

*Марина СТАРИКОВИЧ*

## **БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ У НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ**

*Інститут біології клітини НАН України*

*Порівняно дію препаратів імуноглобулінів плазми крові хворих на розсіяний склероз та молозива клінічно здорових породіль на клітинній лінії Т-лімфоцитів Jurkat. З'ясовано, що Ig із плазми крові хворих РС виявляли цитотоксичну і цитостатичну дію. Препарати Ig молозива клінічно здорових породіль проявляли свою дію подібно до зразків хворих автоімунним захворюванням, однак в деяких випадках мали проліферативну активність. Методом електрофорезу ДНК у гелі агарози виявлено, що Ig досліджуваних зразків проявляють свою цитотоксичну дію щодо Т-клітин лінії Jurkat шляхом апоптозу. Було виявлено, що препарати Ig виділені із сироватки крові хворих на РС та молозива клінічно здорових породіль гідролізують надспіралізовану плазмідну ДНК. Ми з'ясували, що високоочищені препарати sIgA, виділені з молозива породіль, гідролізують гістон H1. Антитіла класу IgG із подібною субстратною специфічністю також було знайдено у сироватці крові хворих на розсіяний склероз.*

Схильність до автоімунних захворювань має генетичні підстави у людей і у тварин. Численні віруси, бактерії, хімічні агенти, токсини та ліки можуть стати чинниками, які запускають автоімунні реакції. Цей механізм функціонує за допомогою процесу молекулярної мімікрії або неспецифічного запалення. Значну роль у розвитку автоімунних порушень відіграють клітини імунного захисту. У відповідь на ураження організму позаклітинними чинниками В- клітини можуть стати гіперактивними і завдяки цьому простежуватиметься високий рівень циркулюючих антитіл або імуноглобулінів.

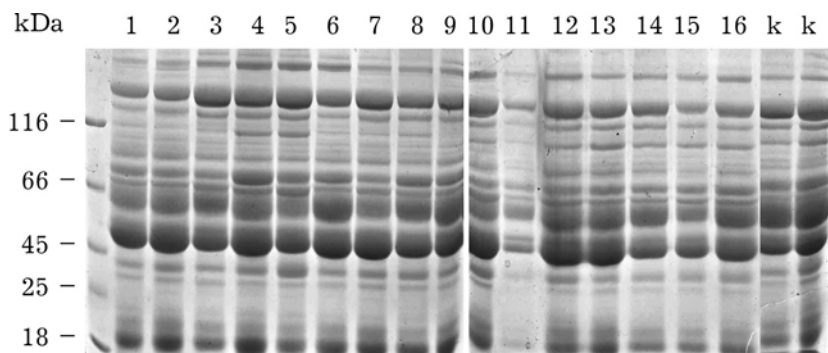
Мета нашої праці — вивчити рівень імуноглобулінів (Ig) та їхньої цитотоксичної та каталітичної активності у молозиві клінічно здорових породіль та у плазмі крові пацієнтів хворих на розсіяний склероз.

Зразки молозива (2 мл) отримували у Львівському обласному пренатальному центрі МОЗ України. Плазму крові хворих на розсіяний склероз (РС) отримували у Львівському обласному центрі розсіяного склерозу. Препарати Ig отримували триразовим переосадженням дослідних зразків 50 % сульфатом амонію [1]. Як об'єкт для дослідження цитотоксичної і проапоптичної дії Ig використовували людські лейкоцитні Т-лімфоцити лінії Jurkat. Лінію клітин Jurkat одержали з колекції Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р.Є.Кавецького

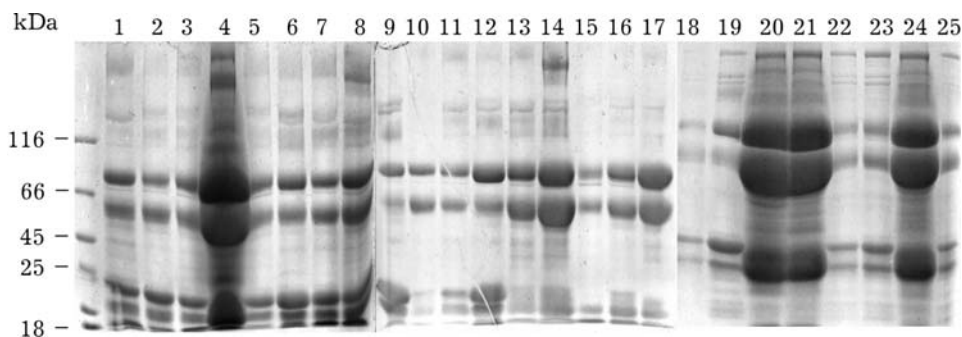
НАН України (м. Київ).

Визначення життєздатності Т-клітин лінії Jurkat за дії препаратів Ig проводили, використовуючи 0.1% водний розчин вітального барвника трипанового синього і підраховуючи загальну кількість незафарбованих (живих) і зафарбованих (мертвих) клітин у гемоцитометричній камері під світловим мікроскопом. Ознаки апоптозу в Т-клітинах лінії Jurkat під впливом досліджуваних препаратів Ig виявляли за проявом фрагментації ДНК цих клітин під час її електрофорезу в гелі агарози, як описано в [7]. Каталітичну активність препаратів Ig досліджували за їхньою здатністю гідролізувати плазмідну ДНК та гістон H1. Топоізомеразну активність препаратів Ig визначали як описано в [9]. Як субстрат використовували плазмиду pBR 322 (Fermentas, Литва). Протеазну активність препаратів Ig визначали згідно з [8].

Препарати імуноглобулінів (Ig) отриманих із молозива 25 клінічно здорових породіль та з плазми крові 16 хворих на РС перевіряли електрофорезом у градієнті концентрації (6 – 17.5 %) ПААГ (рис. 1, 2).



**Рис. 1.** Електрофорез у градієнті концентрації (6 – 17.5 %) ПААГ Ig плазми крові хворих на розсіяний склероз та зразків плазми крові клінічно здорових пацієнтів.

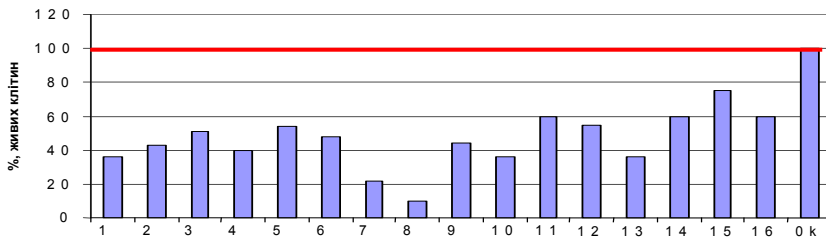


**Рис. 2.** Електрофорез у градієнті концентрації (6 – 17.5 %) ПААГ Ig молозива клінічно здорових породіль.

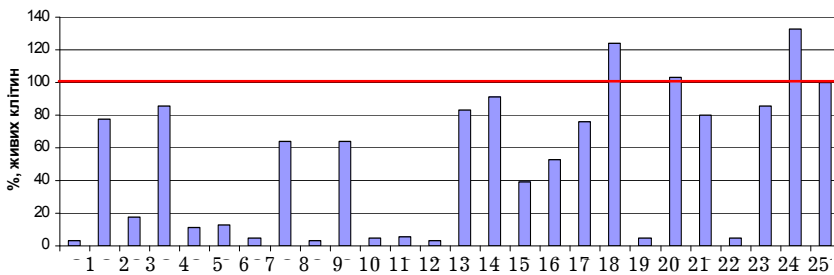
Для зразків Ig хворих на РС було виявлено що вони складаються здебільшого з Ig трьох класів: IgG, IgA, та IgM і це співвідношення імуноглобулінів не відрізняється від зразків плазми крові клінічно здорових пацієнтів. Результати електрофорезу за денатуруючих умов для препаратів Ig отриманих із молозива засвідчили, що вони складаються головним чином із імуноглобулінів класу IgM, та sIgA [2]. Крім того, в цих зразках було виявлено також IgG, бета-казеїн та лактоальбумін.

Цитотоксичну активність цих препаратів визначали на підставі даних, отриманих після фарбування клітин вітальним барвником трипановим синім (рис. 3, 4).

З'ясовано, що Ig із плазми крові хворих РС Ig із плазми крові хворих РС за дією на Jurkat клітини характеризувались різнонаправленою дією. У дев'яти випадках (пацієнти 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13) Ig виявляли цитотоксичну дію ( $\Delta 35\% \pm 11.9$ ).



**Рис. 3.** Цитотоксичний тест на визначення кількості живих лейкемічних Т-лімфоцитів лінії Jurkat за дії препаратів Ig хворих на РС, використовуючи барвник трипановий синій.



**Рис. 4.** Цитотоксичний тест на визначення кількості живих лейкемічних Т-лімфоцитів лінії Jurkat за дії препаратів Ig з молозива здорових породіль, використовуючи барвник трипановий синій.

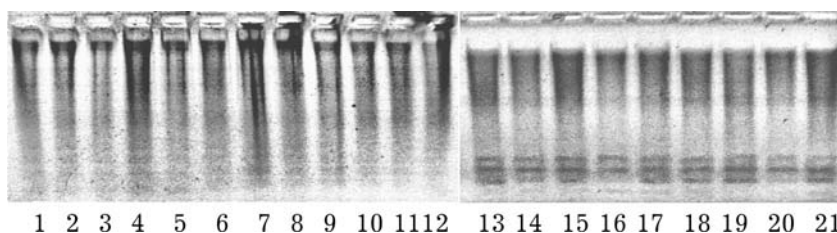
У семи випадках (пацієнти 3, 5, 11, 12, 14, 15, 16) дія Ig характеризувалася тенденцією до зниження своїх цитотоксичних активностей щодо Т-лімфоцитів ( $\Delta 59.2\% \pm 7.7$ ). Можна зауважити, що величина відсотка виживання клітин під дією Ig плазми крові хворих РС загалом характеризується достатньо великими коливаннями і це можна пов'язати з індиві-

дуальними особливостями патогенезу цього захворювання.

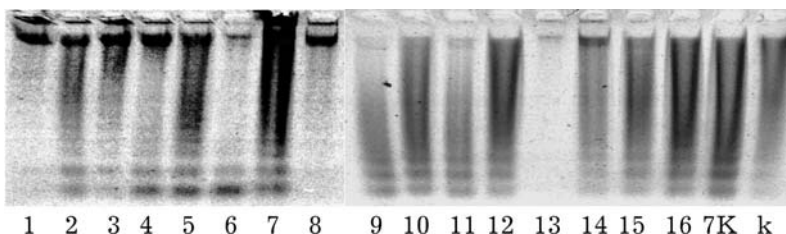
Тестуючи препарати Ig з молозива, виявили, що 12 препаратів Ig із 25 досліджених були токсичними і середнє значення живих клітин становило  $9.6\% \pm 10.3$  від контролю; 10 препаратів характеризувалися незначним цитотоксичним ефектом ( $76.4\% \pm 12.3$ ). Як видно із рис. 4, препарати № 19, 23, 25, на відміну від інших зразків, характеризувалися здатністю стимулювати проліферацію лейкомічних Т-лімфоцитів лінії Jurkat.

Отже, результати проведених нами досліджень свідчать про те, що препарати Ig, одержані з молозива породіль, суттєво відрізняються між собою щодо дії на Т-лімфоцити лінії Jurkat. Оскільки низький рівень або відсутність цитотоксичної активності Ig, є характерною ознакою хворих на розсіяний склероз, то можна припустити, що стан гуморального імунітету породіль зазнав певних автоімунних порушень.

Для того, щоб з'ясувати тип загибелі клітин, індукованої досліджуваними препаратами Ig, ми проаналізували стан ДНК клітин-мішеней, використавши для цього метод електрофорезу ДНК у гелі агарози (рис. 5, 6).



**Рис. 5.** Електрофорез ДНК клітин-мішеней у гелі агарози за дії препаратів Ig з молозива здорових породіль.



**Рис. 6.** Електрофорез ДНК клітин-мішеней у гелі агарози. 1 – 16 — після дії препаратів Ig отриманих з плазми крові хворих на РС, 7К — після дії Ig з плазми клінічно здорового донора, К — ДНК інтактних клітин.

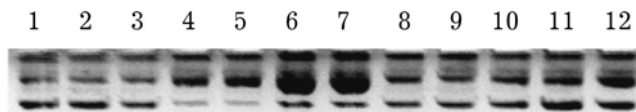
З даних, показаних на рис. 5, видно, що препарати Ig, виділені з молозива клінічно здорових породіль, проявляють свою цитотоксичну дію щодо Т-клітин лінії Jurkat шляхом апоптозу, оскільки ДНК цих клітин фрагментована на моно- і олігонуклеосомні ділянки.

Аналіз фрагментації ДНК Т-клітин лінії Jurkat під впливом препаратів Ig із плазми крові хворих на РС засвідчив неоднозначність дії цих

препаратів. Електрофоретичний аналіз змін ДНК під впливом виділених Ig дає підстави припустити, що Ig плазми крові 13-ти хворих на РС індукують процеси апоптозу у Т-клітин лінії Jurkat, про що свідчить чітко виражена фрагментація ДНК. Тоді як Ig 3-х хворих на РС індукують процеси некрозу Т-клітин, оскільки на електрофореграмі не видно фрагментації ДНК.

Важливою характеристикою імуноглобулінів, дія яких реалізується шляхом молекулярної мімікрії або автологічних антитіл (авто-АТ), є їхня каталітична активність щодо автологічних антигенів (авто-АГ). З'ясовано, що ДНК-гідролізуючі антитіла (ДНК-зими) присутні у крові хворих на автоімунні та деякі інші захворювання, але не виявлені у крові клінічно здорових людей. ДНК-зими було виявлено у сироватці крові хворих на автоімунні захворювання (системний червоний вівчак, ревматоїдний артрит, автоімунний тироїдит, розсіяний склероз також у хворих на СНІД, променеву хворобу та хворих на деякі лімфопроліферативні захворювання (В-лімфолейкози)) [6, 10]. ДНК-гідролізуючі антитіла ізотипів sIgA та IgG було також виявлено у молоці та молозиві клінічно здорових породіль [3].

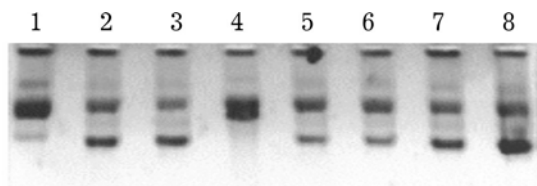
Ми провели аналіз ДНК-гідролізуючої активності деяких препаратів Ig молозива породіль і препаратів Ig хворих на РС. Відомо, що ДНК-зими володіють топоізомеразною активністю щодо надспіралізованої ДНК плазмиди [11]. ДНК-зими, подібно до топоізомераза, каталізують розриви в одній із двох ниток ДНК, що призводить до утворення релаксованої форми ДНК плазмиди. Оскільки ці дві форми ДНК мають різну електрофоретичну рухливість, то їх можна розділити електрофорезом у гелі агарози (рис. 7).



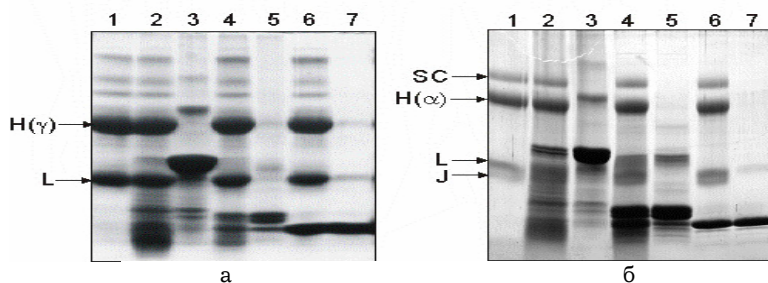
**Рис. 7.** Гідроліз ДНК плазмиди препаратами IgG, очищеними з сироватки крові хворих на РС хроматографією на Protein A-agarose.

Виявили, що препарати Ig № 4, 5, виділені із сироватки крові хворих на РС, гідролізують надспіралізовану плазмідну ДНК. Щодо препаратів Ig молозива породіль (рис. 8), то подібно до препаратів хворих на автоімунне захворювання № 1, 4 також гідролізують надспіралізовану плазмідну ДНК. В інших препаратах Ig хворих на РС та молозива породіль топоізомеразної активності не виявлено.

Іншим типом абзимів, присутність яких в організмі свідчить про автоімунні порушення, є протеїн-гідролізуючої авто-АТ (протабзими). Протабзими класів sIgA і IgG, які здатні гідролізувати бета-казеїн жіночого та коров'ячого молока, було виявлено у молоці клінічно здорових жінок і в сироватці крові хворих на СНІД [4, 12]. Ми виявили, що високоочищені препарати sIgA, виділені з молозива породіль, гідролізують гістон H1. Антитіла класу IgG із подібною субстратною специфічністю також було знайдено у сироватці крові хворих на розсіяний склероз (рис. 9).



**Рис. 8.** Гідроліз ДНК плазміді препаратами sIgA, очищеними з молозива жінок хроматографією на Protein A-agarose.



**Рис. 9.** Гідроліз гістону H1 — а: IgG хворих на РС (1 — IgG; 2 — IgG+ гістон H1; 3 — гістон H1; 4 — IgG + тотальні гістони; 5 — IgG + лізоцим; 6 — лізоцим). б: sIgA молозива (1 — sIgA; 2 — sIgA+ гістон H1; 3 — H1; 4 — IgG + тотальні гістони; 5 — IgG + лізоцим; 6 — лізоцим).

Одержані результати свідчать про те, що абзими, які гідролізують гістон H1, подібно до інших протабзимів, можуть слугувати маркерами аутоімунних порушень в організмі людини.

Аналіз результатів проведених досліджень свідчить про те, що функціональні властивості імуноглобулінів хворих на аутоімунне захворювання і молозива породіль можуть відобразити індивідуальні особливості стану гуморального імунітету.

**Подяки.** Автор висловлює подяку за фінансову підтримку West-Ukrainian BioMedical Research Center.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Имунологические методы. Под ред. Г. Фримеля. — М., Медицина. 1997. 472 с.
2. Каньшикова Т.Г., Бунева В.А., Невинский Г.А. Биологические функции молока человека и его компонентов // Успехи совр. биологии. — 2002. — Т. 122, № 3. — С. 259 – 271.
3. Кім Ю.Я., Стойка Р.С. Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 2. — С. 5 – 16.
4. Одинцова Е.С., Харитоновна М.А., Барановский А.Г., Сизякова 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.

5. Сучков С.В. Сравнительное исследование каталитических (ДНК-гидролизующих) и цитотоксических свойств анти-ДНК аутоантител // Бюл. эксп. биол. мед. — 2001. — Т. 131, № 4. — С. 420 – 423.
6. Gabibov A., Ponomarenko N., Tretyak E., Paltsev M., Suchkov C. Catalytic auto-antibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // Autoimm. Rev. — 2006. — Vol. 5, № 5. — P. 324 – 330.
7. Gong J., Traganos F.D., Darzynkiewicz Z.A. Selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry // Analytical Biochemistry — 1994. — Vol. 218. — P. 314 – 319.
8. Polosukhina D.I., Buneva V.N., Doronin B.M., Tushkevich O.B., Boiko A.N., Gusev E.I., Favorova O.O., Nevinsky G.A. Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies the sera of patients with multiple sclerosis // Med. Sci. Monit. — 2005. — Vol. 11, № 8. — P. 266 – 272.
9. Nevinsky G.A., Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Vlassov A.V., Gal'vita A.V., Buneva V.N. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2000. — Vol. 83, № 1 – 3. — P. 115 – 129.
10. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Catalytic antibody in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. // J. Cell Mol. Med. — 2003. — Vol. 7, № 3. — P. 265 – 276.
11. Nevinsky G.A., Buneva V.N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 269, № 1 – 3. — P. 235 – 249.
12. Odintsova E.S., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk. // J. Mol. Recognit. — 2005. — Vol. 18, № 5. — P. 413 – 421.

#### SUMMARY

Maryna STARYKOVYCH

#### BIOLOGICAL ACTIVITY OF IMMUNOGLOBULINS IN NORMAL STATE AND PATHOLOGY

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine*

The effect of immunoglobulins(Ig) from blood plasma of patients diagnosed for multiple sclerosis (MS) and of colostrum antibodies in parturient women towards cultured human leukemic Jurkat T-cells was studied. It was found that Igs, from blood plasma of MS patients possess both cytotoxic and cytostatic activity. Ig preparations obtained from colostrum of parturient women were shown to act like blood serum Igs of autoimmune patients, although in some cases they demonstrated proliferation-stimulating activity. It was shown that Ig preparations of patients diagnosed for MS, and colostrum antibodies of parturient women induced apoptosis in Jurkat T-cells. Some antibodies under study also possess hydrolytic activity towards double-strand DNA and histones, namely histon H1.