

**КАТАЛАЗНАЯ И СОД АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

Смирнова Л. П.¹,
Воронина В. С.²,
Антипина П. А.²,
Казанцева Д. В.¹,
Костромицкий Д. Н.³,
Юнусова Н. В.^{3,2}

¹ НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск, Россия.

² Сибирский Государственный Медицинский Университет, Томск, Россия.

³ НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия.

**CATALASE AND SOD ACTIVITY OF SERUM IMMUNOGLOBULIN G IN
COLORECTAL CANCER**

Smirnova L. P. ^a,
Voronina V. S. ^b,
Antipina P. A. ^b,
Kazantseva D. V. ^a,
Kostromitsky D. N. ^c,
Yunusova N. V. ^{c, b}

^a Mental Health Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.

^c Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia.

Резюме

Изучение антител, обладающих каталитическими свойствами, в частности IgG с оксидоредуктазными активностями при онкологической патологии – это относительно новое направление в онкологии, с крайне небольшим количеством публикаций. Целью настоящей работы явилось исследование каталазной и супероксиддисмутазной (СОД) активностей IgG пациентов с колоректальным раком (КРР) в зависимости от клинкоморфологических параметров заболевания. Материалы и методы. В работе использовалась сыворотка крови от 20 пациентов с колоректальным раком (Т3-4N0-2M0) с высоко и низкодифференцированными опухолями и 18 условно-здоровых доноров, Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Выделение IgG из сыворотки крови проводили с помощью аффинной хроматографии на колонках с Protein-G-Sepharose на хроматографе АКТА pure (GE, USA). Диализ антител проводили против 20 мМ фосфатного буфера, pH=7,0. Концентрацию IgG определяли спектрофотометрическим методом на многофункциональном ридере Varioskan LUX (Thermo Seintific, USA) Электрофоретический анализ полученных препаратов проводился по Леммли в градиентном 4-18% ПААГ. Визуализация гелей проводилась с помощью системы iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, США) Каталазную и СОД активность препаратов антител определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Varian Cary 60 UV-Vis (Agilent, USA). Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 12.0. Результаты. В представленной работе впервые показано, что IgG пациентов с КРР способны катализировать каталазную и СОД реакции, и что данная активность является собственным свойством антител. Выявлено, что обе изучаемые активности абзимов достоверно увеличены у больных в сравнении со здоровыми лицами. Показано, что у больных КРР со второй стадией опухолевого процесса каталазная активность антител в 1,8 раза выше ($p=0,015$) по сравнению с аналогичной активностью у пациентов с третьей стадией КРР. Каталазная активность IgG статистически значимо снижена в 2 раза у больных с низкодифференцированным КРР по сравнению с пациентами с высокодифференцированным КРР ($p=0,045$). СОД активность абзимов у больных с высокодифференцированным КРР, напротив в 1,7 раза ниже чем у пациентов с низкодифференцированным КРР ($p=0,021$). Таким образом, изучаемые оксидоредуктазные активности абзимов у больных КРР, очевидно, вносят значимый вклад в патогенез КРР и могут использоваться для прогноза развития заболевания.

Ключевые слова: колоректальный рак, абзимы, IgG, каталазная активность, СОД активность, сыворотка крови, окислительный стресс.

Abstract

The study of antibodies with catalytic properties, in particular IgG with oxidoreductase activities in cancer pathology is a relatively new direction in oncology, with very few publications. The aim of the present work is to investigate the catalase and superoxide dismutase (SOD) activities of IgG from patients with colorectal cancer (CRC) depending on the clinical and morphologic parameters of the disease. **Materials and Methods.** Blood serum from 20 patients with colorectal cancer (T3-4N0-2M0) with highly and low-differentiated tumors and 18 conditionally healthy donors was used in the study. The groups were comparable by sex and age. Samples of IgG were received from serum by affine chromatographic method on column with Protein-G-Sepharose on the chromatograph AKTA pure (GE, USA). Dialysis of antibodies was performed against 20 mM phosphate buffer, pH=7.0. IgG concentration was determined by spectrophotometric method on a Varioskan LUX multifunctional reader (Thermo Seintific, USA). Electrophoretic analysis of the obtained samples was carried out according to the Lemmli method in gradient 4-18% PAGE. Visualization of the gels was performed using an iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, USA). Catalase and SOD activities of the antibody samples were spectrophotometrically determined on a Varian Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (Agilent, USA). Statistical processing of the data was carried out in Statistica 12.0 program. **Results.** In the presented work, it is shown for the first time that IgG of CRC patients are able to catalyze catalase and SOD reactions and that this activity is an intrinsic property of the antibodies. It was revealed that both studied IgG activities were significantly increased in patients compared to healthy individuals. It is shown that IgG catalase activity in CRC patients with the second stage of tumor process is 1.8 times higher ($p=0.015$) in comparison with the similar activity in CRC patients with the third stage of tumor process. The IgG catalase activity in patients with low-differentiated CRC is significantly decreased by 2 times ($p=0.045$) in comparison with patients with highly differentiated CRC. On the contrary, IgG SOD activity in patients with highly differentiated CRC is 1.7 times lower ($p=0.021$) in comparison with patients with low-differentiated CRC. Thus, the studied oxidoreductase activities of abzymes in patients with CRC obviously make a significant contribution to the pathogenesis of CRC and can be used for prognosis of the disease development.

Keywords: Colorectal cancer, abzymes, IgG, catalase activity, SOD activity, serum, oxidative stress.

1 Введение

Известно, что окислительный стресс является важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний, в том числе онкологических. Окислительный стресс (ОС) определяется как дисбаланс между продукцией активных форм кислорода (АФК) и эффективностью антиоксидантной защиты. То есть ОС является результатом гиперпродукции прооксидантов и/или снижения способности организма нейтрализовать их, что приводит к окислительному повреждению клеток и тканей [17]. Постулируется, что у онкологических больных наблюдаются изменения в системе антиоксидантной защиты организма, которое приводит к увеличению образования свободных радикалов и АФК, нарушению регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. Давно известно, что иммунная система в организме-опухоленосителе так же претерпевает значительные изменения и играет весомую роль в патогенезе заболевания. Гиперпродукция IgG имеет место при ряде злокачественных новообразований. Для большинства больных множественной миеломой характерна моноклональная гаммапатия с гиперпродукцией антител IgG. Ассоциация моноклональной гаммапатии с В-клеточными неходжкинскими лимфомами является известным феноменом. [13, 21]. Также значимая роль отводится IgG, которые участвуют в регуляции клеточных взаимодействий в опухолевом микроокружении. Иммуноглобулины класса G, экспрессируемые раковыми клетками, оказывают протуморогенное действие путем стимулирования злокачественного поведения раковых клеток, индуцирования воспаления и активации агрегации тромбоцитов [12]. Очевидно, что во всех этих процессах задействован окислительный стресс, оказывающий кроме повреждающего ещё и сигнальное действие, регулирующие пролиферацию опухолевых клеток [8]. В связи с этим становится актуальным изучение антител, обладающими каталитическими свойствами, в частности IgG с оксидоредуктазными активностями при онкологической патологии. Эти каталитические антитела у людей были открыты относительно недавно и изучались в основном при психических расстройствах и аутоиммунной патологии [5, 6, 14, 18]. Но при онкологической патологии имеются буквально единичные работы в этой области: у пациенток с новообразованиями молочной железы выявлена каталазная активность IgG и IgA [7]. Пока нет ни одной работы, изучающей каталитические антитела при колоректальном раке (КРР). Колоректальный рак (КРР) является одной из самых частых форм злокачественных новообразований [11]. Он занимает третье место по распространенности, после рака легких и рака молочной железы. Также КРР занимает второе место по смертности, уступая только раку легких [19]. Все это обуславливает актуальность изучения каталитических антител с оксидоредуктазными активностями при колоректальном раке.

Таким образом, целью настоящей работы явилось исследование каталазной и супероксиддисмутазной активностей IgG пациентов с колоректальным раком в зависимости от клинко-морфологических

параметров заболевания.

2 Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали сыворотку периферической крови пациентов с KPP, получавших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2022 по 2023 год и здоровых доноров. Здоровые доноры были представлены группой волонтеров, у которых были исключены злокачественные новообразования и аутоиммунные заболевания, медиана возраста – 55 [50,5;64,5] лет.

На основании практических рекомендаций по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения (RUSSCO, 2019) были сформированы следующие клинические группы: больные с локализованным ($n=7$, II стадия, $T_3N_0M_0$) и местно-распространенным ($n=13$, III стадия, $T_4N_0M_0$, $T_{2-4}N_{1-2}M_0$) KPP, медиана возраста которых составила 64,5 [60;70] года. У всех больных при гистологическом исследовании были выявлены аденокарциномы различной степени дифференцировки. Критериями включения пациентов в исследование являлись: согласие пациента на участие в исследовании, KPP $T_{2-4}N_{0-2}M_0$. Критериями исключения при формировании группы KPP являлись первично-множественные формы KPP и рак Ia стадии ($T_1N_0M_0$), рак прямой кишки с поражением средне- и нижеампулярного отдела, наличие аутоиммунных заболеваний в анамнезе. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №15 от 10 февраля 2022 г.). Информированное согласие было получено от всех пациентов, участвовавших в исследовании.

Взятие крови проводилось из локтевой вены в одноразовые стерильные пробирки Vacutainer, у больных KPP – до начала лечения. Пробирки с цельной кровью центрифугировали при 1000 g в течение 20 минут при температуре +4 °C в охлаждаемой центрифуге TGL-24MC (Drawell, Китай) для отделения сыворотки от форменных элементов.

Выделение IgG из плазмы крови методом аффинной хроматографии

Иммуноглобулинов класса G (AT) выделяли методом аффинной хроматографии на хроматографе AKTA pure (GE Healthcare, Швеция) на колонке с Protein G-Sepharose. Сыворотку крови здоровых доноров и больных KPP в объеме 500 мкл разводили 1:4 буфером А (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 и 150 mM NaCl). Затем наносили на колонку с Protein-G Sepharose объемом 1 мл. Белки, не реагирующие с аффинным сорбентом, отмывали с колонки буфером А до полного исчезновения поглощения при 280 нм. Неспецифически связанные белки и липиды элюировались буфером А с содержанием 1% Triton X-100, после чего колонку промывали буфером А до исчезновения оптической плотности элюата. IgG элюировали с колонки с помощью кислого буфера Б (100 mM glycine-HCl, pH 2,6). Полученные фракции AT сразу были нейтрализованы 1M буфером Tris-HCl, pH=7,5. В последствии был проведен диализ очищенных AT против 20 mM Na-фосфатного буфера, pH 7,0 при +4°C в течение 17 часов [1].

Определение концентрации белка

Концентрацию АТ в полученных образцах определяли спектрофотометрическим методом на многофункциональном ридере Thermo Seinctific Varioskan LUX (США) (прибор размещен на базе ЦКП "Медицинская геномика", ТНИМЦ) при длине волны 260 нм, 280 нм и 320 нм. Анализ полученных данных и определение концентрации белка проводились с использованием программного пакета Thermo Seinctific Skanlt Software 6.0

Электрофоретический анализ гомогенности АТ

Электрофоретический анализ белков проводили по методу Леммли (Laemmli U.K., 1970) в 4–18% градиентном полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрирующий гель содержал 4% акриламид (соотношение AA: BisAA=30:1), 125 мМ Трис-НCl, pH 6,8, 0,5%-ный SDS; разделяющий гель – 5–20% AA, 375 Мм Трис-НCl, pH 8,8, 0,4%-ный SDS. Антитела инкубировали при 100°C в течение 1 мин в буфере, содержащем 50 Мм Трис-НCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% глицерин, 0,025% бромфеноловый синий. Далее в карман геля наносили 15 мкл образцов АТ на дорожку и в один карман наносили 5 мкл маркера молекулярного веса. Электрофорез проводили в течение 1-2 ч при напряжении 180В. Белки в геле окрашивали Coomassie Blue R-250. Отмывочный раствор содержал 24% этилового спирта и 40% уксусной кислоты. Визуализация гелей проводилась с помощью системы гель-документации iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Fisher Scientific, США) (прибор размещен на базе ЦКП "Медицинская геномика", ТНИМЦ).

Вестерн-блоттинг

После проведения электрофореза препараты IgG переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НЦ-мембрану) в течение 30 минут при силе тока 0,5 А и сопротивлении 20В в трис-глициновом буфере для переноса. Для этого использовалась система для полусухого переноса Thermo Scientific Invitrogen Power Blotter (США) (прибор размещен на базе ЦКП "Медицинская геномика", ТНИМЦ). Предварительно НЦ-мембрана смачивалась в метаноле 20%. После переноса НЦ-мембрану промывали PBST буфером (фосфатный буфер, содержащий 0,05% Твина) 3 раза по 15 минут. Далее проводилась инкубация мембраны с 5% BSA в течении часа. После этого мембрана снова промывалась в PBST и инкубировалась с первичными антителами против человеческого IgG в разведении 1:2000 (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) при 4°C в течении двух часов. После дальнейшей промывки PBST НЦ-мембрану инкубировали с вторичными антителами конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:5000) в течение 60 минут. Окрашивание проводилось колориметрическим красителем Opti-4CN Substrate Kit. Визуализация производилась при помощи системы гель-документации iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, США) (прибор размещен на базе ЦКП "Медицинская геномика", ТНИМЦ).

Определение каталазной активности IgG

Изменение каталазной активности иммуноглобулинов класса G проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Varian

Cary 60 UV-Vis (Agilent, США) путем измерения снижения оптической плотности среды инкубации с течением времени, вызванное разложением перекиси водорода при добавлении исследуемого образца (Beers R.F., 1978). В среду инкубации, содержащую перекись водорода в 50мМ фосфатном буфере pH 7,0 добавляли 100 мкл АТ (0,1-0,5 мг/мл) и фиксировали изменение оптической плотности при длине волны поглощения 240 нм в течение 5 минут. Для расчета активности использовали значение коэффициента экстинкции перекиси водорода $\epsilon = 0,081 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$. Каталазная активность IgG выражалась в единицах активности (U), аналогично ферментативной активности ($U = \text{мкМ H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг IgG}$).

Определение супероксиддисмутазной активности IgG

Изучение уровня активности СОД в антителах проводилось по методу, который используется для определения активности фермента СОД [9]. Метод основан на регистрации изменения скорости реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в диформаза супероксидными радикалами, образующимися при окислении ксантина в мочевую кислоту ферментом ксантиноксидазой. Реакция образования супероксидного радикала катализировалась ксантиноксидазой (Sigma) в инкубационной смеси, содержащей 0,1 мМ раствор ксантина в 0,5 М NaOH, 50 мМ карбоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА; 37,5 мкМ НСТ в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,0. Регистрировали изменение оптической плотности раствора диформаза в течение 5 мин при длине волны 560 нм. При добавлении образца, содержащего СОД или белок с СОД активностью, скорость восстановления НСТ до диформаза снижается под действием белка с СОД активностью. Затем в ту же кювету добавляли 100 мкл образца антитела, в концентрации 0,1 - 0,4 мг/мл и в течение 5 мин регистрировали скорость реакции. СОД активность IgG в образцах оценивалась по снижению скорости восстановления НСТ до диформаза, с учетом разведения образца и коэффициента молярной экстинкции диформаза, пересчитанной на массу IgG. СОД активность IgG измерялась в единицах активности (U), аналогично ферментативной активности ($U = \text{мкМ Диформаза}/\text{мин}/\text{мг IgG}$). Для измерения активности использовался спектрофотометр Varian Cary 60 UV-Vis (Agilent, США).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Statistica 12.0. Проверку на соответствие нормальному закону распределения полученных данных оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Описание количественных показателей проводилось с указанием Me [Q1;Q3] (Me – медиана, Q1 – нижний квартиль и Q3 – верхний квартиль). Для определения значимости различий в исследуемых группах использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых выборок. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Окислительный стресс является одним из ведущих патогенетических звеньев в развитии онкопатологии. В последние несколько лет активно изучаются абзимы с оксидоредуктазными активностями, которые по одной из существующих гипотез, могут быть частью антиоксидантной системы и таким образом, участвовать в защите организма от окислительного стресса. В представленной работе впервые изучался уровень оксидоредуктазных активностей у больных KPP в зависимости от клинико-морфологических особенностей онкопатологии.

Для доказательства того, что изучаемые активности принадлежат непосредственно антителам, а не совыделяемым ферментам, была проведена проверка ряда общепринятых строгих критериев. Для отнесения изучаемой каталитической активности непосредственно к антителам был разработан и используется ряд жестких критериев [15]. В данном исследовании были использованы следующие критерии: выделение IgG методом аффинной хроматографии на аффинном сорбенте; оценка гомогенности полученных перепаратов антител при электрофорезе в градиентном ПААГ; проведение вестерн-блоттинга с первичными антителами к IgG человека.

Выделение антител из сыворотки крови с помощью аффинной хроматографии на колонке с Protein G-Sepharose

Препараты IgG выделяли из сыворотки крови здоровых доноров и больных KPP методом аффинной хроматографией на колонках с Protein G-Sepharose. Белок G - бактериальный протеин из группы стрептококков обладает высоким сродством к Fc-участкам иммуноглобулинов класса G всех подклассов, что позволяет проводить селективную элюцию компонентов иммунных комплексов (белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот) в условиях с повышенной ионной силой или в присутствии неионных детергентов, без разрушения при этом комплексов Ig с белком G, в то время как неспецифические нековалентные иммунокомплексы эффективно разрушаются.

Все полученные препараты поликлональных IgG, как больных колоректальным раком, так и здоровых доноров, имели схожие хроматографические профили и элюировались кислым буфером (Gly-HCl, pH 2,6) одним четким пиком (**рисунок 1, пик 3**). Фракции белков из центральной части данного пика собирали, объединяли и использовали для дальнейшего анализа.

Электрофоретическая гомогенность изучаемых IgG

Для проверки чистоты и гомогенности препаратов иммуноглобулинов класса G проводили электрофоретический анализ в градиентного ПААГ (4-20%) с помощью градиентного смесителя SG 15 Gradient Maker (GE) с последующей окраской Coomassie brilliant blue G250. На электрофореграмме полученных препаратов IgG видны маркеры молекулярного веса и дорожки, содержащие белковые бэнды, располагающиеся на уровне 150 кДа, что соответствует молекулярной массе IgG (**рисунок 2**). Белковых бендов с другим молекулярным весом на геле нет.

Вестерн-блоттинг изучаемых IgG с первичными антителами к IgG человека

Для доказательства принадлежности изучаемых активностей к собственно антителам была осуществлена проверка ещё одного критерия с помощью проведения метода вестерн-блоттинга с первичными антителами к IgG человека. После проведения электрофореза в ПААГ с исследуемыми IgG был осуществлен их перенос на нитроцеллюлозную мембрану (НЦ-мембрану) и произведена инкубация с первичными антителами, специфичными для человеческого IgG (Sigma-Aldrich, США). Для окрашивания использован колориметрический краситель из набора Opti-4CN Substrate Kit. Визуализация производилась при помощи системы гель-документации iBright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, США). В результате на мембране были визуализированы бенды на уровне 150 кДа, аналогичные видимым на после проведения электрофореза. Эти бенды показывают, что изучаемые IgG специфично связались с первичными антителами к IgG человека (**рисунк 3**).

Таким образом, с помощью ряда жестких критериев, было доказано, что изучаемые активности антител можно отнести непосредственно к данным иммуноглобулинам класса G. В данной работе впервые продемонстрировано наличие каталазной и СОД активности у IgG пациентов с KPP.

Скрининг каталазной активности IgG пациентов с KPP и здоровых лиц

Оценка уровня каталазной активности изучаемых абзимов с помощью спектрофотометрического метода, при котором регистрируется уменьшение оптической плотности раствора гидроперекиси при добавлении в среду препаратов IgG, выявила наличие каталазной активности как у пациентов с KPP, так и у здоровых лиц. Наличие каталазной активности IgG у пациентов с KPP было продемонстрировано впервые. Причем данная активность антител у пациентов с KPP оказалась в 3 раза выше по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,00066$) (**рисунк 4**).

Таким образом, выявлено, что IgG пациентов с KPP обладали большим уровнем каталазной активности и эффективнее разлагали гидроперекись, чем IgG здоровых доноров. По литературным данным активность каталазы эритроцитов у пациентов с KPP снижена по сравнению со здоровыми лицами [22]. Полученные результаты позволяют предположить, что каталазная активность IgG может компенсировать низкую активность ферментативной каталазы у пациентов с KPP.

Абзимы с оксидоредуктазными свойствами ранее были выявлены при других видах онкологии, а именно при раке молочной железы, раке желудка и раке щитовидной железы [3, 4, 7]. Однако в этих исследованиях не было изучено взаимосвязи данной активности антител с клинико-морфологическими параметрами.

При сравнении каталазной активности IgG у пациентов с KPP в зависимости от пола статистически значимых различий каталазной активности антител у женщин (1119,3 [843,7;1614,4] мкМ H_2O_2 /мин/мг IgG) и

мужчин (1105,7 [728,3;1471,8] мкМ H₂O₂ /мин/мг IgG) не было выявлено (p=0,56).

Далее было проведено сравнение каталазной активности IgG у пациентов с КРР в зависимости от стадии онкологического процесса в организме больных. Показано, что у больных КРР со второй стадией опухолевого процесса каталазная активность антител в 1,8 раза выше по сравнению с пациентами с третьей стадией КРР (p=0,015) (**рисунок 5**).

По данным литературы активность каталазы эритроцитов у онкологических больных также уменьшалась в зависимости от прогрессирования опухолевого процесса. Так онкологические больные со II стадией имели более высокий уровень каталазы эритроцитов, чем больные КРР с III стадией [10, 22]. У больных с КРР также с увеличением стадии опухолевого процесса наблюдается увеличение прооксидантных параметров в организме больных [16]. Таким образом, полученные результаты показывают, что каталазная активность каталитических антител в организме онкологических больных претерпевает изменения аналогичные энзиму каталазе. Этот факт можно рассматривать в качестве доказательства антиоксидантной роли абзимов в организме. Снижение антиоксидантных свойств организма доказано у больных в зависимости от прогрессирования заболевания [2, 10].

Кроме того, было проведено сравнение уровня каталазной активности IgG у больных КРР с высокодифференцированной (G1) и низкодифференцированной (G3) опухолью. Результаты анализа показывают, что каталазная активность IgG статистически значимо снижена, практически в 2 раза, у больных с низкодифференцированным КРР по сравнению с пациентами с высокодифференцированным КРР (p=0,045) (**рисунок 6**).

Таким образом, представленные результаты также подтверждают приведенное выше предположение, постулирующее, что с увеличением степени злокачественности происходит снижение каталазной активности IgG и, как следствие, снижается способность больных элиминировать гидропероксид водорода из кровеносного русла больных. Исходя из вышесказанного, возможно, каталазную активность IgG можно использовать как критерий прогноза развития опухолевого процесса в организме больных.

Скрининг супероксиддисмутазной активности IgG пациентов с КРР и здоровых лиц

По результатам исследования супероксиддисмутазная активность IgG была выявлена как у пациентов с КРР, так и у здоровых лиц. Наличие СОД активности IgG у пациентов с КРР было продемонстрировано впервые. Также у пациентов с КРР наблюдалось повышение СОД активности IgG в 1,7 раза по сравнению со здоровыми лицами (p=0,049) (**рисунок 7**).

Таким образом, было показано, что у пациентов с КРР СОД активность IgG была значимо выше, чем у здоровых лиц. Классический фермент супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1.) является одним из наиболее важных ферментов, участвующих в защите клеток супероксидного анион-радикала.

Данный фермент катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода и в молекулярный кислород в процессе циклической реакции восстановления и окисления металла в активном центре фермента. Иммуноглобулины класса G также активно снижают количество супероксида в среде, переводя его в более долгоживущий и не менее реакционноспособный гидропероксид водорода. Проводимые ранее исследования так же доказали металлозависимость данной реакции [18]. Следовательно, это доказывает сходство функций, изучаемых абзимов с СОД активностью, с классическим ферментом СОД. Известно, что при КРР активность внутриклеточной СОД значительно выше, чем у здоровых лиц, что обеспечивает активный перевод супероксидного радикала в гидропероксид водорода у этих больных [20]. Это позволяет предположить, что антитела с СОД активностью при КРР так же активно участвуют в этом процессе в периферическом кровеносном русле.

Также был проведен сравнительный анализ СОД активности IgG у пациентов с КРР мужского (112,8 [80,2;162,5] мкМ диформаза/мин/мг IgG) и женского пола (89,9 [76,4;136,4] мкМ диформаза/мин/мг IgG). В результате статистически значимых различий в этой активности IgG обнаружено не было ($p=0,26$).

При сравнении СОД активности IgG больных КРР со 2 и 3 стадиями значения активностей составили 100,78 [74;175] мкМ диформаза/мин/мг IgG и 112,8 [77,5;152] мкМ диформаза/мин/мг соответственно. Статистически значимых различий в СОД активности IgG от пациентов со 2 и 3 стадией не было выявлено ($p=0,96$). По данным литературы известно, что у больных КРР было зарегистрировано более высокое количество внутриклеточного фермента СОД на поздних стадиях, а именно III и IV стадии [20]. Соответственно, полученные нами результаты по аналогичной активности абзимов снова коррелируют с поведением канонического фермента.

При сравнении СОД активности IgG у пациентов с высокодифференцированным (G1) КРР и низкодифференцированным (G3) КРР выявлено, что у больных с высокодифференцированным КРР каталитическая активность абзимов в 1,7 раза ниже, чем у пациентов с низкодифференцированным КРР ($p=0,021$) (**рисунок 8**).

При исследовании оксидоредуктазных активностей антител в зависимости от степени дифференцировки было выявлено, что каталазная активность IgG больных с высокодифференцированным КРР в почти в 2 раза выше по сравнению с низкодифференцированным КРР, а СОД активность IgG наоборот, у больных с высокодифференцированным КРР в 1,7 раза ниже, чем у пациентов с низкодифференцированным КРР. В данном случае наблюдается разнонаправленное изменение оксидоредуктазных активностей в зависимости от степени дифференцировки опухоли, что говорит о сложных изменениях в организме больного при опухолевом росте. Высокая СОД активность в сочетании с низкой каталазной активностью приводит к резкому увеличению

количества неутилизированного гидропероксида водорода в крови больных с низкодифференцированными опухолями.

4 Заключение

В данной работе было впервые проведено исследование каталазной и супероксиддисмутазной активности IgG пациентов с КРР в зависимости от клинико-морфологических параметров заболевания.

С помощью ряда жестких критериев, было доказано, что изучаемые активности антител можно отнести непосредственно к собственным активностям иммуноглобулинов класса G больных с КРР и здоровых лиц. Впервые продемонстрировано наличие каталазной и СОД активности у IgG пациентов с КРР. Доказано, что уровень оксидоредуктазных активностей не зависит от пола больных. Выявлено, что обе активности абзимов достоверно увеличены у больных в сравнении со здоровыми лицами. Этот факт позволяет подтвердить, что абзимы с оксидоредуктазными свойствами скорее всего выполняют антиоксидантную роль, т.к. в организме больных происходит значимое увеличение АФК в ответ на генерализованный окислительный стресс.

Показано, что каталазная активность абзимов больных КРР зависит от стадии опухолевого процесса и от степени дифференцировки опухоли. Эта активность абзимов достоверно снижается при увеличении степени злокачественности и снижением степени дифференцировки и, как следствие, снижается способность больных элиминировать гидропероксид водорода из кровеносного русла. Исходя из вышесказанного, возможно, каталазную активность IgG больных КРР можно использовать как критерий прогноза развития опухолевого процесса. Супероксиддисмутазная активность абзимов при КРР не показала зависимости от стадии заболевания, но у больных с низкодифференцированными опухолями она оказалась достоверно выше, чем при высокой степени дифференцировки опухоли.

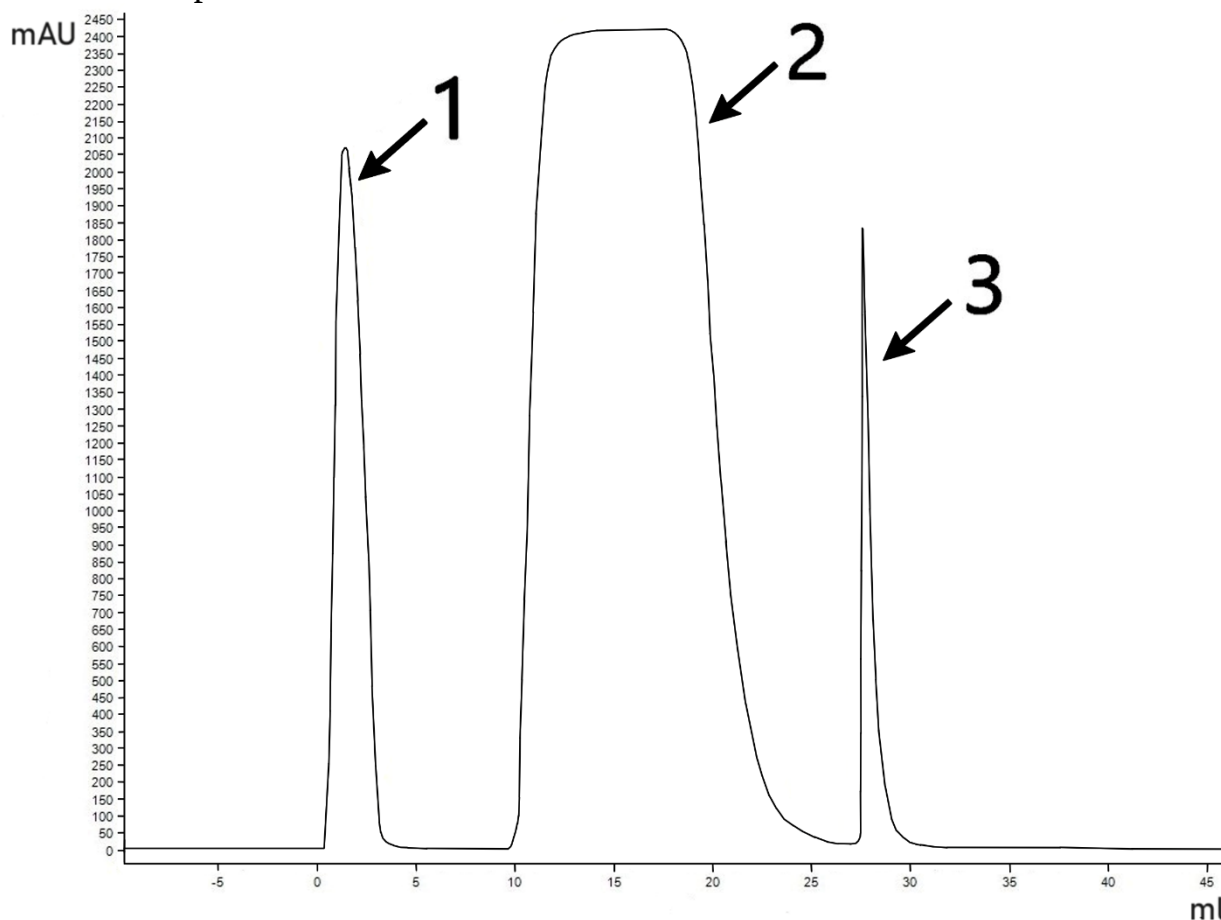
Таким образом, на основании нашего исследования можно предположить, что абзимы с каталазной и СОД активностью могут быть компонентом антиоксидантной системы организма в дополнение к классическим антиоксидантным ферментам. Известно, что антитела циркулируют по кровеносному руслу длительное время в отличие от антиоксидантных ферментов, которые находятся в основном в клетках крови и при попадании в кровоток быстро инактивируются протеазами. Исследование абзимов с оксидоредуктазными свойствами расширяет представление об изменениях в антиоксидантной и иммунной системе у больных с КРР. Эти данные могут быть полезными для разработки новых методов диагностики прогноза и лечения, основанных на использовании антител с каталитическими свойствами. Более глубокое понимание их функций и механизмов действия поможет нам раскрыть потенциал этих биологических молекул и применить их в медицине и научных исследованиях. Однако вклад антител с оксидоредуктазной активностью в патогенез КРР подлежит дальнейшему изучению.

395 *(Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР Томского НИМЦ по*
396 *Фундаментальным научным исследованиям FGW-2022-0019. Работа выполнена*
397 *с использованием оборудования ЦКП Томского НИМЦ “Медицинская*
398 *геномика”)*

РИСУНКИ

Рисунок 1. Профиль аффинной хроматографии препарата IgG на колонке с Protein G-Sepharose.

Figure 1. The affine chromatography profile of the IgG samples on the column with Protein G-Sepharose.

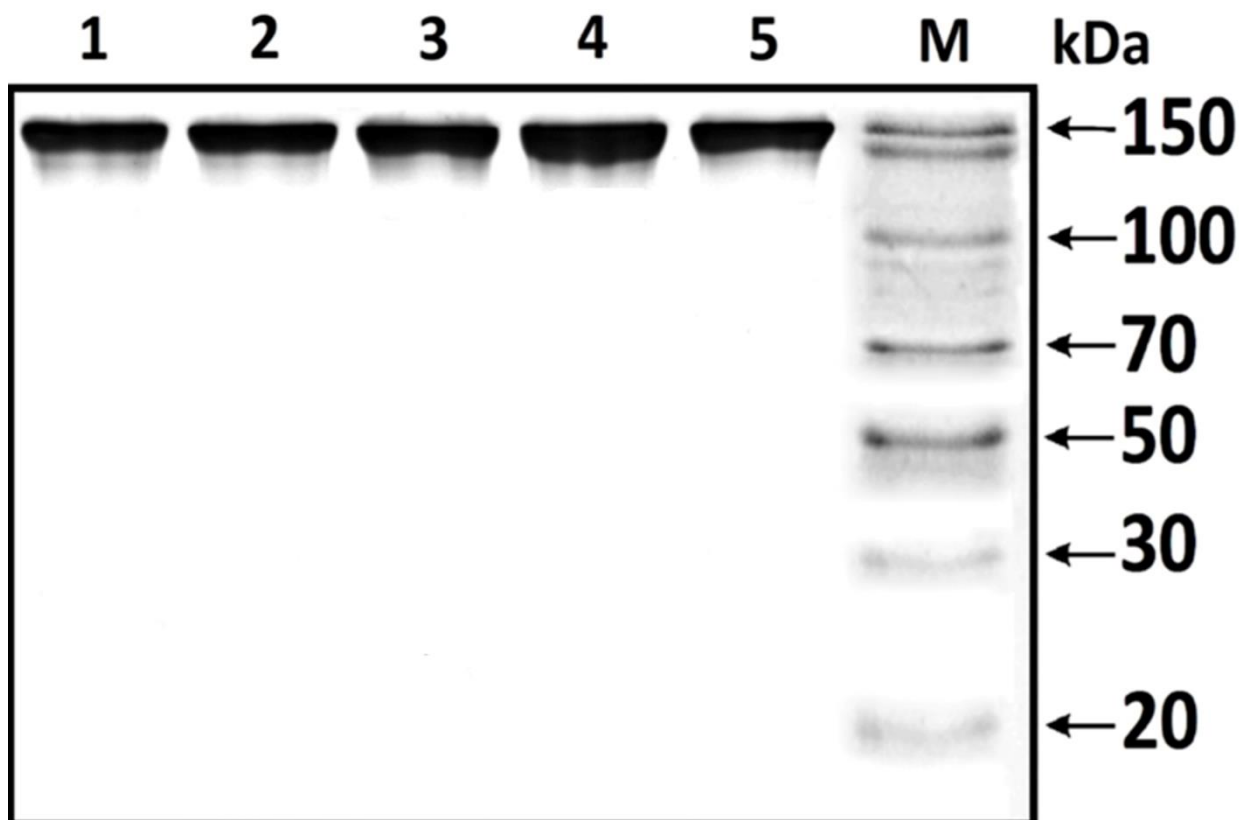


Примечание: Пик I – белки, не обладающие сродством к сорбенту; пик II – липиды и неспецифически связавшиеся белки, элюированные тритоном X-100; пик III – иммуноглобулины класса G; mAU - единица оптической плотности ($0,001 \cdot \text{AU}$); ml - объем жидкости, прошедшей через колонку хроматографа, мл.

Notes: Peak I –not relating proteins to sorbent, peak II – lipids and non-specifically bound proteins, eluated by Triton X-100, peak III – Immunoglobulin of class G); mAU - optical density unit ($0.001 \cdot \text{AU}$); ml - volume of liquid passed through the chromatograph column, ml.

Рисунок 2. Анализ гомогенности препаратов IgG методом SDS-электрофореза в градиентном ПААГ.

Figure 2. The analysis of IgG samples homogeneity with the method of SDS-electrophoresis in the gradient PAGE.

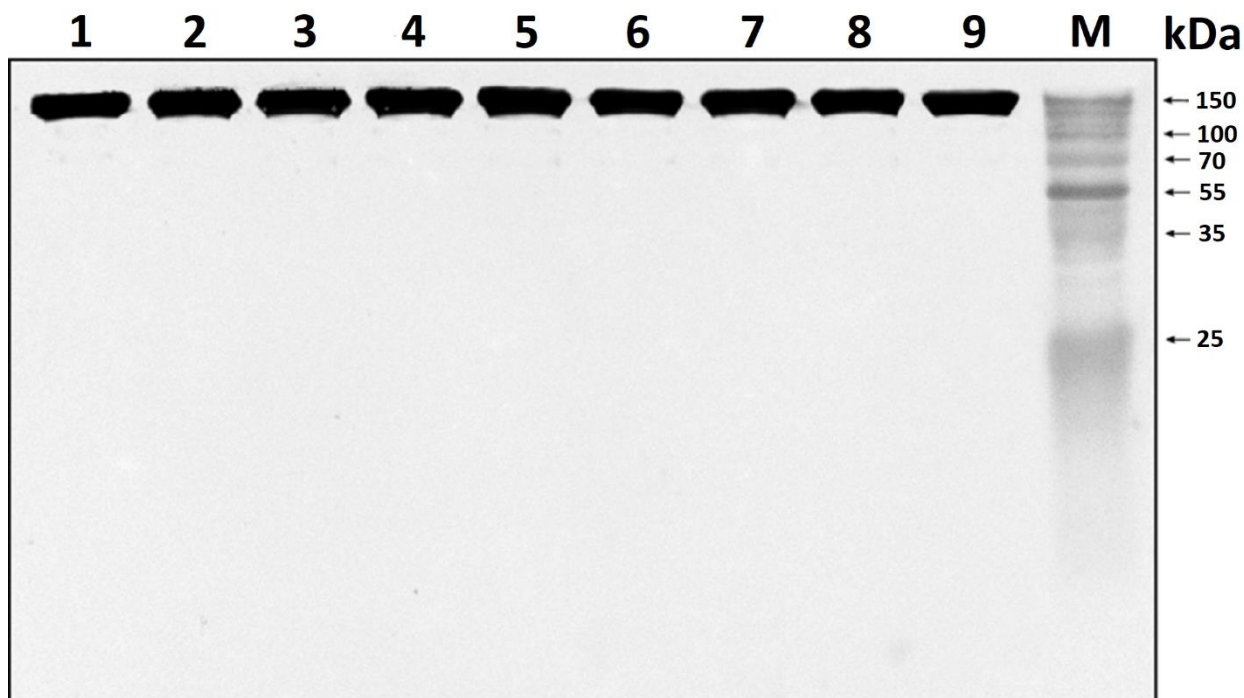


Примечание: М – маркеры молекулярной массы белков; 1-5 –препараты IgG больных КРР и здоровых лиц.

Notes: М – markers of proteins molecular weight; 1-5 - investigational IgG of colorectal cancer patients and healthy people.

Рисунок 3. Вестерн-блоттинг препаратов IgG с антителами к человеческому иммуноглобулину класса G.

Figure 3. Western-blotting of IgG samples with antibodies to human immunoglobulin of class G.

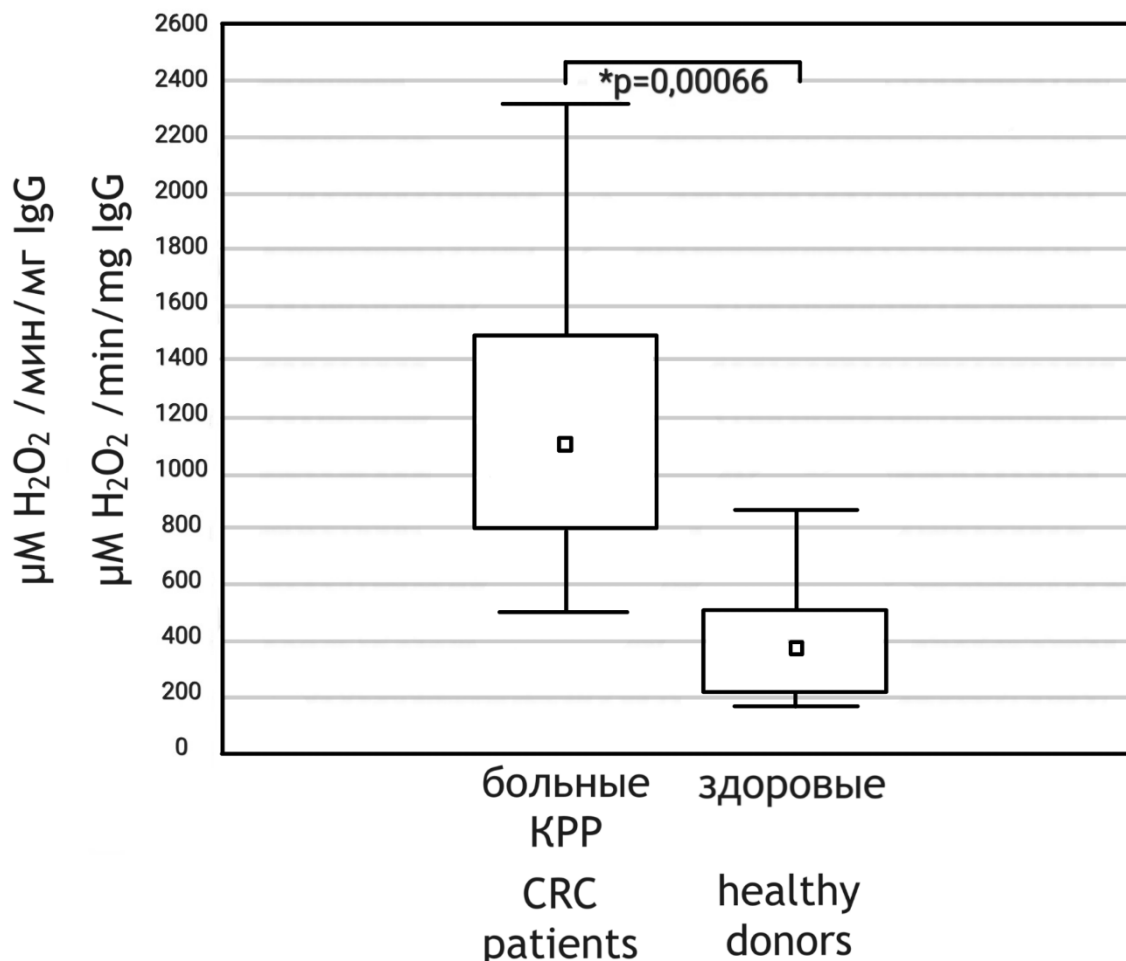


Примечание: М – маркеры молекулярной массы белков; 1-9 дорожки: иммуноокрашивание комплексов исследуемых препаратов IgG с антителами против IgG человека.

Notes: М – markers of proteins molecular weight; 1-9 - immunostaining of complexes of the investigated IgG preparations with antibodies anti-human IgG.

Рисунок 4. Уровень каталазной активности IgG больных колоректальным раком и здоровых лиц.

Figure 4. The level of the IgG catalase activity of colorectal cancer patients and healthy people.

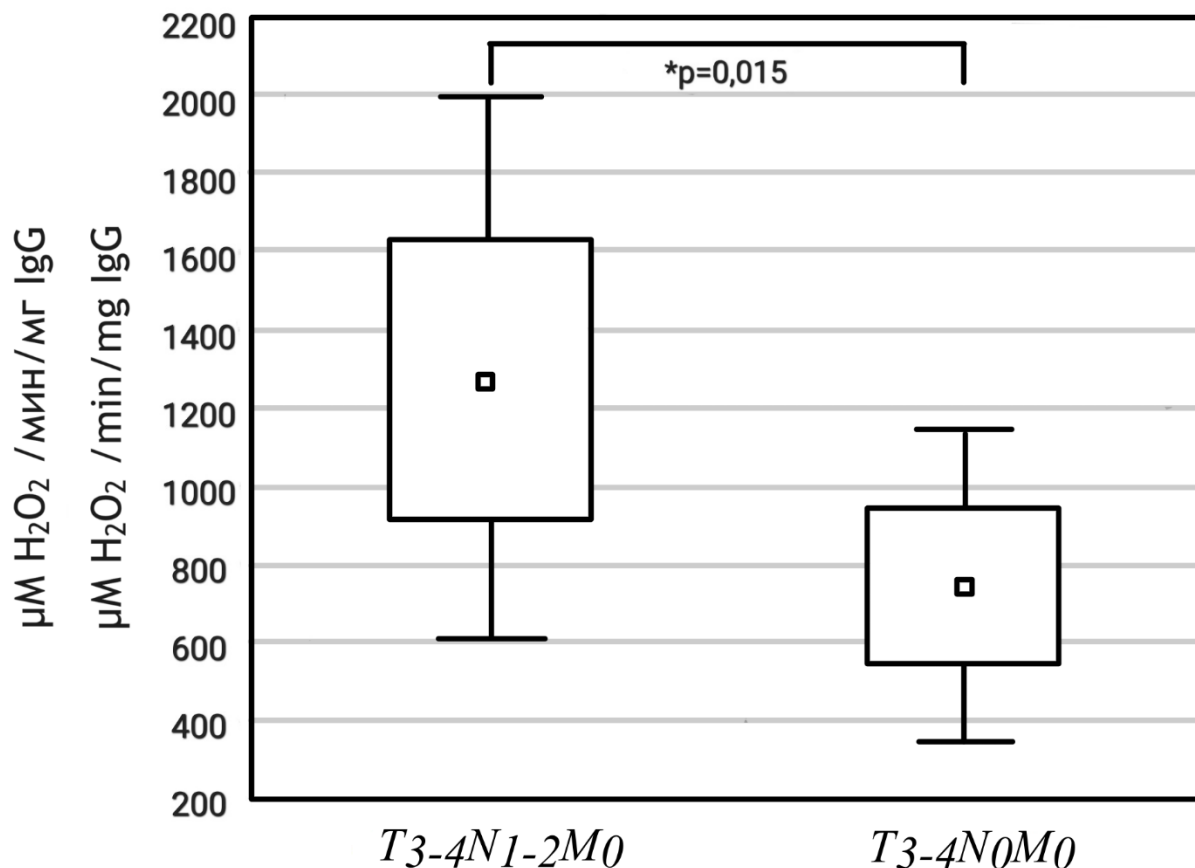


Примечание: *межгрупповые различия рассчитаны по критерию Манна-Уитни, статистически достоверными различия считались при уровне значимости $p < 0,05$.

Notes: *intergroup differences were calculated using the Mann-Whitney test, statistically reliable differences were considered at the significance level of $p < 0.05$.

Рисунок 5. Уровень каталазной активности IgG больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания.

Figure 5. The level of the IgG catalase activity of colorectal cancer patients depending on the disease state.

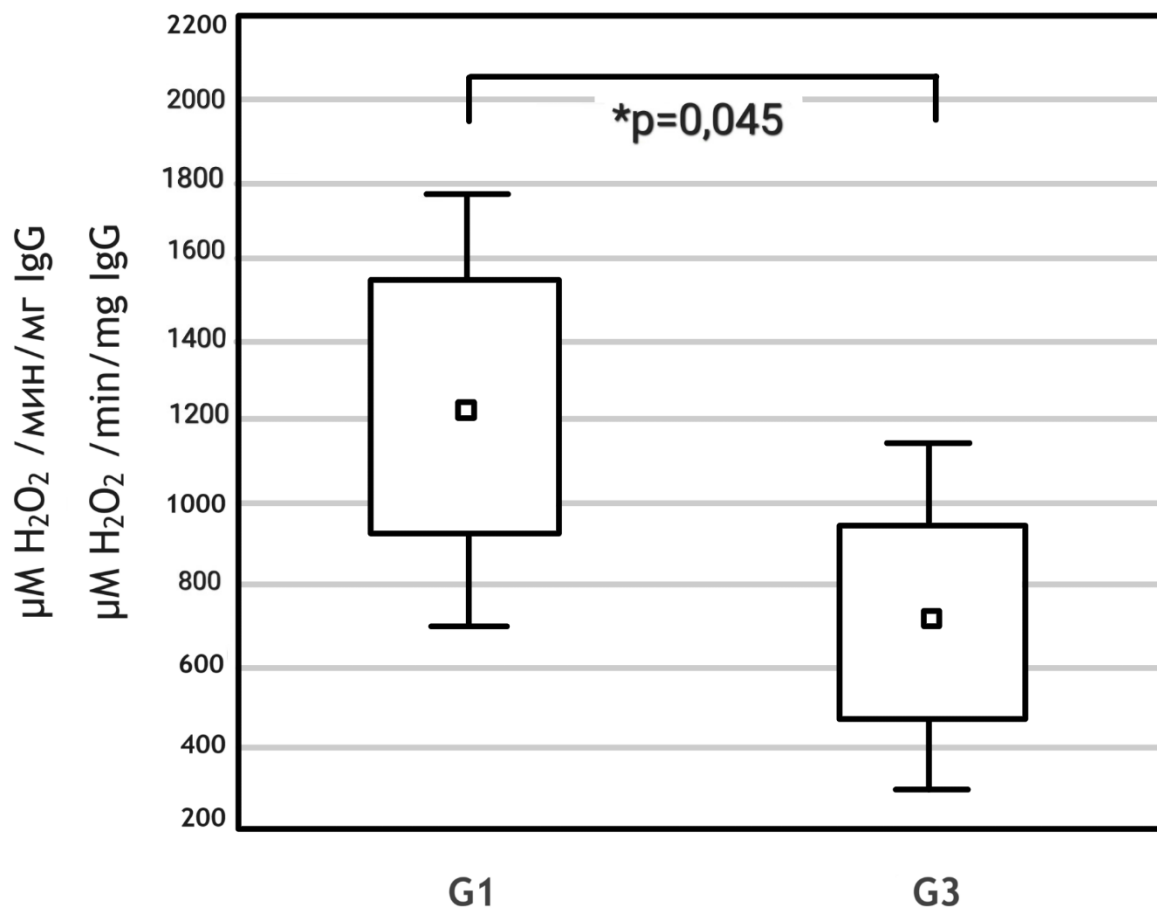


Примечание: *межгрупповые различия рассчитаны по критерию Манна-Уитни, статистически достоверными различия считались при уровне значимости $p < 0,05$.

Notes: *intergroup differences were calculated using the Mann-Whitney test, statistically reliable differences were considered at the significance level of $p < 0.05$.

Рисунок 6. Уровень каталазной активности IgG больных колоректальным раком в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Figure 6. The level of the IgG catalase activity of colorectal cancer patients depending on the differentiated extent of tumor.

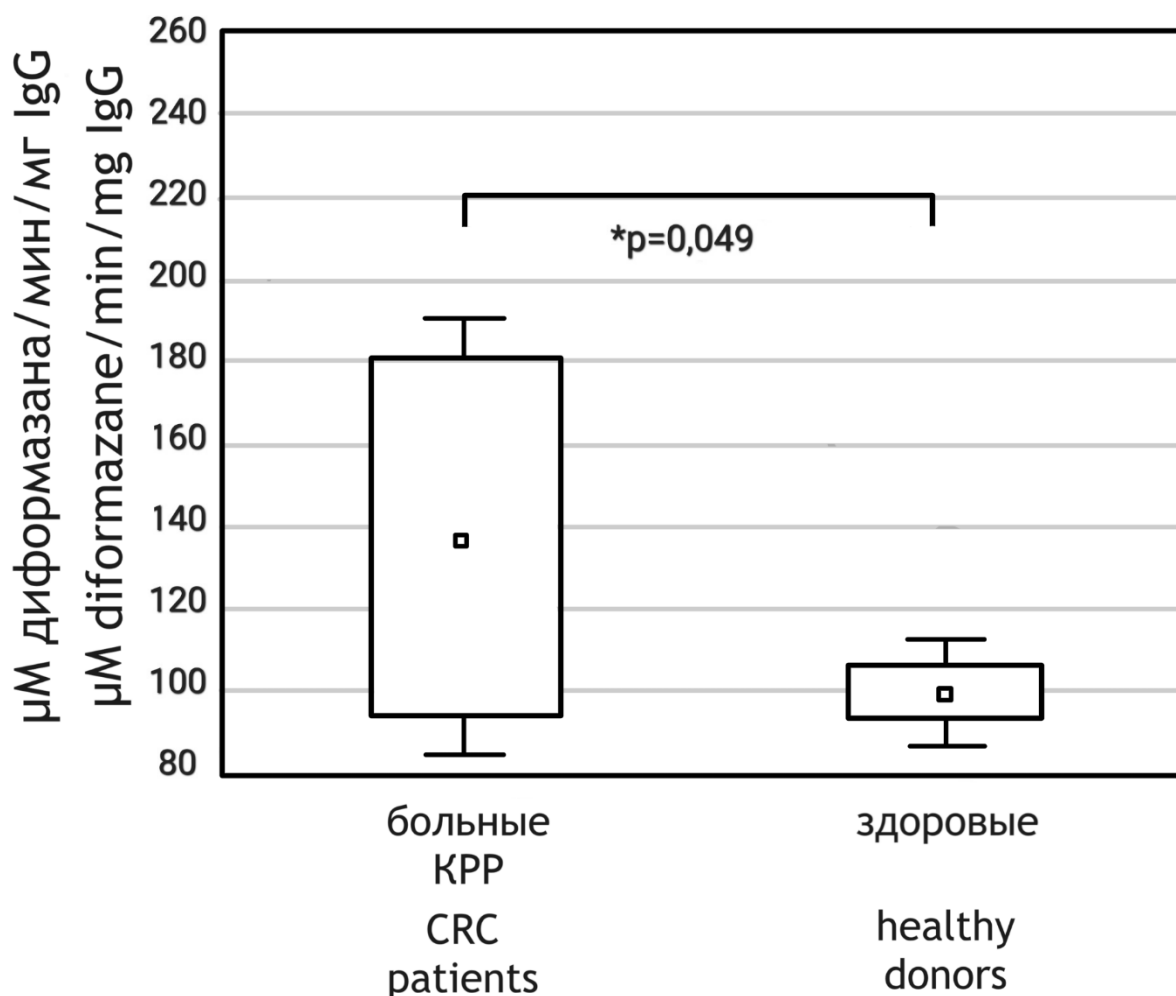


Примечание: *межгрупповые различия рассчитаны по критерию Манна-Уитни, статистически достоверными различия считались при уровне значимости $p < 0,05$.

Notes: *intergroup differences were calculated using the Mann-Whitney test, statistically reliable differences were considered at the significance level of $p < 0.05$.

Рисунок 7. Уровень супероксиддисмутазной активности IgG больных колоректальным раком и здоровых лиц.

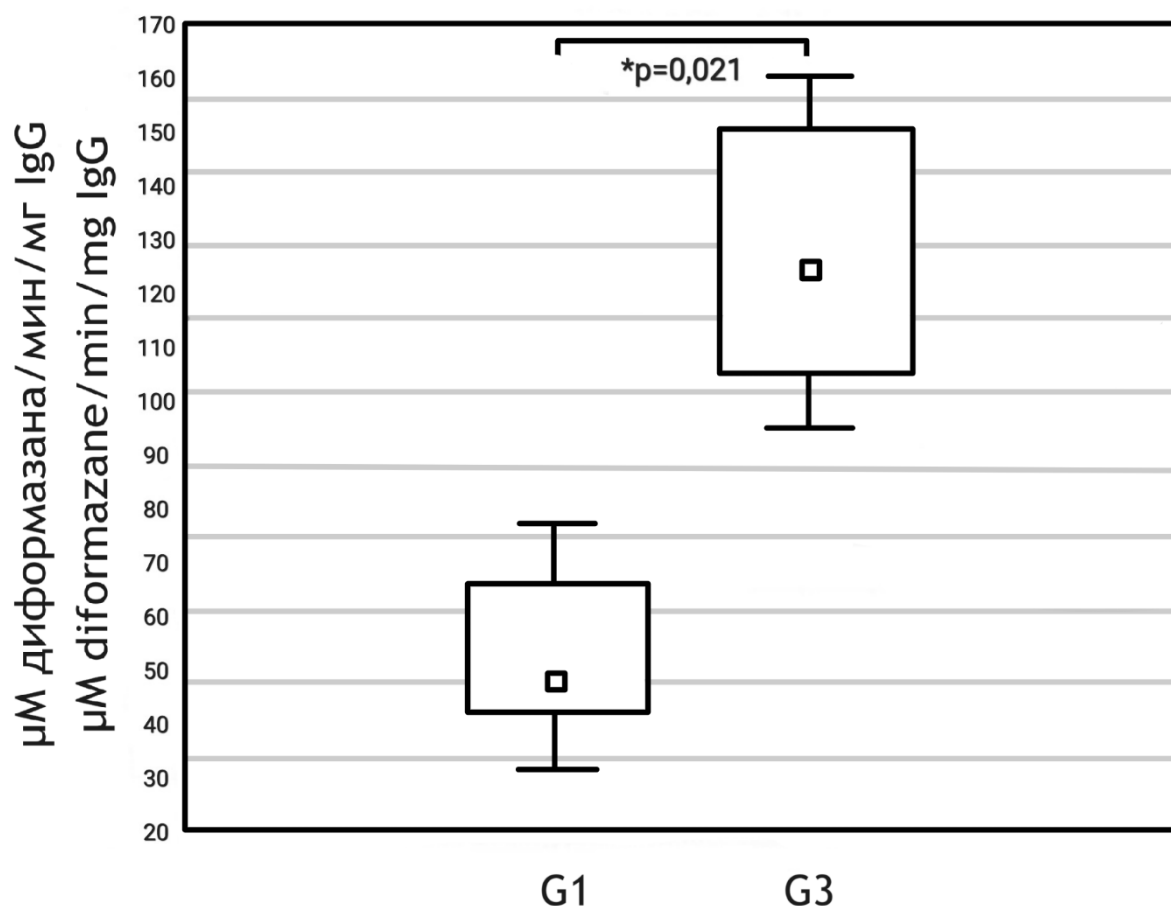
Figure 7. The level of the IgG superoxide dismutase activity of colorectal cancer patients and healthy people.



Примечание: *межгрупповые различия рассчитаны по критерию Манна-Уитни, статистически достоверными различия считались при уровне значимости $p<0,05$.

Notes: *intergroup differences were calculated using the Mann-Whitney test, statistically reliable differences were considered at the significance level of $p<0.05$.

Рисунок 8. Уровень супероксиддисмутазной активности IgG больных колоректальным раком в зависимости от степени дифференцировки опухоли.
Figure 8. The level of the IgG superoxide dismutase activity of CRC patients depending on the differentiated extent of tumor.



Примечание: *межгрупповые различия рассчитаны по критерию Манна-Уитни, статистически достоверными различия считались при уровне значимости $p<0,05$.

Notes: *intergroup differences were calculated using the Mann-Whitney test, statistically reliable differences were considered at the significance level of $p<0.05$.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Смирнова Людмила Павловна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ;

адрес: 634014 Томск, Россия, Алеутская 4, НИИ психического здоровья ТНИМЦ;

телефон: 8(383)372-38-29;

e-mail: lpsmirnova@yandex.ru

Liudmila Smirnova, MD, Ph D, Senior Researcher Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry, Mental Health Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

address: 634014 Tomsk, RF, Aleutskaja, 4, Mental Health Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

telephone: 8(383)372-38-29;

e-mail: lpsmirnova@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Воронина Валерия Сергеевна, студентка Сибирского Государственного Медицинского Университета

Voronina Valeria S., student of the Siberian State Medical University

Антипина Полина Александровна, студентка Сибирского Государственного Медицинского Университета

Antipina Polina A., student of the Siberian State Medical University

Казанцева Дарья Витальевна, очный аспирант НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ

Kazantseva Daria V., graduate student of the Mental Health Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Junior Researcher Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry, Mental Health Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Костромицкий Дмитрий Николаевич, к.м.н., старший научный сотрудник отделения абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ

Kostromitsky Dmitry N., MD, PhD, Senior Researcher Abdominal Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Юнусова Наталья Валерьевна, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей НИИ онкологии Томского НИМЦ, профессор кафедры биохимии и молекулярной диагностики с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

Yunusova Natalia V., MD, Chief Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

Блок 3. Метаданные статьи

КАТАЛАЗНАЯ И СОД АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ
CATALASE AND SOD ACTIVITY OF SERUM IMMUNOGLOBULIN G IN
COLORECTAL CANCER

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

КАТ И СОД АКТИВНОСТЬ IGG ПРИ КРР
CAT AND SOD ACTIVITY OF IGG IN CRC

Ключевые слова: колоректальный рак, абзимы, IgG, каталазная активность, СОД активность, сыворотка крови, окислительный стресс.

Keywords: Colorectal cancer, abzymes, IgG, catalase activity, SOD activity, serum, oxidative stress.

Оригинальная статья.

Количество страниц текста – 14,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 8.

16.07.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Безуглова, А. М., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Системная красная волчанка: моноклональные легкие цепи иммуноглобулинов против основного белка миелина, обладают протеолитической и ДНК-азной активностью // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5, №3-4. – С. 215-227.	Bezuglova, A.M., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Systemic lupus erythematosus: monoclonal light chains of immunoglobulins against the main protein myelin, have proteolytic and DNA-like activity. Russian Immunological Journal, 2011, Vol.5, no. 3-4, pp. 215-227.	EDN: SVLYHN
2	Борунов Е.В., Хавалкин И.В., Щепёткин И.А., Смирнова Л.П., Васильев Н.В., Ланкин В.З. Низкая активность антиоксидантных ферментов в опухолевых клетках является фактором кислородзависимости противоопухолевой цитотоксичности макрофагов. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1989. - №8. - С. 233-235.	Borunov E.V., Khavalkin I.V., Shchepetkin I.A., Smirnova L.P., Vasiliev N.V., Lankin V.Z. Low activity of antioxidant enzymes in tumor cells is a factor of oxygen dependence of antitumor cytotoxicity of macrophages. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1989, no. 8, pp. 233-235.	EDN: OWMPQZ
3	Генералов, И. И. Комплексная оценка абзимной активности поликлональных IgG при аутоиммунных, вирусных и	Generalov I.I. Complex analysis of different polyclonal abzyme IgG activities in auto-immune, viral and cancer diseases. Immunopathology,	EDN: RWIIMR

	онкологических заболеваниях // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – №3. – С.7-12.	allergology, infectology, 2000, no. 3, pp. 7-12.	
4	Генералов, И. И., Коротина О.Л., Жерулик С.В. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – №1. – С. 6-17.	Generalov I.I., Korotina O.L., Zherulik S.V. Methods of determination and types of catalytic activity of polyclonal immunoglobulins of class A. Immunopathology, allergology, infectology, 2015, no. 1, pp. 6-17.] Generalov I.I., Korotina O.L., Zherulik S.V. Methods of determination and types of catalytic activity of polyclonal immunoglobulins of class A. Immunopathology, allergology, infectology, 2015, no. 1, pp. 6-17.	DOI:10.14427/jipai.2024.1.86
5	Ермаков Е.А., Толмачева А.С., Смирнова Л.П., Иванова С.А., Бунева В.Н., Невинский Г.Н. Особенности окислительно-восстановительных, амилазной и АТР-азной активностей IgG антител из крови больных шизофренией // Российский иммунологический журнал - 2017.- Т. 11(20), № 4. С. 627-640.	Ermakov E.A., Tolmacheva A.S., Smirnova L.P., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Features of oxidoreductase, amylase and atpase activities of igg antibodies from blood of patients with schizophrenia. Russian Journal of Immunology, 2017, Vol. 20, no. 4, pp. 37-50.	URL: https://rusimmun.ru/jour/article/view/107
6	Ермаков Е.А., Смирнова Л.П., Кротенко Н.М., Семке А.В., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Каталазная	Ermakov E.A., Smirnova L.P., Krotenko N.M., Semke A.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalase activity	DOI: 10.31857/S102872210006588-1

	активность каталитических антител при шизофрении // Российский иммунологический журнал - 2019. – Т. 22, №2-3. - С.242-245.	of catalytic antibodies in schizophrenia. Russian Journal of Immunology, 2019. - Vol. 22, no. 2-3, pp. 242-245.	
7	Жерулик С. В., Луд Н. Г., Генералов С. И., Орлова Е. Г., Генералов И. И. Ферментативная активность сыворотки крови, абзимная активность IgG и IgA, свободная сывороточная ДНК и образование внеклеточных ловушек нейтрофилами у пациенток с новообразованиями молочной железы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2017. – №3. – С. 41.	Gerulik S. V. Crazy N. G., Generalov S. And. It's Orlova. G., General I.I. Enzymatic activity of blood serum, abzyme activity of IgG and IgA, free serum DNA and the formation of extracellular traps by neutrophils in patients with breast Neoplasms. Immunopathology, allergology, infectology, 2017, no. 3, pp. 41.	DOI: 10.14427/jipai.2017.3.41
8	Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В. Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сибирский онкологический журнал - 2005. - Т 13, №1. – С. 58-61.	Kondakova I.V., Kakurina G.V., Smirnova L.P., Borunov E.V. Regulation of proliferation and apoptosis of tumor cells by free radicals. Siberian Journal of Oncology, 2015, Vol. 13, no. 1, pp. 58-61.	URL: https://sciup.org/14054196
9	Смирнова Л. П., Кондакова И. В., Борунов Е. В. Способ определения активности супероксиддисмутазы // Патент РФ №2272074 Бюл. №8. От 20.03.2006.	Smirnova L. P., Kondakova I. V., Borunov E. V. A method for determining the activity of superoxide dismutase // RF Patent No. 2272074 Bull. no. 8. 20.03.2006.	

10	Смирнова Л.П., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глущенко С.А., Ялова М.Ф. Зависимость активности антиоксидантных ферментов от митотического индекса опухолей молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2002. - №2. – С. 47-51.	Smirnova L.P., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Glushchenko S.A., Yalova M.F. Dependence of antioxidant enzyme activity on the mitotic index of breast tumors. Siberian Oncological Journal, 2002, no. 2, pp. 47-51.	EDN: HSMQCJ
11		Brenner H., Kloor M., Pox C.P. Colorectal cancer. Lancet, 2014, Vol. 383, no. 9927, pp. 1490-1502.	DOI: 10.1016/S0140- 6736(13)61649-9
12		Cui M, Huang J, Zhang S, Liu Q, Liao Q, Qiu X. Immunoglobulin Expression in Cancer Cells and Its Critical Roles in Tumorigenesis. Front Immunol., 2021 Vol. 12: 613530.	DOI: 10.3389/fimmu.2021.61353 0
13		Economopoulos, T., Papageorgiou, S., Pappa, V., Papageorgiou, E., Valsami, S., Kalantzis, D., Xiros, N., Dervenoulas, J., Raptis, S. Monoclonal gammopathies in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. Leuk. Res., 2003, Vol. 27, no. 6, pp. 505-508.	DOI: 10.1016/s0145- 2126(02)00277-1
14		Mednova, I.A., Smirnova L.P., Vasilieva A.R., Kazantseva D.V.,	DOI: 10.3390/jpm1209

		Elena V. Epimakhova, Nina M. Krotenko, Arkadiy V. Semke, and Svetlana A. Ivanova. Immunoglobulins G of Patients with Schizophrenia Protects from Superoxide: Pilot Results. Journal of Personalized Medicine, 2022, Vol. 12, no. 9: 1449.	
15		Nevinsky G. A., Buneva B. N. Human catalytic RNA and DNA-hydrolyzing antibodies. J. Immunol. Methods, 2002, Vol. 269, no. 1-2, pp. 235-249.	DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00234-x
16		Perse M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: Cause or consequence? Biomed. Res. Int., 2019, Vol. 2013, no. 1: 725710.	DOI: 10.1155/2013/725710
17		Pisoschi A. M., Pop A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, Vol. 97, pp. 55-74.	DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
18		Smirnova L.P., Mednova I.A., Krotenko N.M., Alifirova V.M., Ivanova S.A. IgG-Dependent Dismutation of Superoxide in Patients with Different Types of Multiple Sclerosis and Healthy Subjects.	DOI: 10.1155/2020/8171020 .

		Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, Vol. 2020: 8171020.	
19		Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 2021, Vol. 71, no. 3, pp. 209-249.	DOI: 10.3322/caac.21660.
20		Warsinggih, Irawan B, Labeda I. Association of superoxide dismutase enzyme with staging and grade of differentiation colorectal cancer: A cross-sectional study. Annals of Medicine and Surgery, 2020, no. 58, pp. 194-199.	DOI: 10.1155/2013/725710

21		Zhang, Y., Wei, Z., Li, J., Gao, R., Liu, P. Monoclonal gammopathies regardless of subtypes are associated with poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma : A STROBE-compliant article. Medicine, 2018, Vol. 97, no. 30: e11719	DOI: 10.1097/MD.00000000000011719
22		Zinczuk J., Maciejczyk M., Zareba K., Romaniuk W., Markowski A., Kedra B. Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Biomolecules in Patients with Colorectal Cancer. Can Malondialdehyde and Catalase Be Markers of Colorectal Cancer Advancement? Biomolecules, 2019, Vol. 9, no. 10: 637.	DOI: 10.3390/biom9100637