

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ, АМИЛАЗНОЙ И АТРАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ IGG АНТИТЕЛ ИЗ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

© 2017 г. Е. А. Ермаков^{1,2}, А. С. Толмачева³, Л. П. Смирнова²,
С. А. Иванова², В. Н. Бунева¹, Г. А. Невинский¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения российской академии наук, Новосибирск, Россия; ²Научно-исследовательский Институт психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия; ³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила: 24.04.2017. Принята: 11.09.2017

Электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG антител были выделены из плазмы крови 18 больных шизофренией (ШЗ) и 14 здоровых доноров аффинной хроматографией на Protein G-Sepharose с последующей высокоэффективной гель-фильтрацией. Впервые проведено сравнение H₂O₂-зависимой пероксидазной и H₂O₂-независимой оксидоредуктазной активностей препаратов поликлональных IgG больных ШЗ и здоровых доноров в окислении 3,3'-диаминобензидина. Все препараты IgG больных ШЗ и здоровых доноров обладали этими активностями, но величины кажущихся значений k_{cat} варьировали в очень широком диапазоне (16,2-355,8 мин⁻¹). В среднем скорость окисления субстрата в присутствии H₂O₂ из плазмы крови больных ШЗ и здоровых доноров была в 1,3-1,5 раз выше, чем в отсутствие H₂O₂. Различие между средними пероксидазной (1,8 раз) и оксидоредуктазной (1,5 раз) активностями IgG из плазмы крови больных ШЗ и здоровых доноров было статистически достоверным ($p = 0,008$). При этом, коэффициент корреляции пероксидазной и оксидоредуктазной активностей антител больных ШЗ оказался существенно выше (0,664), чем для здоровых доноров (0,27). Обсуждается возможная биологическая роль и природа происхождения абзимов с окислительно-восстановительными функциями. Кровь здоровых доноров и больных различными аутоиммунными заболеваниями обычно содержит абзимы с амилазной и АТРАЗной активностями. В случае 18 больных ШФ амилазная активность обнаружена только у IgG антител одного больного, но и все 18 препаратов были неактивными в гидролизе АТФ.

Ключевые слова: абзимы, больные шизофренией, здоровые доноры, окислительно-восстановительные активности, амилазная и АТРАЗная активности

Адрес: 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8 Институт химической биологии и фундаментальной медицины. Невинский Георгий Николаевич. Тел/факс 007(383)363-51-53. **E-mail:** nevinisky@niboch.nsc.ru

Авторы:

Ермаков Е. А., аспирант, "Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН", Новосибирск, Россия;

Толмачева А. С., аспирант "Институт цитологии и генетики СО РАН", Новосибирск, Россия;

Смирнова Л. П., к. м. н., с. н. с. "Научно-исследовательский Институт психического здоровья Томского националь-

ного исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия;

Иванова С. А., д. м. н., профессор, заведующая лабораторией, "Научно-исследовательский Институт психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия;

Бунева В. Н., д. б. н., профессор, г. н. с., "Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН", Новосибирск, Россия;

Невинский Г. А., д. х. н., профессор, заведующий лабораторией, "Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН", Новосибирск, Россия;

ВВЕДЕНИЕ

Кроме канонических ферментов различными каталитическими функциями могут обладать некоторые иммуноглобулины (Ig), которые получили название абзимов (для обзора см. [1-7]). Искусственные абзимы получают путем иммунизации животных химически стабильными аналогами переходных состояний химических реакций, которые используют в качестве гаптенов [1]. Молекулы некоторых пептидов, белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов в живых организмах в свободном состоянии или в комплексах с белками могут в той или иной степени имитировать переходные состояния химических реакций и, как следствие, индуцировать наработку абзимов [1]. В настоящее время доказано существование природных IgG и/или IgA и IgM абзимов пациентов с рядом аутоиммунных заболеваний (АИЗ) и вирусных патологий [1-7]. Эти абзимы гидролизуют белки и пептиды: вазоактивный нейропептид (астма) [8], тиреоглобулин (тиреоидит Хашимото и ревматоидный артрит) [9, 10], протромбин (множественная миелома) [11], белковый фактор VIII (гемофилия) [12] и основной белок миелина (рассеянный склероз (РС) [13-15] и системная красная волчанка (СКВ) [16-18]). IgG, IgM и IgA антитела гидролизуют обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-инфицированных больных [19, 20]. Такие абзимы являются антителами непосредственно против этих белков [1-8, 20]. АТ, гидролизующие ДНК, РНК, и олигосахариды, обнаруженные при большом числе различных АИЗ (СКВ, РС, полиартрит, тиреоидит Хашимото, лимфопролиферативные заболевания, полиневриты, а также вирусный гепатит, клещевой энцефалит и ВИЧ-инфекция) также могут быть АТ непосредственно против ДНК, РНК, полисахаридов, но в первую очередь против их комплексов с белками [2-7].

Еще одним путем образования природных абзимов является наработка вторичных антиидиотипических антител против активных центров ферментов. Такие абзимы содержат в себе «внутренний образ» активных центров исходных ферментов и также обладают каталитической активностью [1-7]. С помощью этого подхода были получены моноклональные антиидиотипические абзимы с ацетилхолинэстеразной [21, 22], карбоксипептидазной [23, 24], и β -лактамазной [25] активностями.

Содержание в повышенной концентрации аутоантител является особенностью пациентов с различными АИЗ; небольшие фракции ауто-АТ могут обладать самыми разными ферментативными активностями [1-7]. Следует подчеркнуть, что кровь здоровых доноров обычно не содержит абзимов, гидролизующих нуклеиновые кислоты, белки и другие антигены [1-7]. Однако в крови небольшого процента здоровых доноров обнаружены абзимы с очень низкой, но достоверно тестируемой активностью, которые гидролизуют вазоактивный нейропептид [8], тиреоглобулин [10] и полисахариды [26]. Кроме того, в крови здоровых доноров [26], а также больных СКВ [26-29], РС [30, 31] и крови аутоиммунных мышей [32] обнаружены абзимы с высокой амилолитической активностью. Кровь аутоиммунных мышей [33] и женское молоко [34] содержат абзимы, эффективно гидролизующие АТР и другие нуклеотиды.

В целом, биологическая роль абзимов при АИЗ и некоторых вирусных патологиях пока остается до конца не ясной, однако в большинстве случаев они цитотоксичны и считается, что они могут играть отрицательную роль в патогенезе АИЗ [1-7]. Обнаружение абзимов с разными активностями в крови по клиническим показателям здоровых доноров может быть как следствием возможности образования абзимов с очень низкой активностью у все же здоровых людей, так и проявлением начальных стадий аутоиммунных процессов, которые еще не привели к развитию тех или иных АИЗ, но которые можно обнаружить с помощью известных методов.

В литературе опубликованы данные об участии абзимов в окислительно-восстановительных химических реакциях. Разные формы кислорода, например, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and OH^{\cdot} и др. являются потенциальными окислителями белков, липидов, ДНК, и других компонентов клеток человека. Они возникают как при действии внешних факторов (радиация, ультрафиолет, загрязнители воздуха, и др.), так и активации эндогенных механизмов генерации активированных кислородных метаболитов в результате анаэробного дыхания у эукариот [35-37]. Каноническими ферментами, защищающими живые организмы от активных форм кислорода являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатион независимая пероксидаза, которые обнаружены у человека, животных

и растений и являются металл-зависимыми ферментами [35-37]. Единственной независимой от ионов металлов является глутатион-зависимая пероксидаза, которая является селен-зависимым ферментом [37]. Несмотря на то, что СОД, каталаза и пероксидазы в основном локализованы в различных клетках, некоторое их количество обнаруживается и в крови человека и животных, но после попадания в кровь эти ферменты быстро инактивируются [37]. В то же время продолжительность "жизни" АТ в крови человека намного больше, чем канонических ферментов. В связи с этим антитела с оксидоредуктазными активностями могут быть важными в защите человека и других млекопитающих от окислительного стресса.

Недавно были получены неожиданные результаты о некоторых ферментативных функциях иммуноглобулинов (Ig) здоровых доноров. Показано, что Ig человека и самых разных животных обладают супероксиддисмутазной активностью; они превращают синглетный кислород $^1\text{O}_2$ в его восстановленную форму O_2^- [38, 39]. Эти абзимы в качестве источника электрона используют H_2O и присоединяют его к $^1\text{O}_2^*$ с образованием H_2O_2 в качестве первого интермедиата нескольких последовательных стадий, ведущих к образованию H_2O_2 . Эти данные, как считается, свидетельствуют о возможности защиты организмов млекопитающих от $^1\text{O}_2^*$ с помощью АТ и ставят вопрос о возможности специальной эволюции Ig как специфических антиоксидантов крови [38, 39]. Для иммуноглобулинов был открыт механизм, с помощью которого кислород может быть восстановлен и повторно использован при фагоцитозе, что указывает на возможность участия иммунной системы в микробной регуляции. Еще более удивительным является открытие абзимов высших эукариот, катализирующих образование озона, используемого клетками при фагоцитозе [40].

Группой Генералова еще в 1998 г. показано, что препараты IgG крови здоровых доноров и пациентов с различными формами гепатита обладают пероксидазной активностью, но критерии принадлежности активности непосредственно к АТ не были проверены [41]. Позже было показано, что IgG из крови здоровых крыс Wistar обладают высокими H_2O_2 -зависимой пероксидазной (далее пероксидазной) и H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной (да-

лее оксидоредуктазной) активностями в окислении субстрата пероксидазы хрена 3,3'-диаминобензидина и некоторых других ароматических аминов, фенолов и хинонов [42-46]. Интересно, что эти же активности были обнаружены у IgG из крови здоровых людей [47]. Относительная пероксидазная активность IgG здоровых людей в отсутствие внешних ионов металлов очень сильно варьирует от донора к донору, но в среднем она примерно в 5 раз ниже, чем у крысиных IgG [39]. Эти данные об окислительно-восстановительных ферментативных активностях антител представляются важными для понимания вопроса о возможности защиты человека от окислительного стресса с помощью иммуноглобулинов крови.

Шизофрения (ШЗ, около 1 % человеческой популяции) является одним из наиболее специфических проблем психиатрии [48, 49]. ШЗ может начать развиваться еще в период внутриутробного развития или в раннем детстве [50, 51]. Есть несколько разных теорий ШЗ, но все они не могут дать окончательного заключения за или против неврологической или дегенеративной гипотезы заболевания [52]. С одной стороны, считается, что дисбаланс дофамин-глутамат гомеостаза может приводить к развитию у пациентов окислительного стресса [53, 54]. Кроме того, при психических расстройствах обнаружено нарушение функции ферментных систем, участвующих в метаболизме биогенных аминов (иодоламинов, катехоламинов) [54, 55] и нейротропные эффекты, связанные с повреждениями клеточных мембран [56, 57]. Предполагается, что повреждение клеточных мембран головного мозга может приводить к образованию аутоантигенов и, как следствие, наработке аутоантител [58, 59]. Предполагается, что в генезе ШЗ иммунологические изменения могут приводить к потере толерантности к собственным антигенам. Тем не менее, до настоящего времени четкие доказательства возможной роли аутоиммунных процессов в патогенезе ШЗ не были выявлены. В то же время, в ряде эпидемиологических исследований была обнаружена корреляция между ШЗ и воспалительными аутоиммунными заболеваниями: ревматоидный артрит [60] и Хашимото тиреоидит [61, 62]. В отличие от здоровых доноров, но, как и у больных СКВ, легкие цепи IgG пациентов с ШЗ сильно отличаются по молекулярной массе [63]. Было показано, что титры

анти-ДНК антител в сыворотках около 30 % пациентов с ШЗ, как и у больных СКВ (37 %) значительно выше, чем у здоровых доноров. Обнаружение абзимов с высокой ДНКазной активностью является надежным индикатором начальной стадии и развития различных АИЗ [1-7]; эта активность была выявлена у 80 % пациентов с ШЗ [63]. Эти данные свидетельствуют о том, что некоторые больные шизофренией могут проявлять в той или иной степени типичные признаки аутоиммунных заболеваний. Поэтому поиск возможных механизмов развития шизофрении, несомненно, является актуальной задачей. Нельзя было исключить, что в реализации окислительного стресса у больных ШЗ могут участвовать абзимы с окислительно-восстановительными функциями.

В данной работе впервые проведено сравнение H_2O_2 -зависимой пероксидазной и H_2O_2 -независимой оксидоредуктазной активностей из крови здоровых доноров и пациентов с шизофренией. Кроме того, проведен анализ относительных аμιлолитической и АТразной активностей антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали акриламид, N, N'-метиленабисакриламид, тритон X-100, бромфеноловый синий, ТЕМЕД, перекись водорода, ДАБ, Protein A-Sepharose (Sigma, США), SDS (Merck, Германия), Трис (Helicon, Россия), колонки Superdex-200 (Pharmacia Biotech, Швеция). Остальные реактивы были квалификации ос. ч.

Были использованы препараты плазмы крови 18 больных (20-63 лет; среднее значение $41,5 \pm 15,2$ лет; 6 мужчин и 12 женщин) с клинически достоверным диагнозом шизофрении и 14 здоровых доноров. Клинический диагноз шизофрении был установлен врачами-психиатрами отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья (Томск, Россия) согласно критериям МКБ-10 (ICD-10, International classification of diseases, 10th revision) с оценкой превалирующей симптоматики по шкале PANSS (шкала позитивных и негативных синдромов), патологических непроизвольных движений по шкале AIMS (movement involuntary movement scale) и общего клинического впечатления по шкале CGI (Clinical global impression). Согласно анамнезу 18 ото-

бранных пациентов с ШЗ не имели сопутствующих системных аутоиммунных ревматических заболеваний. Все больные получали нейролептическую терапию согласно международным рекомендациям.

Отбор крови проводился в соответствии с протоколом комитета по этике (НИИ психического здоровья ТНИМЦ РАН, Томск, Россия), включая письменное согласие пациентов и здоровых доноров использовать их кровь для научных целей в соответствии с правилами Хельсинкской комиссии по этике.

Выделение антител

Электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG антител были выделены из крови 14 здоровых доноров и 18 больных шизофренией аффинной хроматографией на Protein G-Sepharose в условиях удаления неспецифически связавшихся белков и селективной элюции IgG с колонки 100 мМ глицин-HCl буфером (pH 2,6) согласно [63-71]. Фракции АТ сразу после выхода с колонки нейтрализовали 1 М Трис-HCl буфером (pH 8,5) и диализовали против 25 мМ К-фосфатного буфера, pH 7,0. Дополнительную очистку IgG проводили с помощью FPLC гель-фильтрации на колонке с Superdex 200 HR 10/30 (Pfizer, New York, NY) с использованием хроматографа BioCAD (Applied Biosystems, Foster City, CA) согласно [63-69]. Полученные фракции нейтрализовали, диализовали, как описано выше, и использовали для анализа их каталитических активностей.

Электрофоретический анализ белков

Электрофоретический анализ белков проводили по методу Леммли в 4-15 % градиентном полиакриламидном геле согласно [63-71]. Белки инкубировали в 50 мМ Трис-HCl, pH 6,8, содержащем 2 % SDS, 10 % глицерин и 0,025 % бромфеноловый синий, 1 мин при 100°C, и наносили на гель. Электрофорез проводили (3-4 ч) при силе тока 15-20 мА. Белки окрашивали AgNO₃ или Кумасси R250.

Анализ оксидоредуктазных активностей АТ

Реакционная смесь (100-200 мкл) для анализа пероксидазной активности содержала: 25 мМ К-фосфат (pH 6,8), 10 мМ H₂O₂, 0,2 мг/мл ДАБ и 70-670 нМ IgG. Оксидоредуктазную H₂O₂-независимую активность анализировали с исполь-

зованием этой же смеси, не содержащей H_2O_2 . Реакционную смесь инкубировали в ячейках иммунологических планшетов в темноте при 22 °С в течение 0,5-15 мин, измеряя количество образовавшегося продукта через каждые 30-120 сек. Оптическую плотность растворов (A_{450}) определяли с помощью спектрофотометра Labsystems Uniskan II. Реакционные смеси, не содержащие АТ, использовали в качестве контролей. Начальные скорости реакции определяли с помощью программы Origin 8.5 по наклонам линейных участков кинетических кривых с использованием АТ в концентрациях, соответствующих линейным участкам зависимости скорости реакции от концентрации АТ. Активность вначале выражали в единицах $A_{450}/\text{мин}/\text{мг IgG}$, а затем в $M/\text{мин}/\text{мг IgG}$ с использованием показателя поглощения продукта окисления ДАБ, равного 2807 единиц $A_{450}/1 M/1 \text{ см}$. В конечном итоге рассчитывали кажущиеся значения констант скоростей (k_{cat}) при фиксированной концентрации ДАБ (2 мг/мл) по формуле $k_{\text{cat}} = V (\text{M}/\text{мин}) / [\text{IgG}]$, M.

Тестирование каталитических активностей антител после SDS-электрофореза

Определение оксидоредуктазных активностей интактных IgG антител из крови больных ШЗ проводили с помощью SDS электрофореза в системе Леммли в 4-15%-ном градиентном ПААГ [65-71]. Препараты IgG и моноклональных легких цепей инкубировали в 50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, буфере, содержащем 2% SDS, 10% глицерин, 0,025% бромфеноловый синий при 37 °С в течение 15 мин, после чего наносили на гель. После электрофоретического разделения белков гель контрольной дорожки отделяли и окрашивали раствором Кумасси R-250. Гель опытной дорожки отмывали от SDS в течение 1 ч раствором 4 М мочевины и водой (10 смен воды по 5-7 мин каждая), после чего продольные полоски геля разрезали на кусочки длиной 2-3 мм, которые помещали в отдельные пробирки и тщательно размельчали. Для ренатурации АТ и восстановления их каталитической активности кусочки геля инкубировали в 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 50 мМ NaCl, в течение 3-6 дней при 4°С. Гель удаляли центрифугированием (центрифуга Costar, 10 мин при 10000 об/мин), и супернатант (20 мкл) использовали для определения каталитической активности в соответствии со стандартными методиками определения активности АТ

в окислительно-восстановительных реакциях, описанных выше.

Анализ амилазной активности антител

Для анализа амилазной активности реакционная смесь (15 мкл), содержала 30 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 1,5 мМ 4,6-этилиден(G7)-п-нитрофенил-(G1)- α , D-мальтогептозид и 0,1-0,2 мг/мл IgG; смесь инкубировали 48 ч при 37°С согласно [32]. Продукты гидролиза анализировали методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах Kieselgel F254 (Merck) в системе: уксусная кислота: бутанол-1: вода (1: 3: 1). [32]. Пластины сушили, обрабатывали раствором, содержащим 12,5% концентрированной серной кислоты и 87,5% изопропилового спирта, сушили над нагревателем для визуализации продуктов гидролиза. Активность АТ оценивали из данных сканирования пластин по убыли исходного олигосахарида в процентах с учетом всех его гидролизованных форм.

Анализ АТФ-гидролизующей активности антител

Для анализа АТФазной активности АТ реакционные смеси (10-20 мкл) содержали: 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ АТФ и 0,2-0,4 мг/мл АТ согласно [33, 70]. Реакционные смеси инкубировали в течение 24 ч при 37°С. Продукты гидролиза анализировали методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах Kieselgel F254 (Merck) в системе: диоксан – 10% NH_4OH – H_2O (6: 1: 4). После хроматографии пластины высушивали и продукты гидролиза были определены по поглощению исходного АТФ и его продуктов в ультрафиолетовом свете. Степень гидролиза определяли с помощью программы Image Quant V 5.2 по переходу АТФ в гидролизованные формы.

Статистический анализ

Полученные данные (k_{cat}) приведены как средние значения трех независимых экспериментов со средними отклонениями. Распределение величин k_{cat} полученных независимых выборок не соответствовало распределению Гаусса. Учитывая это, статистическое различие между сериями данных было оценено с помощью критерия Вальда-Вольфовица, при $p \leq 0.05$ различие в данных рассматривалось статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG антител из плазмы крови больных ШЗ и здоровых доноров проводили аффинной хроматографией белков плазмы на Protein G-Sepharose в условиях разрушения неспецифических комплексов [55, 56]. Селективная элюция IgG антител с Protein G-Sepharose кислым буфером (pH 2,6) с последующей высокоэффективной гель-фильтрацией приводит к получению электрофоретически гомогенных препаратов АТ (окраска серебром), которые не содержат примесей IgA, IgM антител или каких-либо других белков [55, 56]. В данной работе нами было получено 18 индивидуальных препаратов IgG из крови больных ШФ и 14 здоровых доноров. На рис. 1 приведены данные анализа гомогенности эквимольных смесей 18 и 14 препаратов АТ больных ШЗ (шз-IgG_{mix}) и здоровых доноров (здор-IgG_{mix}), соответственно. Был проведен анализ относительной активности индивидуальных препаратов в реакциях H₂O₂-зависимого пероксидазного, H₂O₂-независимого оксидоредуктазного окисления ДАБ (см. ниже).

Доказательство принадлежности активности непосредственно антителам

Ранее в работе [39] с помощью ряда жестких критериев было показано, что пероксидазная и каталазная активности антител из крови

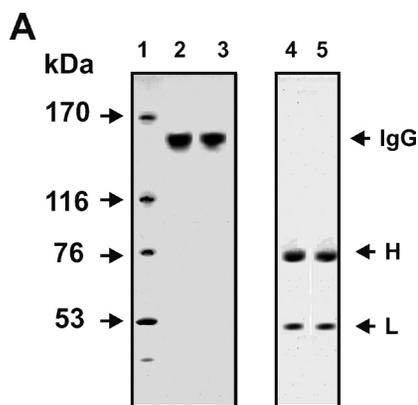


Рис. 1. SDS-PAGE анализ гомогенности IgG_{mix} (7 мкг), соответствующих смесям шф-IgG_{mix} (дорожка 2) из сыворотки 18 больных ШЗ и 14 здоровых доноров здор-IgG_{mix} (дорожка 3), до (дорожки 2 и 3) и после их восстановления с помощью ДТТ (дорожки 4 и 5) с использованием 3-16% градиентного или 12% геля (дорожки 4 и 5, соответственно) с последующим окрашиванием геля коллоидным серебром. Стрелки (дорожка 1) указывают позиции белковых маркеров молекулярных масс.

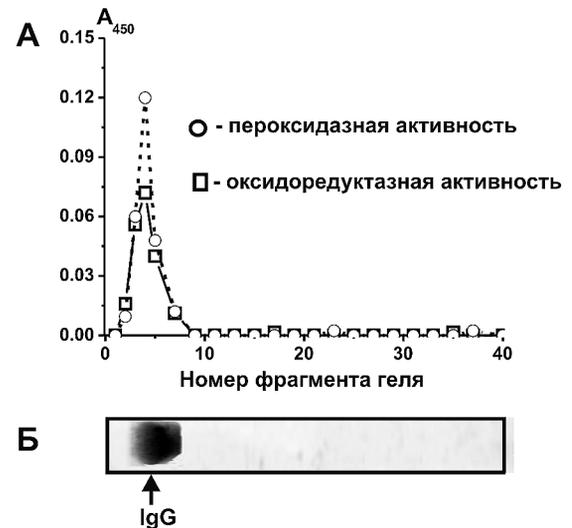


Рис. 2. SDS-PAGE анализ пероксидазной (○) и оксидоредуктазной (□) активностей IgG_{mix} (20 мкг). После электрофореза с использованием градиентного 4-15% геля, его выдерживали в специальных условиях для ренатурации АТ. Относительные активности были оценены с помощью экстрактов 40 фрагментов (2-3-мм) одной из полос геля (А). В стандартные смеси вносили по 20 мкл экстрактов и инкубировали их 24 ч. Средняя ошибка в определении не превышала 10%. Вторая полоса этого же геля была использована для определения положения интактного IgG_{mix} (Б); гель был окрашен Ку-масси R250.

здоровых доноров являются их собственным свойством. IgG антитела удовлетворяли следующим критериям: а) АТ были электрофоретически гомогенными; б) высокоэффективная гель-фильтрация IgG в кислом буфере не приводила к исчезновению обеих активностей, а положение пиков пероксидазной и оксидоредуктазной активностей полностью совпадало с пиком IgG; в) активности исчезали из раствора при добавлении сорбентов с иммобилизованными моноклональными мышинными АТ против IgG человека и элюировались с сорбента только с помощью кислого буфера; г) для исключения возможных артефактов из-за гипотетических следов примесей канонических ферментов, IgG были подвергнуты SDS-PAGE, и их пероксидазная и оксидоредуктазная активности были обнаружены при инкубации стандартных реакционных смесей, содержащей ДАБ, после добавления к ним элюатов коротких фрагментов геля, только в зоне, соответствующей интактным IgG.

Ранее было показано, что если последний критерий выполняется, то выполняются и все

остальные известные критерии отнесения активности непосредственно к антителам [1-7]. Учитывая это, в данной работе при анализе активностей IgG больных ШЗ был проверен только один последний критерий.

Препарат шз-IgG_{mix} был подвергнут SDS-PAGE. После электрофоретического разделения белков из геля был удален SDS, и затем гель был разрезан на мелкие фрагменты (2-3 мм), которые инкубировали с буфером для экстракции белков. Полученные элюаты были использованы для оценки ферментативных активностей (рис. 2). Было показано, что положение пиков пероксидазной и оксидоредуктазной активностей совпадает с положением только интактных шз-IgG_{mix}. Отсутствие других белковых полос и пиков активности однозначно свидетельствовало о том, что полученные препараты IgG не содержат примесей оксидоредуктаз и их способность катализировать окисление ДАБ является их собственным свойством.

Анализ пероксидазной и оксидоредуктазной активностей антител

Были оценены относительные активности всех препаратов IgG в реакциях пероксидазного и оксидоредуктазного окисления ДАБ в фиксированной концентрации (0,2 мг/мл). На рис. 3 приведены типичные кинетические кривые накопления окрашенного продукта в присутствии двух препаратов IgG. Относительные активности индивидуальных препаратов IgG сильно варьировали. Для количественной оценки относительной активности каждого препарата АТ была подобрана концентрация и время инкубации, соответствующие условиям реакции псевдопервого порядка; линейные участки зависимостей скорости реакции от концентрации IgG и времени инкубации. Сначала были оценены значения

поглощения окрашенного продукта (A_{450}), соответствующие линейным участкам кинетических кривых. Затем для оценки относительной активности индивидуальных АТ были рассчитаны кажущиеся величины k_{cat} в окислении ДАБ при фиксированной концентрации этого субстрата по формуле $k_{cat} = V$ (скорость реакции, М/мин) / [IgG] (М). Значения этих величин приведены в таб. 1.

В зависимости от пациента с ШЗ величины k_{cat} , характеризующие пероксидазную (диапазон 20,1-355,8 мин⁻¹) и оксидоредуктазную (диапазон 16,2-155,3 мин⁻¹) активности варьировали в широком диапазоне. Среднее значение пероксидазной (121,4±94,1 мин⁻¹) было примерно в 1,5 раз выше, чем оксидоредуктазной активности (80,9±50,0 мин⁻¹). Методом попарной корреляции Пирсона между пероксидазной и оксидоредуктазной активностями больных шизофренией обнаружена корреляция (коэффициент корреляции = 0,664).

В случае 14 здоровых доноров величины k_{cat} , характеризующие пероксидазную (диапазон 51,6-95,6 мин⁻¹) и оксидоредуктазную (диапазон 41,8-59,7 мин⁻¹) активности также изменяются в широком диапазоне. Среднее значение величины k_{cat} для пероксидазной (67,3±16,4 мин⁻¹) как и в случае больных ШЗ было выше, но только 1,3 раза, чем оксидоредуктазной активности (52,8±5,7 мин⁻¹). Согласно критерию Вальда-Вольфовица данные по пероксидазной и оксидоредуктазной активностям значимо отличаются ($p = 0,001$), а коэффициент корреляции между этими величинами очень низкий (0,27).

Средний уровень пероксидазной активности АТ у больных ШЗ в 1,8 раз, а оксидоредуктазной в 1,5 раз выше, чем у здоровых доноров. Следует отметить, что распределение этих величин у больных ШЗ и здоровых доноров не соответствует распределению Гаусса.

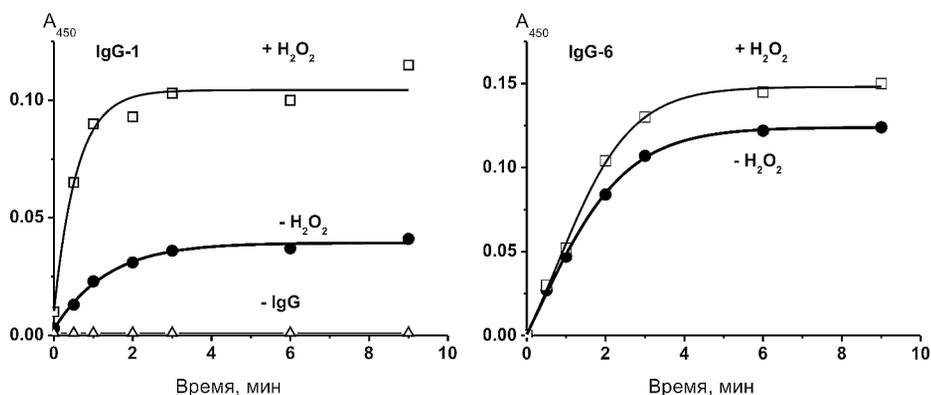


Рис. 3. Типичные кинетические кривые накопления окрашенного продукта (A_{450}) пероксидазного (в присутствии H_2O_2) и оксидоредуктазного (в отсутствие H_2O_2) окисления ДАБ (0,2 мг/мл) в случае 670 нМ IgG-1 и IgG-6. Кривая – IgG – окисление субстрата в отсутствие АТ.

Таблица 1. Относительные значения пероксидазной и оксидоредуктазой активностей (кажущиеся значения k_{cat}) IgG крови больных шизофренией и здоровых людей

Номер IgG и пациента	Кажущееся значение k_{cat} , мин ⁻¹			
	Больные шизофренией		Здоровые доноры	
	Пероксидазная* активность	Оксидоредуктазная* активность	Пероксидазная* активность*	Оксидоредуктазная* активность*
1	82,6	16,2	55,8	50,4
2	20,1	69,1	71,5	43,0
3	31,3	32,0	72,5	57,0
4	25,6	29,8	53,1	55,2
5	355,8	104,1	95,6	59,7
6	36,0	32,3	62,3	58,2
7	172,6	123,6	67,2	50,8
8	191,5	155,3	54,2	49,0
9	79,2	58,4	69,4	41,8
10	257,1	126,6	70,5	55,4
11	150,4	124,3	51,6	54,7
12	67,2	44,4	92,8	58,0
13	198,5	51,3	60,5	56,6
14	104,6	69,3	65,3	49,4
15	222,0	203,7		
16	87,8	93,1	-	-
17	38,0	60,4	-	-
18	64,4	61,5	-	-
Среднее значение k_{cat} , мин ⁻¹ ***	121,4±94,1	80,9±50,0	67,3±16,4	52,8±5,7
Коэффициент корреляции	0,664	0,27		

*Приведено среднее значение трех независимых экспериментов со средними отклонениями. Погрешность определения каждого значения k_{cat} не превышала 10%; кажущиеся значения k_{cat} оценены при фиксированной концентрации ДАБ (0,2 мг/мл) и рассчитаны согласно $V (M/мин) / [IgG] (M)$.

Согласно критерию Вальда-Вольфовица для независимых выборок, наблюдается статистически достоверное отличие в величинах k_{cat} , характеризующих пероксидазную ($p = 0,008$) и оксидоредуктазную ($p = 0,008$) активности антител больных ШЗ и здоровых доноров. Это может указывать на то, что в случае больных ШЗ есть выраженная тенденция к повышению относительных пероксидазной и оксидоредуктазной активностей абзимов, по сравнению со здоровыми донорами, но этот феномен может быть индивидуальным для каждого пациента.

Анализ амилолитической и АТРазной активностей антител

Ранее было показано, что кровь здоровых доноров [26], больных СКВ [26-29] и РС [30, 31]

и другими АИЗ [26], а также кровь аутоиммунных MRL-*lpr/lpr* мышей [32, 70] содержит абзимы с высокой амилолитической активностью. Принадлежность этих активностей непосредственно антителам была доказана с использованием жестких критериев, описанных выше. Учитывая это, можно было предполагать, что кровь больных ШЗ также может содержать АТ, гидролизующие олигосахариды. Однако нами был получен неожиданный результат. В то время как контрольные АТ аутоиммунных мышей и женского молока эффективно гидролизировали олигосахарид, из 18 IgG препаратов больных ШЗ только 1 препарат гидролизировал мальтогептозид (дор. 15, **рис. 4**).

Кровь аутоиммунных мышей [33, 70] и женское молоко [34] содержат абзимы, эффектив-

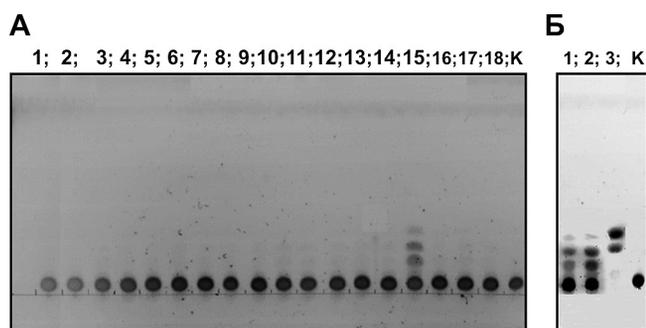


Рис. 4. Анализ амилазной активности IgG методом ТСХ; дорожки 1-18 соответствуют 24 ч инкубации 1, мМ олигосахарида в присутствии 0,1 мг/мл IgG от 18 различных больных ШЗ. Положительные контроли гидролиза олигосахарида с помощью 0,1 мг/мл IgG антителами из крови двух аутоиммунных мышей (дорожки 1 и 2) и 0,05 мг/мл sIgA молока здоровых женщин (дорожка 3) в течение 12 ч (Б). Дорожки К – инкубация олигосахарида в отсутствие АТ (А и Б).

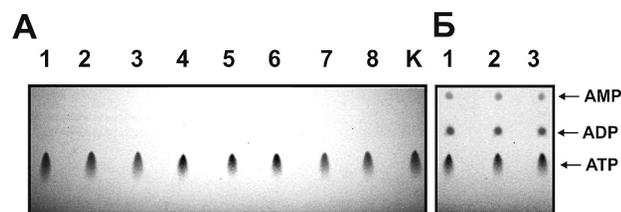


Рис. 5. Анализ АТРазной активности IgG методом ТСХ; дорожки 1-8 соответствуют 24 ч инкубации 2 мМ АТР в присутствии 0,4 мг/мл IgG от 8 различных больных ШЗ. Положительные контроли гидролиза АТР с помощью 0,05 мг/мл IgG антителами из крови двух аутоиммунных мышей (дорожки 1 и 2) и sIgA молока здоровых женщин (дорожка 3) в течение 2 ч (Б). Дорожка К – инкубация АТР в отсутствие АТ (А).

но гидролизующие АТР и другие нуклеотиды. Однако ни один из 18 препаратов больных ШЗ не расщеплял эффективно АТР даже в течение 24 ч при очень высокой концентрации IgG (0,4 мг/мл) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени, в крови больных ШЗ обнаружены абзимы, гидролизующие ДНК и основной белок миелина [63, 72-74]. Как указано выше, абзимы с амилазной и АТРазной активностью обнаружены при некоторых аутоиммунных заболеваниях и в молоке здоровых женщин. В то же время таких абзимов нет в крови больных ШЗ. Этот феномен пока не имеет объяснения.

В настоящее время пока непонятно происхождение абзимов с различными окислительно-восстановительными функциями: супероксиддисмутазной, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной. В случае АТ (из крови людей с различными аутоиммунными и вирусными заболеваниями) с протеолитической, нуклеазной и амилолитической активностями достаточно очевидны антигены, которые стимулируют выработку этих абзимов [1-7]. В ряде работ проведено моделирование возможных аутоантигенов, которые могут вести к выработке антител с различными активностями при АИЗ. Так АТ с ДНК- и РНК-гидролизующей активностями нарабатываются при иммунизации животных ДНК, РНК, ДНКазой I, ДНКазой II и панкреатической РНКазой [65-69]. При этом абзимы, образующиеся при иммунизации ДНКазой I, ДНКазой II РНКазой [65-69], в основном являются вторичными – антиидиотипическими АТ против активных центров этих ферментов. Абзимы, гидролизующие белки и пептиды, образуются при иммунизации животных некоторыми пептидами и белками, а АТ с амилолитической активностью – полисахаридами [1-7]. Свободные молекулы этих антигенов или в комплексах с белками могут имитировать переходные состояния химических реакций и, как следствие, индуцировать выработку расщепляющих их абзимов [1-7]. Как показано в работах [70, 71] при развитии АИЗ происходит “нарушение” иммунной системы костного мозга; наблюдается резкое изменение профиля дифференцировки и уровня пролиферации, как стволовых клеток, так и лимфоцитов костного мозга. При иммунизации здоровых животных также происходит выработка АТ к используемым антигенам, включая абзимы, но при этом существенных изменений профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга не наблюдается [70, 71]. Развитие иммунного ответа у здоровых животных происходит в основном на уровне клональной додифференцировки и увеличения скорости пролиферации иммунокомпетентных клеток селезенки, лимфатических узлов, тимуса и других органов [70, 71].

Абзимы с супероксиддисмутазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями присутствуют в крови всех здоровых особей [38-47]. Природа происхождения этих абзимов, пока остается неясной. Пока непонятно, какие антигены могут стимулировать выработку

ку таких абзимов и относятся ли эти абзимы к полиреактивным АТ, имеющим существенно пониженное сродство к самым разным антигенам. Как показано в работе [47], IgG здоровых крыс с пероксидазной и оксидоредуктазной активностями способны окислять самые разные ароматические амины, фенолы, хиноны и другие соединения с мутагенными свойствами. Известно, что в кровь различными путями, включая пищу и лекарственные препараты, постоянно попадают самые разные соединения, которые подвергаются направленной деструкции под действием разного рода ферментов, включая ферменты, катализирующие реакции окисления. Не исключено, что именно комплексы этих соединений и их продуктов превращения с этими ферментами могут стимулировать наработку абзимов с окислительно-восстановительными ферментативными функциями. В то же время известно, что ферменты с антиоксидантными функциями (СОД, каталаза и пероксидазы) попадают и постоянно присутствуют в крови млекопитающих, но время их жизни относительно маленькое [37]. Тем не менее, нельзя исключить, что абзимы с окислительно-восстановительными функциями могут быть антиидиотипическими антителами к этим ферментам. Иммуноглобулины разных классов устойчивы к различным протеолитическим ферментам крови и циркулируют в крови достаточно долгое время. Учитывая это, можно предположить, что АТ с супероксиддисмутазной активностью могут катализировать превращение супероксидного радикала в перекись водорода, а абзимы с пероксидазной и оксидоредуктазной активностью нейтрализовать вредное действие H₂O₂.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами Проекта № 1.7.15 Подпрограммы 1 комплексной программы Сибирского отделения РАН (III.2П.1), Российского научного фонда (16-04-00603 и 16-04-00604); Базовым проектом ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.5, 0309-2016-0003) и Бюджетным проектом 0324-2016-0000

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENS

1. Catalytic antibodies. (E. Keinan eds) Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Germany, 2005, pp.1-586.
2. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral pathologies. *J. Cell Mol. Med.* 2003, 7, 265-276.
3. Nevinsky G. A., Buneva B. N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. *J. Immunol. Methods* 2002, 269, 235-249.
4. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies – abzymes. In: *Catalytic antibodies* (E. Keinan, Eds). VCH-Wiley press, Germany, 2004, pp. 503-567.
5. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases. In: *Autoimmune diseases: symptoms, diagnosis and treatment* (K. J. Brenner Eds.), Nova Science Publishers, Inc., New York, NY, 2010, pp. 1-107.
6. Nevinsky G. A. Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation. In *Multiple sclerosis* (A. Gonzales-Quevedo Eds), InTech, Rijeka, Croatia, 2016, pp 100-147.
7. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients. In *Understanding HIV/AIDS Management and Care – Pandemic Approaches the 21st Century* (F. H. Kasenga Eds), InTech, Rijeka, Croatia. 2011, pp. 151-192.
8. Paul S., Volle D. J., Beach C. M., Johnson D. R., Powell M. J., Massey R. J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* 1989, 244, 1158-1162.
9. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., Kazatchkine M. D., Kaveri S. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *J. Immunol.* 1995, 154, 3328-3332.
10. Kalaga R., Li L., O'Dell J. R., Paul S. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 1995, 155, 2695-2702.
11. Thiagarajan P., Dannenbring R., Matsuura K., Tramontano A., Gololobov G., Paul S. Monoclonal antibody light chain with prothrombinase activity. *Biochemistry*, 2000, 39, 6459-6465.
12. Lacroix-Desmazes S., Moreau A., Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebek J., Kazatchkine M. D., Kaveri S. V. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat. Med.* 1999, 5, 1044-1047.
13. Polosukhina D. I., Kanyshkova T., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2004, 8, 359-368.
14. Polosukhina D. I., Buneva V. N., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Med. Sci. Monit.* 2005, 11, BR266-272.
15. Polosukhina D. I., Kanyshkova T. G., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol. Lett.* 2006, 103, 75-81.

16. Bezuglova A. V., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Mol. Recognit.* 2011; 24, 960-974.
17. Bezuglova A. M., Dmitrenok P. S., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Peptides* 2012, 37, 69-78.
18. Timofeeva A. M., Dmitrenok P. S., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Multiple sites of the cleavage of 21- and 25-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2013, 8, e51600.
19. Оди́нцова Е. С., Харитонова М. А., Барановский А. Г., Сизякина Л. П., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека. *Биохимия* 2006, 71, 320-332. [Odintsova E. S., Kharitonova M. A., Baranovskii A. G., Sizyakina L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. *Biochemistry (Mosc)*. 2006, 71(3), 251-261].
20. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parisi V., Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients. *Biochimie* 2009, 91, 1081-1086.
21. Izadyar L., Friboulet A., Remy M. H., Roseto A., Thomas D. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 8876-8880.
22. Kolesnikov A. V., Kozyr A. V., Alexandrova E. S., Koralevski F., Demin A. V., Titov M. I., Avalle B., Tramontano A., Paul S., Thomas D., Gabibov, A. G., Friboulet A. Enzyme mimicry by the antiidiotypic antibody approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 13526-13531.
23. Hu R., Xie G. Y., Zhang X., Guo Z. Q., Jin S. Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibody exhibiting a catalytic activity similar to carboxypeptidase A. *J. Biotechnol.* 1998, 61, 109-115.
24. Friboulet A., Izadyar L., Avalle B., Roseto A., Thomas D. Abzyme generation using an anti-idiotypic antibody as the "internal image" of an enzyme active site. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994, 47, 229-237.
25. Debat H., Avalle B., Chose O., Sarde C.-O., Friboulet A., Thomas D. Overpassing an aberrant V(kappa) gene to sequence an anti-idiotypic abzyme with (beta)-lactamase-like activity that could have a linkage with autoimmune diseases. *FASEB J.* 2001, 15, 815-822.
26. Saveliev A. N., Enelskaya E. V., Shabalin K. A., Filatov M. V., Neustroev K. N. Autoantibodies with amyolytic activity. *Prot. Pept. Lett.* 1999, 6, 179-184.
27. Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Ershova N. A., Eneyskaya E. V., Shabalin K. A., Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Buneva V. N., Nevinsky G. A., Neustroev K. N. Human autoantibodies with amyolytic activity. *Biologia.* 2002;11:253-260.
28. Savel'ev AN, Kulminskaya AA, Ivanen DR, Nevinsky GA, Neustroev KN. Human antibodies with amyolytic activity. *Trends Glycosci Glycotechnol.* 2004;16:17-31.
29. Neustroev KN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer IH, Saveliev AN, Saveliev AN, Nevinsky GA. Amyolytic activity and catalytic properties of IgM and IgG antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Hum antibodies.* 2003;12:31-34.
30. Saveliev AN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Ershova NA, Kanyshkova TG, Buneva VN, Mogelnitskii AS, Doronin BM, Favorova OO, Nevinsky GA, Neustroev KN. Amyolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2003;86:291-297.
31. Ivanen DR, Kulminskaya AA, Shabalin KA, Isaeva-Ivanova LV, Saveliev AN, Nevinsky GA, Shabalin KA, Neustroev KN. Catalytic properties of IgMs with amyolytic activity isolated from patients with multiple sclerosis. *Med Sci Monit.* 2004;10: BR 273-BR 280.
32. Andryushkova AA, Kuznetsova IA, Orlovskaya IA, Buneva VN, Nevinsky GA. Antibodies with amylase activity from the sera of autoimmune-prone MRL/MpJ-lpr mice. *FEBS Lett.* 2006;580:5089-5095.
33. Andryushkova AS, Kuznetsova IA, Orlovskaya IA, Buneva VN, Nevinsky GA. Nucleotide-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice. *Int Immunol.* 2009;21:935-945.
34. Semenov D. V., Kanyshkova T. G., Karotaeva N. A., Gorbunov D. V., Kuznetsova I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Catalytic nucleotide-hydrolyzing antibodies from milk of healthy human mothers, *Med, Sci, Monit.*, 2004, V. 10(2), P. BR 23-BR 33.
35. Allen R. G. Free radicals in aging, Boca Raton, FL: CPC Press 1998, 12-23.
36. Ceballos-Picot I., Nicole A., Clement M., Bourre J. M., Sinet P. M. Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutat. Res.* 1992, 275, 281-293.
37. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс. *Майк, Наука /Интерпериодика* 1993, 343 с. [Zenkov N. K., Lankin V. Z., Men'shchikova E. B. *Oxidative stress. Maiik, Nauka/Interperiodika* 1993, 343 p.]
38. Wentworth A. D., Jones L. H., Wentworth P. Jr., Janda K. D., Lerner R. A. Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 10930-10935.
39. Wentworth P. Jr., Jones L. H., Wentworth A. D., Zhu X., Larsen N. A., Wilson I. A., Xu X., Goddard W. A., 3rd, Janda K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A. Antibody

- catalysis of the oxidation of water. *Science* 2001, 293, 1806-1811.
40. *Wentworth P. Jr., Niewa J., Takeuchi C., Galve R., Wentworth A. D., Dilley R. B., DeLaria G.A., Savev A., Babior B. M., Janda K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A.* Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science* 2003, 302, 1053-1056.
 41. *Генералов И. И., Новиков Д. К., Жильцов И. В.* Вести национальной академии наук Беларуси, сер. биол. наук 1999, 1, 90-96. [*Generalov I. I., Novikov D. K., Zhiltsov I. V.* *Vesti Natsyuanal'nai Akademii Navuk Belarusi, Seryya Biyalagichnykh Navuk*, 1999, 1, 90-96].
 42. *Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* IgG antibodies with peroxidase-like activity from the sera of healthy Wistar rats. *FEBS Lett.* 2005, 579, 3960-3964.
 43. *Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Metal ions-dependent peroxidase and oxidoreductase activities of polyclonal IgGs from the sera of Wistar rats. *J. Mol. Recognit.* 2006, 19, 91-105.
 44. *Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Sinitsina O. I., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Substrate specificity of rat sera IgG antibodies with peroxidase and oxidoreductase activities. *J. Mol. Recognit.* 2006, 19, 432-440.
 45. *Tolmacheva A. S., Zaksas N. P., Buneva V. N., Vasilenko N. L., Nevinsky G. A.* Oxidoreductase activities of polyclonal IgGs from the sera of Wistar rats are better activated by combinations of different metal ions. *J. Mol. Recognit.* 2009, 22, 26-37.
 46. *Толмачева А. С., Василенко Н. Л., Заксас Н. П., Синицина О. И., Бунева В. Н., Невинский Г. А.* Иммуноглобулины класса G из крови здоровых крыс Wistar окисляют амины. *Рос. журн. иммунол.* 2009, 3, 39-48. [*Tolmacheva A. S., Vasilenko N. L., Zaksas N. P., O. I. Sinitsina N. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* *Russian Journal of Immunology*, 2009, 3, 39-48]
 47. *Tolmacheva A. S., Blinova E. A., Ermakov E. A., Buneva V. N., Vasilenko N. L., Nevinsky G. A.* IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans. *J. Mol. Recognit.* 2015 28, 565-580.
 48. *Goldner E. M., Hsu L., Waraich P., Somers J. M.* Prevalence and incidence studies of schizophrenic disorders: a systematic review of the literature. *Can. J. Psychiatry* 2002, 47, 833-843.
 49. *Pienry F., Lelli L., Lo Sauro C., Faravelly C.* Epidemiology of social phobia. *Riv. Psichiatri.* 2009, 44, 203-213.
 50. *Ещенко Н. Д.* Биохимия психических и нервных болезней. Избранные разделы: Учебное пособие. Санкт-Петербург, Россия: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета. 2004, с. 1-200. [*Eschenko N. D.* *Biochemistry of psychiatric and neurological diseases. Selected sections: Publishing House of St Petersburg State University, St Petersburg, Russia*, 2004, pp. 1-200].
 51. *Mura G., Petretto D. R., Bhat K. M., Carta M. G.* Schizophrenia: from epidemiology to rehabilitation. *Clin. Pract. Epidemiol. Ment. Health* 2012, 8, 52-66.
 52. *Wood S. J., Yücel M., Pantelis C., Berk M.* Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress. *Ann. Acad. Med. Singapore* 2009, 38, 396-401.
 53. *Yao J. K., Reddy R.* Oxidative stress in schizophrenia: pathogenetic and therapeutic implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 2011, 15, 1999-2002.
 54. *Lahti A. C., Weiler M. A., Tamara M., Parwani A., Tamminga C. A.* Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacol.* 2001, 25, 455-467.
 55. *Burbaeva G. S., Turishcheva M. S., Vorobyeva E. A., Savushkina O. K., Tereshkina E. B., Boksha I. S.* Diversity of glutamate dehydrogenase in human brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2002, 26, 427-435.
 56. *Прилипко Л. Л.* Процессы перекисного окисления липидов как один из факторов модификации мембраносвязанных белков нервных клеток при шизофрении. *Вестн. РАМН*, 1981, 1, 33-36. [*Prilipko L. L., Vestn. RAMN* 1981, 1, 33-36].
 57. *Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Агарков А. П., Степная Е. А.* Патология клеточных мембран при шизофрении //Томск: Изд-во Том. ун-та.–2004. 122 с. [*Ryazantseva N. V., Novitsky V. V., Agarkov A. P., Stepovaya E. A.* *Pathology of cell membranes in schizophrenia. Tomsk // Russia: Publishing House of Tomsk State University*, 2004, pp. 1-122].
 58. *Клюшник Т. П., Сирияченко Т. М., Сарманова З. В., Отман И. Н., Дупин А. М., Соколов Р. Е.* Динамика содержания антител к нейроантигенам в сыворотке крови больных шизофренией в процессе терапии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2008, 108, 61-64. [*Kliushnik T. P., Siriachenko T. M., Sarmanova Z. V., Otman I. N., Dupin A. M., Sokolov R. E.* *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova* 2007, 108, 61-64].
 59. *Deakin J., Lennox B. R., Zandi M. S.* Antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor and other synaptic proteins in psychosis. *Biol. Psychiatry* 2014, 75, 284-291.
 60. *Torrey E. F., Yolken R. H.* The schizophrenia-rheumatoid arthritis connection: infection, immune, or both? *Brain. Behav. Immun.* 2001, 15, 401-410.
 61. *Othman S. S., Abdul Kadir K., Hassan J., et al.* High prevalence of thyroid function test abnormalities in chronic schizophrenia. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 1994, 28, 620-624.
 62. *Hardoy M. C., Cadeddu M., Serra A., et al.* A pattern of cerebral perfusion anomalies between major depressive disorder and Hashimoto thyroiditis. *BMC Psychiatry* 2011, 11, 148.
 63. *Ermakov E. A., Smirnova L. P., Parkhomenko T. A., Dmitrenok P. S., Krotenko N. M., Fattakhov N. S., Bokhan N. A., Semke A. V., Ivanova S. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia. *Open Biol.* 2015, 5, 150064.
 64. *Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Szyzalkina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parissi V.,*

- Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients. *Biochimie* 2009, 91, 1081-1086.
65. Красноруцкий М. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Антитела против ДНК гидролизуют ДНК и РНК. *Биохимия*. 2008, 73, 1547-1560. [Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. *Biochemistry* (Mosc). 2008, 73, 1242-1253].
66. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against RNA hydrolyze RNA and DNA. *J. Mol. Recognit.*, 2008, 21, 337-346.
67. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities. *J. Mol. Recognit.* 2008, 21, 233-242.
68. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Anti-RNase Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA. *Int. Immunol.* 2008, 20, 1031-1040.
69. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase II leads to formation of polyclonal antibodies with DNase and RNase activities. *Int. Immunol.*, 2009, 21, 349-360.
70. Andryushkova A. S., Kuznetsova I. A., Buneva V. N., Toporkova L. B., Sakhno L. V., Tichonova M. A., Chernykh E. R., Orlovskaya I. A., Nevinsky G. A. Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors. *J. Cell. Mol. Med.* 2007, 11, 531-551.
71. Doronin V. B., Parkhomenko T. A., Korablev A., Toporkova L. B., Lopatnikova J. A., Alshevskaja A. A., Sennikov S. V., Buneva V. N., Budde T., Meuth S. G., Orlovskaya I. A., Popova N. A., Nevinsky G. A. Changes in different parameters, lymphocyte proliferation and hematopoietic progenitor colony formation in EAE mice treated with myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Cell Mol. Med.* 2016, 20, 81-94.
72. Parshukova D., Smirnova L., Buneva V. Potential role of antibodies with catalytic activity in therapy of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharm.* 2014, 24, Supplement 2, S249.
73. Parshukova D. A., Smirnova L. P., Buneva V. N., Semke A. V., Ivanova S. A. Proteolytic hydrolysis of myelin basic protein by IgGs during long-term treatment of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharm.* 2015, 25 (Suppl. 2), 272-273.
74. Parshukova D., Sedykh S., Smirnova L., Buneva V., Ivanova S., Semke A. Study of the level of IgG to myelin basic protein and their catalytic activity in schizophrenic patients. *Eur. Neuropsychopharm.* 2016, 26, S215-S216.

FEATURES OF OXIDOREDUCTASE, AMYLASE AND ATPASE ACTIVITIES OF IgG ANTIBODIES FROM BLOOD OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

© 2017 E. A. Ermakov^{1,2}, A. S. Tolmacheva³, V. N. Buneva¹,
L. P. Smirnova², S. A. Ivanova², G. A. Nevinsky¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; ²Scientific Research Institute of Mental Health of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia; ³Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 24.04.2017. Accepted: 11.09.2017

Electrophoretically and immunologically homogeneous IgG preparations were isolated from blood plasma of 18 patients with schizophrenia (SHZ) and 14 healthy donors by affinity chromatography on Protein G-Sepharose with subsequent high-performance gel-filtration. H₂O₂-dependent peroxidase and H₂O₂-independent oxidoreductase activities of polyclonal IgG of SHZ patients and healthy donors in the oxidation of 3,3'-diaminobenzidine were compared for the first time. All IgG antibodies of SHZ patients and healthy donors possess these activities, but the apparent k_{cat} values varied in a very wide range (16,2-355,8 min⁻¹). The average oxidation rates of the substrate in the presence of H₂O₂ from the plasma of SHZ patients and healthy donors were 1,3-1,5 times higher than in the absence of H₂O₂. The difference between the average peroxidase (1,8 times) and oxidoreductases (1,5 times) activities of IgG from blood plasma of SHZ patients and healthy donors was statistically significant ($p = 0,008$). The correlation coefficient of oxidoreductase and peroxidase activities of antibodies of patients with SHZ was significantly higher (0,664) than for healthy donors (0,27). A possible biological role and the nature of abzymes origin with oxidoreductase functions are discussed. The blood of healthy donors and patients with various autoimmune diseases usually contains abzymes with amylase and ATPase activities. In the case of 18 patients with SHZ amylase activity was detected only for one IgG preparation, but all 18 IgGs were inactive in the hydrolysis of ATP.

Key words: abzymes, patients with schizophrenia, healthy donors, oxidoreductases, amylase and ATPase activities

Authors:

Ermakov E.A., post-graduate student of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the RAS, Novosibirsk, Russia;

Tolmacheva A.S., post-graduate student of the Institute of Cytology and Genetics of the RAS, Novosibirsk, Russia;

Smirnova L.P., Ph.D., Senior Researcher, "Research Institute of Mental Health, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia;

Ivanova S.A., Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Head. Laboratory, "Research Institute of Mental Health, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia;

Buneva V.N., Doctor of Sciences (Biology), Professor, Chief Researcher of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the RAS, Novosibirsk, Russia;

Nevinsky G.A., ☒ Doctor of Sciences (Chemistry), professor, Head of Laboratory of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the RAS, Novosibirsk, Russia. 630090 Russia, Novosibirsk, Lavrentiev Ave., 8. Tel/fax: 007(383)3635153. **E-mail:** nevinsky@niboch.nsc.ru