биополимеров BioSep-Ses-S 2000 300x7.80 mm ("Phenomenex", США). Элюент - 100 мМ фосфатный буфер pH 6,4 содержащий 300 мМ NaCI, скорость потока 1 мл/мин, давление 36 бар, длина волны 280 нм. В качестве калибровочного стандарта использовали фракцию гамма-глобулина ("ICN", США). ВЭЖХ комплекс LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) состоящий из спектрофотометрического детектора с диодной матрицей SPD-M20A, насос высокого давления LC-20AD, ручного инжектора 7725i Rheodyne (США) с петлей на 20 мкм. Комплекс для аффинной хроматографии и гельфильтрации (FPLC) включал в себя насос высокого давления "Marathon-II (Rigas Labs, Греция по лицензии "Alltech Ass.", США) и УФ-детектор UV-106 ("Linear", США) с фильтром на 280 нм. Ультрацентрифуга SIGMA 3K30 ("Sigma", США).

Определение БАПНА-амидазной активности проводили спектрометрическим методом, используя в качестве субстрата раствор натрия-бензоил-DL-аргинин-4(n)-нитроанилина гидрохлорида (БАПНА) ("Sigma", США) оригинальным методом.

Результаты и обсуждение. Элюаты из колонки BrCn4B-Эн-1 (1-21) обессолены и концентрированы ультрафильтрацией. Идентифицировано по молекулярной массе и ИФА анализу три пика: IgA, IgD и IgG (рис.).

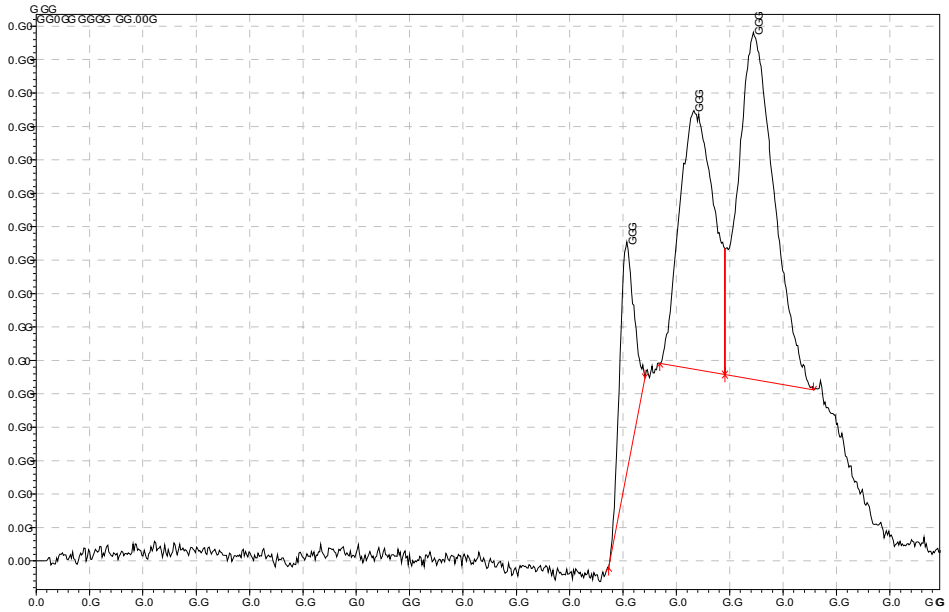

Рис. Хроматограмма экстрактов аутоантител к Эн-1 (1-21) пулированной сыворотки доноров.

Для дальнейших исследований использован элюированный IgG, абсолютное содержание которого составило 62,50 мкг/мл. После инкубации аутоантител с раствором БАПНА зарегистрирована положительная БАПНА-амидазная активность. По калибровочной кривой с р-нитроанилином протеазная активность аутоантител класса IgG к Эн-1 (1-21) составила 19,22 пкат на мг белка. Таким образом, в пулированной сыворотке доноров обнаружены аАТ к Эн-1(1-21), обладающие абзимной активностью.

Следует сразу указать, что аутоантитела-абзимы к Эн-1 (1-21) ранее не были описаны. На наш взгляд эти соединения входят в конструкцию жесткой регуляции биологически активных вазоконстрикторов - эндотелинов. Последние как в условиях нормы, так и патологии, доминируют в регуляции микроциркуляции. Избыточная продукция Эн-1 (1-21) опасна блокадой микроциркуляции с образованием зон ишемии [4]. Эффективными элиминаторами эндотелинов могут быть аутоантитела с абзимной активностью, снижающие уровень вазоконстрикторов путем субстрат-ферментных взаимоотношений. Такой механизм регуляции Эн-1 (1-21) представляется оптимальным, т.к. не требует активации системы комплемента, рекрутации in situ воспалительных клеток, т.е. без формирования эффекторной "бури" в отличие от классической реакции антиген-антитело.

Но смысл наличия аутоантител к Эн-1 (1-21) заключается не только в этом. Согласно представлениям В.Н.Титова [9], в организме многоклеточных происходит сочетанное по времени чередование вазоконстрикции и вазодилатации, что может обеспечивать волнообразное сокращение стенки сосудов и функции каждой артериолы мышечного типа как индивидуального перистальтического насоса. Высказано предположение, что гуморальными регуляторами перистальтического насоса в процессе эволюции стали оксид азота и эндотелины. При этом волна перистальтики образует бегущую волну, благодаря чему должна передвигаться кровь по кровеносным сосудам.

Известно, что оксид азота является короткоживущей молекулой, тогда как срок жизни эндотелина по сравнению с NO отличается значительной продолжительностью. В этих условиях действие Эн-1 (1-21) должно преобладать над влиянием NO. По всей видимости, аутоантитела к Эн-1 (1-21), обладающие абзимной активностью, могут в чрезвычайно короткие промежутки времени удалять избыток мощного вазоконстриктора - эндотелина-1 и тем самым являться не только регуляторами кровяного давления, но и кровотока.

Академик И.П. Ашмарин [1], назвал аутоантитела к биологически активным соединениям "долгосрочными регуляторами гомеостаза". Не вызывает сомнения, что образование аАт с абзимной активностью к Эн-1 (1-21) является пожизненным процессом и играет существенную роль в поддержании нормальной деятельности сердечно-сосудистой системы. Не исключено, что нарушение функции образования аАт к эндотелину является одним из факторов развития гипертензий и гипертонической болезни.

Таким образом, в крови здоровых людей содержатся аутоантитела к Эн-1 (1-21), обладающие абзимной активностью. Дальнейшее изучение этой проблемы позволит решить вопрос, какую роль играют аутоантитела к Эн-1 (1-21), обладающие ферментативной активностью, в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Ашмарин И.П. Нейрохимия / И.П. Ашмарин, П.В. Стукалов. - М.: Медицина, 1996. - С. 470.
2. Генералов И.И. Абзимы (каталитические антитела): применение в медицине / И.И. Генералов, Е.В. Кундер, А.М. Моисеева // Иммунология. - 2009. - № 2. - С. 123 - 128.
3. Кузник Б.И. Выявление аутоантител к факторам свертывания крови реакцией

пассивной гемагглютинации и иммуноферментным (ELISA) методом / Б.И. Кузник, Н.Н. Цыбиков, М.П. Рудник // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1985. - № 4. - С. 468 - 469.
4. Кузник Б.И. Иммунный механизм регуляции гемостаза / Б.И. Кузник, Н.Н. Цыбиков // Гематология и трансфузиология. - 1986. - № 2. - С. 23 - 28.
5. Лупинская З.А. Эндотелий сосудов - основной регулятор местного кровотока / Вестник Кыргызско-Российского Славянского Университета. - 2003. - № 7. - С. 67 - 71.
6. О протеолитической активности в препаратах очищенного иммуноглобулина G и антител кролика / А.Я. Кульберг [и др.] / / Биохимия. - 1969. - Т. 34, вып. 6. - С. 1178 - 1183.
7. Содержание провоспалительных цитокинов, эндотелина-1 и аутоантител к ним при аутоиммунном тиреоидите / Н.Н. Цыбиков [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. - 2009. - № 3. - С. 17 - 19.
8. Содержание некоторых цитокинов и аутоантител к ним в сыворотке крови, ротовой и зубодесневой жидкости при одонтогенных абсцессах ЧЛО / Н.Н. Цыбиков [и др.] // Стоматология. - 2010. - № 5. - С. 15 - 16.
9. Титов В.Н. Диагностическое значение эндотелийзависимой вазодилатации // Клиническая лабораторная диагностика. - 2009. - № 2. - С. 3 - 16.
10. Уровень эндотелина-1 и аутоантител к нему при аутоиммунных тиреопатиях / Цыбиков [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. - 2009. - №. 4. - С. 153 - 155.
11. Цыбиков Н.Н. Уровень мозгоспецифического белка S-100B, аутоантител к нему и цитокиновый профиль у больных алкогольным делирием / Н.Н. Цыбиков, Е.А. Цыбикова // Медицинская иммунология. - 2008. - Т. 10, № 1. - С. 85 - 88.
12. Цыбиков Н.Н. Роль цитокинов и аутоантител к ним в патогенезе развития ретинопатии у больных сахарным диабетом 2 типа / Н.Н. Цыбиков, О.Л. Шовдра // Дальневосточный медицинский журнал. - 2010. - №. 2. - С. 83 - 86.
13. Цыбиков Н.Н. Маркер повреждения мозга - NSE в крови и носовом секрете у больных с ЧМТ и хроническими ринитами / Н.Н. Цыбиков, Е.В. Егорова, Р.П. Свирский // Кубанский научный медицинский вестник. - 2010. - № 3-4. - С. 63 - 65.
14. The Protein Protocols Handbook: Second Edition / edited by John M. Walker. // - Humana Press Inc., Totowa, NJ. - 2002. - p. 1148.