

УДК 576.376+116-097+616-002-008.953-092

Ірина МАГОРІВСЬКА

ВИЯВЛЕННЯ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ ВОВЧАК ІМУНОГЛОБУЛІНІВ, ЯКІ ГІДРОЛІЗУЮТЬ ОСНОВНИЙ БІЛОК МІЄЛІНА

*Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова 14/16, Львів, 79005, Україна
magi143@rambler.ru*

Відомо, що при системних автоімунних розладах продукуються антитіла до власних антигенів. Зокрема, у сироватці крові хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) виявлено різноманітні автоантитіла, серед яких значну частину становлять антиядерні автоантитіла. Мета нашої праці – з'ясувати, чи наявні автоантитіла каталітично активні щодо основного білка мієліну (ОБМ) у сироватці крові хворих на СЧВ. Автоантитіла отримували за допомогою афінної хроматографії на колонці з протеїн G-сефарозою і використовували для розщеплення ОБМ. Виявлено, що 4 з 10 препаратів суттєво знижували вміст ОБМ, це свідчить про їхню здатність гідролізувати цей білок. Водночас у здорових донорів каталітично активних автоантитіл, які б володіли такою здатністю, виявлено не було. Отже, у сироватці крові частини хворих на СЧВ є IgG, які руйнують ОБМ шляхом протеолізу.

Ключові слова: імуноглобуліни, протеолітична активність, сироватка крові, основний білок мієліну, системний червоний вовчак.

При різноманітних автоімунних порушеннях у сироватці крові людини були виявлені каталітично активні автоантитіла (абзими). Таке явище розглядали здебільшого як патологію. Однак виявлення автоантитіл ще не є показником автоагресії, оскільки автоантитіла з низькою каталітичною активністю можна виявити і у деяких клінічно здорових людей [1]. Сьогодні відомо, що протеолітичні автоантитіла (протабзими) можуть виконувати захисну функцію при вірусних і бактерійних інфекціях [2]. Такі дані свідчать про те, що каталітично активні антитіла забезпечують деякі фізіологічні реакції. Прикладом можуть слугувати антитіла до комплексу U1 малого ядерного рибонуклеопротеїну / Smith (U1 small nuclear ribonucleoprotein/Smith (U1snRNP/Sm) complex), який задіяний у сплайсингу пре-мРНК в ядрі еукаріотичних клітин, і антитіла до La антигену, який бере участь у транскрипції РНК полімерази III [3].

У сироватці крові хворих на СЧВ виявлено автоантитіла до антиядерних антигенів, а також автоантитіл до компонентів цитоплазми та цитоплазматичної мембрани, серед антиядерних антитіл значний відсоток займають антитіла з спорідненістю до ДНК (анти-ДНК АТ) і гістонів (анти-гістонові АТ) [4]. Анти-ДНК АТ си-

рватки крові хворих на СЧВ володіють гідролізуючою активністю щодо ДНК і їх назвали ДНК-абзими [5]. Зазвичай ці автоантитіла з'являються раніше, ніж діагностують СЧВ, і їхнє прогресивне накопичення передре початку хвороби [4]. При такій автоімунній хворобі, як розсіяний склероз (РС) також виявили ДНК-гідролізуючі автоантитіла, однак останні дослідження показали, що в сироватці крові хворих на РС наявні автоантитіла з протеолітичною активністю щодо основного білка мієліну (ОБМ) [5]. Оскільки сьогодні при СЧВ таких автоантитіл не було виявлено, то мета нашої праці – з'ясувати, чи присутні антитіла з такою протеолітичною активністю у сироватці крові хворих на СЧВ. Крім ОБМ, ми використали й декілька інших білків як субстрати каталітичної дії цих антитіл.

Матеріали та методи

Виділення імуноглобулінів. У дослідженні використовували сироватки крові хворих на СЧВ, яку надала кафедра імунології і клінічної алергології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького згідно з договором про співпрацю. IgG виділяли з сироватки крові афінною хроматографією, використовуючи методику [6]. Для цього 2 мл сироватки центрифугували при 5000 г протягом 5 хв і наносили на колонку, наповнену протеїн G-сефарозою. IgG з колонки елюювали 0,1 М гліцин-HCl, pH 2,6, фракції нейтралізували 1,5 М Tris-HCl, pH 8,8. Антитіла осаджували насиченим розчином $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і діалізували проти 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5 протягом 18 год. Концентрацію білка у зразках вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, США). Препарати IgG аналізували електрофорезом у 12% ПААГ у присутності 0,1 % Ds-Na.

Аналіз протеолітичної активності. Субстратом протеолітичної реакції слугував основний білок мієліну мозку бика (Sigma, США). Реакцію гідролізу проводили в 20 мкл інкубаційного середовища (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 3–5 мкг антитіл, 15 мкг білкового субстрату) протягом 3 год (30 хв, 60 хв, 90 хв, 120 хв, 150 хв, 180 хв) при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 5 мкл денатуруючого буферу (100 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 4 % Ds-Na, 20% гліцеролу) і продукти реакції розділяли електрофорезом у 15% ПААГ у присутності 0,1 % Ds-Na. Білки на гелі фарбували Coomassie R-250.

Гель-фільтрація. Препарат антитіл, який володів здатністю гідролізувати ОБМ, розділяли гель-фільтрацією на колонці розміром 180 x 5 мм, наповненій Toyopearl TSK HW55 (Toyo Soda, Японія). Для цього антитіла осаджували 50 % сульфатом амонію і осад розчиняли в 1x TBS pH 7,5. У колонку вносили 40 мкг білка й елюювали тим самим буфером. Хроматографічні фракції збирали, нейтралізували 1,5 М Tris-HCl pH 8,8 і діалізували проти 1x TBS pH 7,5 протягом 18 год й аналізували електрофоретично у 12% ПААГ за денатуруючих умов.

Результати та обговорення

У нашій праці використано сироватку крові 10 хворих на СЧВ та 6 клінічно здорових людей. Із сироватки отримано високоочищені препарати імуноглобулінів, які використовували для вивчення їхньої каталітичної активності щодо деяких білків, серед яких був ОБМ. Характерною ознакою ОБМ ссавців є висока консервативність первинної структури [7]. Амінокислотна послідовність ОБМ людини і бика відрізняється лише кількома положеннями амінокислотних залишків [8]. Це дає змогу використовувати препарат ОБМ мозку бика, як субстрат. Варто зазначи-

ти, що препарат ОБМ мозку бика також застосовували під час вивчення протеолітичної активності автоантитіл сироватки крові хворих на РС [9].

Препарати імуноглобулінів отримували за допомогою афінної хроматографії на колонці, наповненій протеїн G-сефарозою. Потім їх піддавали електрофорезу у ПААГ за денатуруючих умов. Отримали два типи поліпептидних ланцюгів, які мають молекулярну масу важких і легких ланцюгів IgG (рис. 1). Протеолітичну активність препаратів IgG оцінювали за допомогою електрофорезу у присутності 0,1 % Ds-Na, який засвідчив руйнування ОБМ і нагромадження низькомолекулярних продуктів його гідролізу (рис. 2). З'ясували, що 4 з 10 препаратів, отриманих із сироватки крові хворих на СЧВ, суттєво зменшували вміст ОБМ, що свідчить про їхню властивість гідролізувати цей білок. Найвищу каталітичну активність демонстрували препарати IgG, які ми виділили нами з сироватки крові хворих №3, №7 і №8 (доріжки 3, 7 і 8, рис. 2), дещо нижчою була активність пепарату IgG у хворого №6 (доріжка 6, рис.2), водночас в інших хворих таку активність не виявили (доріжки 1, 2, 4, 5, 9, 10, рис.2), що засвідчує на індивідуальні особливості пацієнтів щодо проявів такого захворювання. У контрольній групі із 6-ти клінічно здорових донорів у сироватці крові не було каталітично активних антитіл, які гідролізують ОБМ (рис. 3).

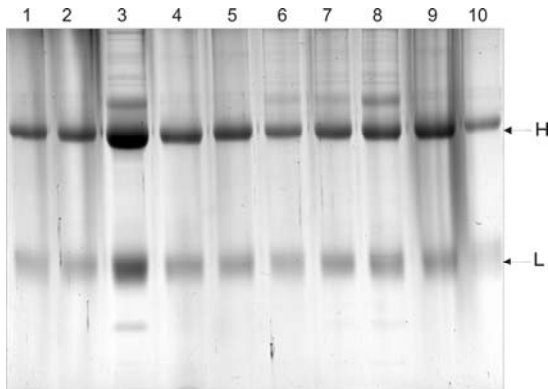


Рис. 1. Ds-Na-електрофорез у 12% ПААГ препаратів IgG, виділених із сироватки крові хворих на СЧВ афінною хроматографією на колонці, наповненій протеїн G-сефарозою. Стрілками справа показано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG.

Щоб виключити можливість того, що каталітична активність досліджуваних препаратів пов'язана з іншими білками, а не з IgG, афінно очищений препарат IgG, виділений із сироватки крові пацієнта №7, який характеризувався високою гідролізуючою активністю щодо ОБМ, додатково фракціонували гель-фільтрацією на колонці наповненій Toyopearl TSK HW55 (рис. 4 А). Отримані хроматографічні фракції розділяли електрофорезом у ПААГ у присутності 0,1 % Ds-Na й аналізували їх щодо здатності гідролізувати ОБМ (рис. 4 Б). Встановлено, що фракції 3, 4 містять тільки IgG, й інших білків на цій електрофореграмі немає. Аналіз каталітичної активності окремих фракцій показав, що гідроліз ОБМ відбувався у фракціях, зображених на доріжках 3 і 4, тобто там, де у високій концентрації наявні IgG. Отже, протеолітична активність афінно очищених препаратів Ig пов'язана з IgG, а не з домішками, які могли бути наявні у досліджуваних зразках.

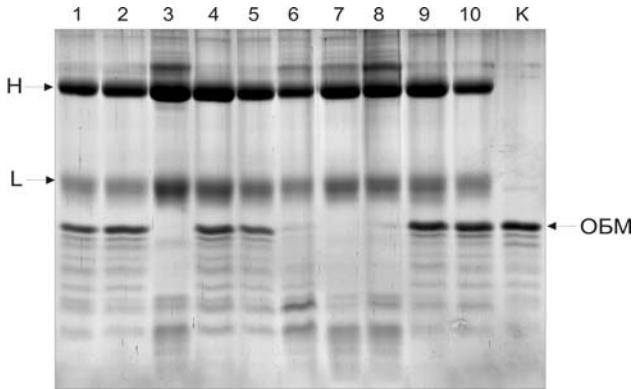


Рис. 2. Ds-Na-електрофорез у 15% ПААГ продуктів гідролізу ОБМ препаратами антитіл, виділених із сироватки крові хворих на СЧВ афінною хроматографією на колонці, наповненій протеїн G-сефарозою. 1–10 – ОБМ, інкубований із препаратами IgG, К – ОБМ за відсутності IgG. Стрілками зліва показано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG, справа – положення ОБМ.

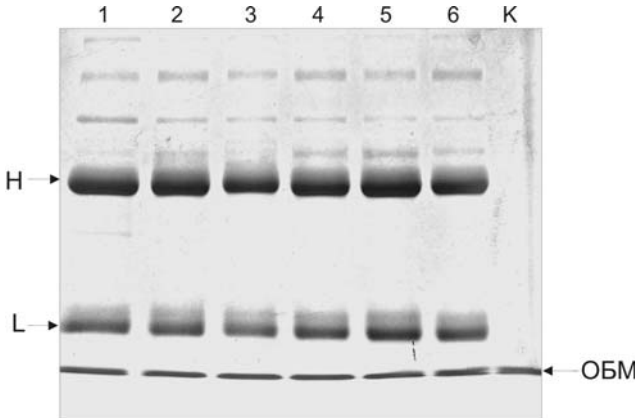


Рис. 3. Ds-Na-електрофорез у 10% ПААГ ОБМ за присутності препаратів IgG, виділених із сироватки крові клінічно здорових донорів, очищених на протеїн А-сефарозі 1–6 – ОБМ інкубований із препаратами IgG, К – ОБМ у відсутності IgG. Стрілками зліва показано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG, справа - положення ОБМ.

Гель-фільтраційну фракцію IgG надалі використали для вивчення динаміки гідролізу ОБМ. Продукти гідролізу розділяли електрофорезом у 15% ПААГ за денатуруючих умов (рис. 5), і допомогою програми Origin 7 описували гідроліз цього білка залежно від часу (рис. 6). Аналіз електрофореграми показав, що гідроліз ОБМ починається вже після 30 хв його інкубації з препаратом IgG. Кожні наступні 30 хв упродовж 3 год відбувалось збільшення кількості гідролізованих фрагментів. Електрофоретичний аналіз часової динаміки гідролізу ОБМ графічно зображено на рис. 6. Видно початок гідролізу через 30 хв, збільшення кількості гідролізованих

фрагментів в інкубаційній суміші через 90 та 150 хв і його значний розпад на третю годину процесу.

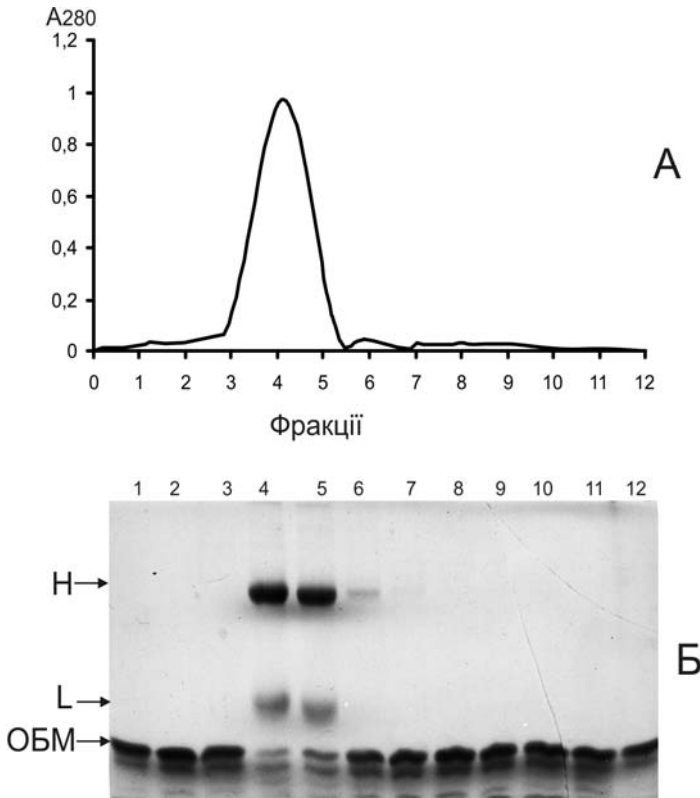


Рис. 4. А – гель фільтрація препарату IgG з протеолітичною активністю на колонці Toyopearl TSK HW-55 (180 x 5 см) у TBS-буфері (20 Tris-HCl, pH = 7,4, 150 mM NaCl). Б – електрофоретичний аналіз протеолітичної активності хроматографічних фракцій щодо ОБМ. 1 – 12 – хроматографічні фракції. Стрілками зліва показано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG, а також положення ОБМ.

Отже, у сироватці крові хворих на СЧВ виявили автоантитіла з протеолітичною активністю щодо ОБМ. У здорових донорів таких автоантитіл не знайшли. Роль каталізу опосередкованого антитілами, у патогенезі при аутоімунних та інших розладах залишається невідомою [2]. З'ясовано, що автоантитіла можуть долати гематоенцефалічний бар'єр і потрапляти з кровоносних судин у мозок [9]. Показано, що при РС автоантитіла анти-ОБМ виконують протеолітичне розщеплення ОБМ. Припускають, що такий процес призводить до патологічного руйнування мієлінової оболонки, що простежується при РС [10], і можливо відбувається при СЧВ. Виявлення автоантитіл до ОБМ може мати діагностичне значення для прогнозу нейропсихічної форми цього захворювання, що виникає у деяких хворих на СЧВ [11].

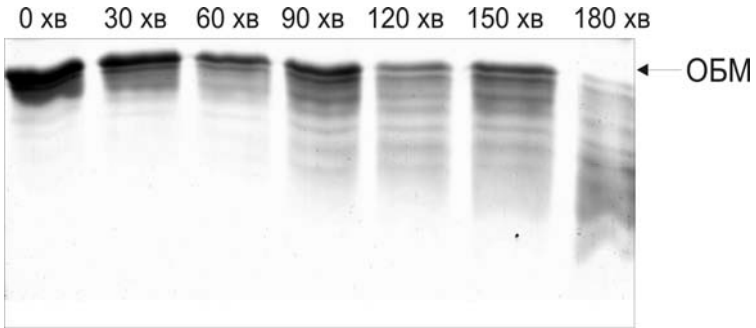


Рис. 5. Ds-Na – електрофорез у 15% ПААГ продуктів гідролізу ОБМ під дією препарату IgG залежно від тривалості дії IgG. 0 – 180 хв – тривалість інкубації ОБМ з препаратом IgG сироватки крові хворого на СЧВ, очищеного гелі-фільтрацією у присутності 1x TBS-буфера. Стрілкою показано положення на гелі ОБМ.

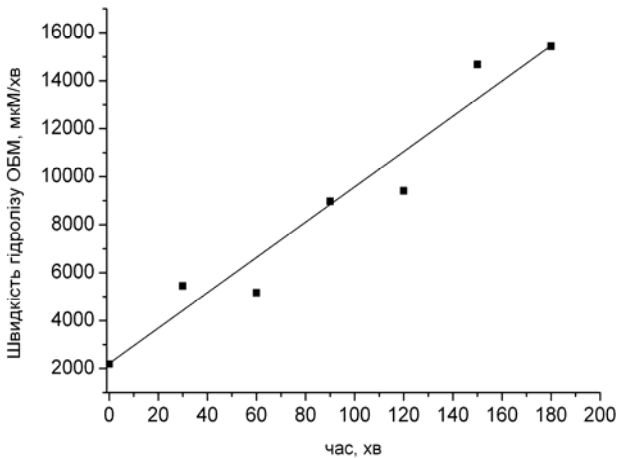


Рис. 6. Часова динаміка гідролізу ОБМ під дією препарату каталітично активного IgG, виділеного із сироватки крові хворого на СЧВ, очищеного гелі-фільтрацією у присутності 1x TBS.

Висновок. У сироватці крові значної частини хворих на системний червоний вовчак містяться протеолітично активні IgG (протабзими), здатні руйнувати основний білок мієліну. Відсутність цих автоантитіл у сироватці крові решти хворих на СЧВ свідчить про гетерогенність проявів цього автоімунного порушення у клінічно здорових людей антитіла з такою каталітичною активністю не виявлено.

Висловлюємо подяку д-ру біол. наук Коту Ю.Я., Старикович М.О., канд. біол. наук Білому Р.О., проф. Стойці Р.С. за допомогу у виконанні цієї праці, а також

канд. мед. наук Гаврилюк А.М., канд. мед. наук Чоп'як В.В. за надання сироваток крові хворих і клінічно здорових донорів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Polosukhina D.I., Kanyshkova T.G., Doronin B.M. et al.* Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunology Letters*-4301 – 2005. – P. 1–7.
2. *Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I. et al.* Catalytic activity of autoantibodies toward myelin basic protein correlates with the scores on the multiple sclerosis expanded disability status scale // *Immunology Letters*-4289 – 2005. – P. 1–6.
3. *Graham K.L., Robinson W.H., Steinman L. et al.* High-throughput Methods for Measuring Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus and other Autoimmune Diseases // *Autoimmunity* – 2004. – Vol. 37 (4). – P. 269–272.
4. *Ballestar E, Esteller M, Richardson B.C.* The Epigenetic Face of Systemic Lupus Erythematosus // *The Journal of Immunology* – 2006. No. 176. – P. 7143 – 7147.
5. *Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B.* Catalytic autoantibodies in clinical autoimmunity and modern medicine // *Autoimmun. Rev.* – 2006. – Vol. 5. – P. 324–330.
6. Иммунологические методы / Под ред. Г Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 390 с.
7. *Polosukhina D.I., Kanyshkova T.G., Doronin B.M. et al.* Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* – 2004. Vol. 8 (3). – P. 359–368.
8. *Beniac D.R., Luckevich M.D., Czarnota G.J. et al.* Three-dimensional Structure of Myelin Basic Protein // *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* –1997. – Vol. 272 (7). – P. 4261 – 4268.
9. *Friden P.M., Walus L.R., Watson P. et al.* Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate // *Science* – 1993. P. – 373–377.
10. *Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I. et al.* Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *PNAS* – 2006. – Vol. 103 (2). – P. 281–286.
11. *Hay E.M, Black D., Huddy A.* Psychiatric disorder and cognitive impairment in systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum* – 1992, Vol. 35. – P. 411–416.

SUMMARY

Iryna MAGORIVSKA

DETECTION OF MYELIN BASIC PROTEIN HYDROLYSING IGGs IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSIS

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Drahomanov St., 14/16, 79005, Lviv, Ukraine*

The common feature of autoimmune diseases is the presence of autoantibodies that are active towards self-antigens. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multi-system autoimmune disease associated with production of different autoantibodies. All patients with SLE were shown to possess antinuclear antibodies. The aim of present work was to find myelin basic protein (MBP) hydrolysing autoantibodies in blood serum of SLE patients. IgGs were purified by the affinity chromatography on column with protein G-Sepharose and used for MBP hydrolyzing. 10 SLE patients were under investigation. It was found that IgGs from 4 SLE patients cata-

lyzed MBP hydrolysis. IgGs from blood serum of clinically healthy patients did not possess MBP hydrolyzing ability. Thus, we have shown that IgGs from blood serum of a part of SLE patients were capable of hydrolyzing MBP by proteolysis.

Key words: immunoglobulin, proteolytic activity, blood serum, myelin basic protein, systemic lupus erythematosus.