

ОГЛЯДИ

УДК 577.155.2

КАТАЛІТИЧНО АКТИВНІ АНТИТІЛА (АБЗИМИ) МОЛОКА ЛЮДИНИ

Ю. Я. КИТ, Р. С. СТОЙКА

*Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: kit@biochem.lviv.ua*

В огляді узагальнено дані літератури і результати власних досліджень щодо властивостей каталітично активних антитіл (абзимів) молозива та молока людини. Розглянуто можливі механізми утворення абзимів та їхню потенційну роль у регуляції біологічної активності компонентів молока. Запропоновано гіпотезу, згідно з якою секреторні абзими є факторами неспецифічного гуморального захисту епітеліальних клітин від вірусних інфекцій.

Ключові слова: молоко людини, каталітично активні антитіла.

На основі аналізу результатів досліджень особливостей утворення комплексів антиген – антитіло та ензим – субстрат Л. Полінг у 1948 р. вперше дійшов висновку, що антитіла, подібно до ензимів, за певних умов можуть каталізувати хімічні реакції [1]. Ідея одержання антитіл із каталітичною активністю шляхом імунізації тварин іммобілізованими на носії гаптенами – стабільними аналогами перехідних станів хімічних реакцій – належить Б. Дженксу [2] і вперше була експериментально підтверджена в 1986 р. дослідниками двох груп під керівництвом Р. Лернера [3] та П. Шульца [4]. Одержані ними антитіла були здатні прискорювати в 1000 разів гідроліз складних ефірів і одержали назву “каталітично активні антитіла” або “абзими”. Шляхом цілеспрямованої імунізації тварин сукупно з технологією моноклональних антитіл було виділено абзими, здатні каталізувати понад 100 хімічних реакцій [5, 6]. Усе це дозволило сформувати нову біологічну дисципліну – абзимологію.

Стимул у розвиток абзимології було принесено в 1989 р., коли співробітники С. Пола із сироватки крові хворих на бронхіальну астму виділили антитіла, здатні гідролізувати пептиди [7]. Упродовж наступних років з'ясували, що при багатьох захворюваннях (автоімунних, вірусних, онкологічних) в організмі людей продукуються антитіла, які гідролізують пептиди, білки, ДНК, РНК та полісахариди [8–12]. Такі каталітично активні антитіла називаються “природними” або “натуральними” абзимами. Оскільки в організмі клінічно здорових людей абзими не виявлено, то вважалось, що їхня

продукція тісно пов'язана саме з патологічними процесами. Питання щодо наявності природних абзимів в організмі в нормі виникло після того, як було показано, що в молозиві і молоці клінічно здорових жінок присутні секреторні імуноглобуліни класу А (sIgA), здатні каталізувати фосфорилування казеїну [13]. Упродовж наступних років у молозиві та молоці людини виявили абзими, які гідролізують ДНК [14], РНК [15], нуклеотиди [16], білки [17] та полісахариди [18] і фосфорилують білки [19], ліпіди [20] та полісахариди [21]. Ці абзими виділено і охарактеризовано, а також ідентифіковано чинники, які впливають на їхню активність у молоці людини [22–24]. Одержані результати свідчать, що абзими є біологічно активними компонентами молока людини, які відіграють важливу роль у реалізації функціональної активності молока і гуморального мукозного імунітету в цілому.

Характеристика основних компонентів молока людини

Установлено, що грудне молоко є не тільки джерелом поживних речовин для дитини, але й зменшує імунну і гормональну недостатність новонародженого [25]. За складом жіноче молоко дещо подібне до крові. Його клітинна фракція, містить, переважно, макрофаги, поліморфно-ядерні нейтрофіли та лімфоцити. Їхня кількість у молоці істотно знижується порівняно з початком до кінця лактації, становлячи 10^5 клітин/мл молока. Лімфоцити молока на 80% є Т-клітинами і на 20% – В-клітинами. У відповідь на антигенну стимуляцію останні

здатні продукувати імуноглобуліни класів IgM та IgG. [26, 27]. Вважається, що лімфоїдні клітини молока забезпечують захист кишечника дитини від патогенної мікрофлори.

Подібно до білків плазми крові, білки материнського молока людини можна умовно розділити на мажорну та мінорну фракції. Мажорна фракція містить, переважно, sIgA, лактоферин, лактальбумін, казеїн, лізоцим та альбумін сироватки крові. У мінорній фракції імуноглобулінів класів IgM, IgG, IgD та IgE виявлено компоненти комплементу, інтерферони, фактори росту (ЕФР, ТФР і ФРН) та цитокіни [28, 29]. Подібно до інших компонентів, білки молока також зазнають значних кількісних та якісних змін у процесі лактації. Серед компонентів молока виявлено також моно- і олігосахариди, ліпіди та вільні жирні кислоти [30, 31]. Установлено, що в молоці людини є 3–5% ліпідів у вигляді глобул, покритих плазматичними мембранами клітин, які їх секретують [32]. При цьому 98% ліпідів припадає на триацилгліцероли, 0,5–1% – на фосфоліпіди, 0,2–0,5% – на стерини (переважно холестерол). Гліколіпіди та гангліозиди в середньому становлять 0,2% загальної кількості ліпідів [33]. У молоці людини виявлено значну кількість рибонуклеїнових кислот різної молекулярної маси [22, 34, 35], частину з яких було ідентифіковано як фрагменти рибосомної (5,8S, 18S та 28S РНК) і валінової та тирозинової тРНК людини [36]. Концентрація РНК в молоці коливається в межах 20–68 мкг/мл і зменшується у процесі лактації. В молоці було ідентифіковано ДНК, однак концентрацію її не визначено [37], а також у високій концентрації виявлено пуринові та піримідинові нуклеотиди (25–84 мкМ) і нуклеозиди (2–10 мкМ) [38].

Імуноглобуліни молока людини, їхнє походження та функція

У молоці, як і у крові людини, виявлено імуноглобуліни всіх відомих класів, хоча величина співвідношення між ними в цих тканинах значно відрізняється. Основну частину імуноглобулінів молока – понад 90% – становить секреторна форма імуноглобуліну А (sIgA) [39]. На відміну від мономерної форми IgA плазми крові, sIgA є надмолекулярним комплексом, в якому міститься 2 молекули IgA, J-ланцюг та секреторний компонент [40]. Відомо, що IgA людини представлено двома підкласами – IgA1 IgA2, а співвідношення між ними в молоці майже однакове. IgA різних підкласів дещо відмінні за первинною структурою в області “шарнірної ділянки”, що забезпечує біль-

шу стійкість IgA2 до дії протеолітичних ензимів порівняно з IgA1. J-ланцюг є особливим поліпептидом з молекулярною масою близько 15 кДа, який забезпечує полімеризацію імуноглобулінів класів IgA та IgM.

Секреторний компонент (СК) – мембранний глікопротеїн епітеліальних клітин – характеризується високою спорідненістю до полімерних імуноглобулінів. В секреторні рідини (молоко, слину, жовч, слиз) sIgA потрапляє шляхом трансцитозу крізь прошарок епітеліальних клітин [41, 42]. Цей механізм буде розглядатися під час аналізу потенційної біологічної активності sIgA-абзимів.

У зв'язку з тим, що sIgA притаманна висока антибактеріальна та антивірусна активність, вони є важливою складовою гуморального мукозного імунітету (ГМІ), що забезпечує захист слизових оболонок людини від негативного впливу навколишньої мікрофлори [43, 44]. Відомо, що sIgA продукуються за дії антигенів (АГ) на лімфоїдну тканину кишечника та бронхів.

Лімфоїдна тканина ГМІ може бути дифузним скупченням лімфоцитів, плазматичних клітин та макрофагів (у легенях і в lamina propria стінки кишечника) або організованою тканиною з вираженими фолікулами (мигдалини ротової порожнини, пейєрові бляшки тонкого кишечника, апендикс) [41–45]. Потрапляючи до кишечника або бронхів, АГ взаємодіють із лімфоїдною тканиною, де стимулюють антигенреактивні лімфоцити. Активовані лімфоцити разом із лімфою, проходячи крізь мезентеріальні лімфатичні вузли, потрапляють до грудної протоки, а згодом і до крові lamina propria, де перетворюються на плазматичні клітини, що продукують димерні форми IgA. Таким чином, антигенна специфічність sIgA молока визначається різноманітністю АГ бронхів і кишечника матері. Цими АГ можуть бути білки, фосфоліпіди і полісахариди мікрофлори, а також харчові АГ [46–48].

Відомо, що імунна система дитини віком до кількох місяців ще не сформована. Вона починає формуватися на 4–6-й місяць після народження. Слизові поверхні респіраторного та гастроентерального трактів дитини не містять власних АТ і тому sIgA материнського молока у значній мірі забезпечують пасивний імунітет новонароджених [49–51].

Концентрація АТ інших класів у молозиві і зрілому молоці жінки значно нижча концентрації sIgA [39]. Походження IgG та IgM молока остаточно не з'ясовано. Найімовірніше, що загальний вміст IgG молока формується

внаслідок транспортування АТ із кровотоку, а також внаслідок його секреції власними В-клітинами молочної залози [37, 52, 53]. Показано, що склад різних підкласів IgG істотно відрізняється у крові і молоці матері. Відсоток вмісту підкласів IgG2 та IgG4 в молоці значно вищий, ніж у крові. Оскільки IgG молока здатен проникати із кишечника дитини у кров, то вважається, що ці АТ, певною мірою, компенсують дефіцит гуморального імунітету новонароджених [54]. Недостатньо досліджені також джерела надходження IgM до молока людини. Оскільки IgM є полімерним імуноглобуліном, то найімовірніше, що він потрапляє до молока подібно до sIgA, а саме шляхом трансцитозу [39, 52].

Абзими молока людини

Абзими, яким притаманна протеїнкіназна активність. Здатність антитіл каталізувати фосфорилування білків уперше було виявлено під час вивчення протеїнкіназної активності молока у клінічно здорових жінок. [13].

Важливою проблемою дослідження натуральних абзимів є те, що в організмі людини також виявлено ензими з аналогічною каталітичною активністю, через що є вірогідність забруднення ними препаратів АТ. Для одержання АТ необхідної чистоти було розроблено відповідні схеми їхнього очищення [7, 55], які з певними модифікаціями використовують дотепер. Ці схеми включають використання низки послідовних афінних і іонообмінних хроматографій та гель-фільтрацій [5]. Типовим прикладом є нижченаведена схема очищення sIgA-абзимів із жіночого молока [56–58].

Виділення sIgA-абзимів ґрунтується на значно вищій спорідненості до протеїн А-сефарози каталітично активної фракції sIgA порівняно з каталітично неактивними АТ цього самого класу [13]. В очищених на протеїн А-сефарозі препаратах АТ молока міститься переважно sIgA з домішкою невеликої кількості IgG, які потім можна легко фракціонувати, застосувавши іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-сорбенті. На наступній стадії очищення електрофоретично гомогенні препарати sIgA хроматографують на сорбентах з іммобілізованими на них субстратами протеїнкіназної реакції – АТ-сефарозі та казеїн-сефарозі. Необхідно відзначити, що афінна хроматографія на сорбентах з іммобілізованими субстратами ензиматичних реакцій є ефективним методичним підходом, який дозволяє, по-перше, одержати препарати каталітичних АТ із високою питомою активністю, а по-друге, встановити

рівень спорідненості абзимів до субстратів реакції. Афінною хроматографією було одержано фракції sIgA з високою спорідненістю до казеїну та АТ і протеїнкіназною активністю [56, 58].

Локалізацію каталітичного центру на молекулі sIgA-абзимів визначали методом афінної модифікації з використанням радіоактивно мічених реакційноздатних аналогів АТ [56, 59]. Установлено, що в молекулі sIgA ковалентно модифікуються лише ланцюги молекули sIgA. Оскільки інших білків, які б ковалентно модифікувалися алкілувальними похідними АТ, у препаратах каталітично активних sIgA не виявлено, дійшли висновку, що протеїнкіназна активність властива саме молекулам sIgA, а не є наслідком забруднення препаратів АТ-протеїнкіназами. Високу спорідненість легкого ланцюга sIgA до АТ було підтверджено афінною хроматографією sIgA-абзимів на АТ-сефарозі під час дисоціації поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів [56, 58], що також свідчить про участь цього поліпептиду в акті фосфотрансферазної реакції.

У наступних роботах було з'ясовано, що IgA-абзими можуть фосфорилувати як казеїн, так і інші білки молока [57], а за певних умов вони здатні до автофосфорилування [20, 24]. Дещо неочікувані результати було одержано, якщо донором фосфату в реакції фосфорилування слугували інші нуклеотидтрифосфати. Встановлено, що всі пуринові та піримідинові нуклеотидтрифосфати є субстратами протеїнкіназної активності sIgA-абзимів [58]. Це свідчить про те, що їхні властивості відмінні від протеїнкіназ, які використовують як донор фосфату АТФ, і лише деякі з них GTP. Отже sIgA-абзими можна класифікувати як протеїнкінази, що характеризуються багатосубстратною специфічністю і властивостями, які істотно відмінні від інших протеїнкіназ. Окрім препаратів sIgA молока людини, казеїнкіназну активність також було виявлено в електрофоретично гомогенних препаратах мономерного IgA, очищених із плазми крові клінічно здорових людей [60].

Абзими, яким притаманна ліпідкіназна активність. Ліпідкіназну активність sIgA вперше було виявлено під час аналізу продуктів фосфорилування фракцій sIgA, одержаних хроматографією на АТ-сефарозі [20]. Мічені радіоактивним фосфором продукти екстрагували з реакційної суміші розчином хлороформ–метанол і розділяли на три фракції тонкошаровою хроматографією в системі, запропонованій для аналізу фосфоліпідів [20]. Установлено, що

ліпіди утворюють комплекс із sIgA-абзимами, який не руйнується у процесі очищення АТ афінною та іонообмінною хроматографією, а також гель-фільтрацією в ізотонічних буферних системах. Гель-фільтрація у присутності 5%-го діоксану зумовлює дисоціацію комплексів і втрату препаратами sIgA ліпідкіназної активності [20, 61]. Фосфорильовані ліпіди при цьому гідролізуються кислотами, що свідчить про складність їхньої будови [61]. За допомогою комбінованого методу ензиматичної та хімічної деградації (оброблення нейрамінідазою, лужний метанольний гідроліз, окислення періодатом) було встановлено, що фосфорильовані ліпіди, подібно до гангліозидів, містять сіалову кислоту, але, на відміну від них, не окислюються періодатом, що вказує на відсутність у них *цис*-діольних зв'язків [62]. Лужний метанольний гідроліз ефірних зв'язків фосфорильованих ліпідів призводить до утворення 4–5 хроматографічних фракцій на відміну від двох, які виявлено під час гідролізу гангліозидів. Дійшли висновку, що субстратами sIgA-абзимів молока є 2 мінорні гліколіпіди, у складі яких міститься один залишок сіалової кислоти та 4 або 5 залишків жирних кислот. На сьогодні не встановлено, які саме залишки гліколіпідів залучено до фосфорильовання. Аналіз субстратної специфічності ліпідкіназної активності виявив, що подібно до протеїнкіназної активності sIgA-абзими здатні використовувати як донор фосфату всі нуклеотидтрифосфати, а також неорганічний ортофосфат [61–63]. Нещодавно було встановлено, що субстратами sIgA-абзимів молока людини можуть бути також оліго- і полісахариди [64]. Подібно до ліпідкіназної активності як субстрати в цій реакції використовуються різні нуклеотиди і навіть неорганічний ортофосфат. Базуючись на цих результатах, можна припустити, що фосфорильовання гліколіпідів молока людини відбувається за вуглеводними залишками. На відміну від протеїнкіназної активності, яку було виявлено лише в sIgA, ліпідкіназна активність притаманна також IgG молока людини [63] і сироватки крові хворих на системний червоний вівчак [65].

Нуклеотидгідролізувальна активність АТ молока. Вперше нуклеотидгідролізувальну активність АТ було виявлено у sIgA [56], але найдетальніше її досліджено в IgG молока людини [66, 67]. Для вивчення каталітичної активності препаратів IgG, виділених із молока людини, використовували класичну схему, яка включала хроматографію білків молока на колонках із протеїн А-сефарозою та ДЕАЕ-целюлозою, ім-

мобілізованих на сефарозі моноспецифічними антитілами до IgG людини, та АТР-сефарозою. Встановлено, що електрофоретично гомогенні IgG молока людини, а також їхні Fab-фрагменти гідролізують рибонуклеотид – дезоксирибонуклеотид-5'-моно-, ди- та трифосфати. Для виявлення каталітично активних ділянок на молекулі IgG авторами, як і під час дослідження sIgA-абзимів, було використано метод афінної модифікації молекул IgG алкілувальними аналогами радіоактивно міченого АТР. Установлено, що АТР-зв'язувальна ділянка локалізується на легкому (L) ланцюзі молекули IgG. Для аналізу каталітичної активності абзимів було розроблено оригінальний метод визначення нуклеотидгідролізувальної активності білків у поліакриламідному гелі після їхнього електрофоретичного розділення за умов денатурації [66]. З використанням цього методу було встановлено, що нуклеотидгідролізувальна активність притаманна або цілісним молекулам IgG-абзимів, або їхнім олігомерним формам. Редукція імуноглобулінів, яка супроводжується дисоціацією на важкі та легкі ланцюги, призводить до втрати каталітичної активності. На основі одержаних результатів дійшли висновку, що хоча АТР-з'язувальні ділянки розміщені на L-ланцюзі молекули IgG, H-ланцюги також необхідні для каталізу реакції гідролізу. Аналіз термодинамічних та кінетичних параметрів її за участю різних нуклеотидів показав, що найнижче значення K_m становить 44 мкМ під час гідролізу АТР, а найвище ($K_m = 79$ мкМ) – гідролізу dСТР. V_{max} для різних нуклеотидів варіює від 0,57 мкМ/хв для dАТР до 1,1 – для СТР.

ДНК-гідролізувальна активність АТ молока. Антитіла, які гідролізують ДНК, належать до найдетальніше вивчених на сьогодні абзимів. Імуноглобуліни класу G, що мають топоізомеразну активність (каталізують одониткові розриви надспіралізованої форми плазмідної ДНК), уперше було виділено із плазми крові хворих на системний червоний вівчак у 1992 р. в Інституті молекулярної біології РАН (Москва) групою вчених під керівництвом проф. О. Габібова [68]. Інтенсивні дослідження в наступні роки показали, що абзими з аналогічною активністю містяться в сировотці хворих на різні аутоімунні захворювання (склеродермію, ревматоїдний артрит, тироїдит, розсіяний склероз), а також у хворих на СНІД, променеву хворобу та лімфопроліферативні типи онкологічних захворювань [10–12]. Дотепер абзими з ДНК-гідролізувальною активністю не виявлено в сироватці крові хворих на

грип, пневмонію, туберкульоз, тонзиліт, деякі онкологічні захворювання, а також у клінічно здорових людей [10–12].

Абзими, виділені вперше з молока людини, здатні гідролізувати плазмідну ДНК та синтетичні олігонуклеотиди, належать до класу IgG [69, 70]. Для їхнього очищення було застосовано схему послідовного хроматографічного розділення на колонках із протеїн А-сефарозою, ДЕАЕ-сорбентами, ДНК-целюлозою, та наступною гель-фільтрацією АТ за дисоціації імунних комплексів (рН-шоку) [55, 68]. Для локалізації каталітичних центрів на молекулі АТ застосовували методи обмеженого протеолізу та афінної модифікації молекул АТ реакційноздатними похідними радіоактивно мічених олігонуклеотидів. Установлено, що ДНК-азна активність властива як цілісній молекулі IgG, так і її F(ab')₂- та Fab-фрагментам. Для дослідження особливостей гідролізу ДНК абзимами автори вперше використали метод ензимогам. Він базується на здатності нуклеаз частково відновлювати каталітичну активність після їхнього електрофоретичного розділення за умов денатурації в поліакриламідному гелі, який містить заполімеризовану високомолекулярну ДНК. Місця гідролізу ДНК виявляють після забарвлення гелю специфічними до нуклеїнової кислоти барвниками. За допомогою цього метода було встановлено, що ДНК-гідролізною активністю характеризуються не лише цілісні молекули IgG молока людини і продукти їхнього обмеженого протеолізу, але й ізольовані легкі ланцюги цих АТ [69].

У наступних дослідженнях було встановлено, що ДНК-гідролізувальна активність властива також sIgA молока людини [71, 72]. Поєднання вищенаведених методів дозволяє встановити, що, на відміну від IgG, у гідролізі ДНК молекулою sIgA задіяні як легкі (L), так і важкі (H) ланцюги. При цьому H-ланцюги є відповідальними за зв'язування субстрату, хоча каталітичний центр молекули sIgA розміщується виключно на L-ланцюгах цих імунoglobулінів [71]. Крім плазмідної ДНК та синтетичних олігонуклеотидів, абзими молока здатні гідролізувати ядерну ДНК клітин ссавців [72], а також тРНК та синтетичні рибоолігонуклеотиди [10, 11, 70, 73]. Нещодавно нами було з'ясовано, що електрофоретично гомогенні препарати sIgA, виділені з молока людини хроматографічним методом на ДНК-целюлозі, ефективно гідролізують 28S- і 18S-субодиниці рибосомної РНК-ссавців (результати не опубліковано). Аналіз ДНК- та РНК-гідролізувальної активності абзимів молока людини вказує

на їхнє моноклональне походження [10, 11, 74]. Слід зазначити, що АТ, які гідролізують синтетичні олігонуклеотиди, ДНК та РНК, виділено також із колоструму корів [75].

Полісахаридгідролізувальна активність АТ молока. Здатність імунoglobулінів гідролізувати полісахариди вперше описано групою дослідників під керівництвом К. Н. Неустроєва [76]. Установлено, що IgG і IgM плазми крові хворих на ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, піелонефрит та деякі онкологічні захворювання, гідролізують мальтозовмісні олігосахариди, зокрема глікоген та подібні їм сполуки [77–79]. Для дослідження глікозидазної активності як субстрат автори використовували різні *n*-нітрофенілмальтоолігосахариди, а продукти реакції аналізували методом тонкошарової хроматографії та зворотнотазної рідинної хроматографії високого розділення. Абзими класів IgG та sIgA з аналогічною активністю було також виділено з молока клінічно здорових жінок [77]. Установлено, що амілолітична активність властива Fab-фрагментам антитіл, однак не з'ясовано, які саме ланцюги залучено до каталізу. Особливістю абзимів молока є їхня висока полісахаридгідролізувальна активність (у 5–50 разів вища порівняно з подібними абзимами сироватки крові хворих на автоімунні захворювання), що свідчить про їхню важливу роль у метаболізмі олігосахаридів молока людини.

Протеїназна активність АТ молока. Хоча абзими із протеїназною активністю належать до найдетальніше вивчених природних абзимів, наявність їх у молоці людини виявили лише нещодавно [80]. Було показано, що електрофоретично гомогенні препарати sIgA молока людини гідролізують казеїни жіночого та коров'ячого молока. Поєднавши хроматографічні і електрофоретичні методи, автори довели, що казеїнгідролізувальна активність властива саме молекулам sIgA і не є наслідком забруднення препаратів протеїназами. Аналіз протеїназної активності sIgA-абзимів виявив їхню високу чутливість до дії інгібіторів серинових протеїназ, але не до дії інгібіторів цистеїнових та аспарагінових протеїназ.

Шляхи індукції абзимів

Відомо два експериментально підтверджені механізми індукції абзимів.

Перший механізм ґрунтується на ідеї використання абзимами для прискорення реакції каталізу енергії зв'язування антигену [1, 2]. Установлено, що АТ, подібно до ензимів, є конформормно-активними, і їхня взаємодія з

АГ може супроводжуватися конформаційними перебудовами, які змінюються залежно від незначних зміщень поліпептидних ланцюгів у варіабельній ділянці Fab-фрагмента до глобальних перебудов у третинній та четвертинній структурі всієї молекули імуноглобуліну [8]. При цьому структурна комплементарність АТ – АГ досягається внаслідок конформаційних змін як АТ, так і АГ. Отже, в разі взаємодії АТ з АГ можлива структурна деформація останнього, як і в разі деформації субстрату в ензим-субстратному комплексі [81], тобто конформаційні перебудови АТ можуть зумовити конформаційні перебудови субстрату і наступне його перетворення на продукти реакції.

Згідно з цією гіпотезою, гіпотезою індукованої відповідності, характерною відмінністю каталітично активних АТ від АТ, нездатних до каталізу, є вища конформаційна лабільність перших, що свідчить про їхню поліреактивність [82]. Поліреактивністю АТ називають здатність останніх афінно зв'язуватися більше ніж з одним АГ [83, 84]. Такі АГ істотно відрізняються за будовою, а їхня спорідненість до поліреактивних АТ (поліАТ) визначається певним просторовим розміщенням нуклеофільних та електрофільних груп молекули АГ. Серед полі-АТ найдетальніше вивчено АТ, що здатні перехресно взаємодіяти з ДНК, фосфоліпідами та нуклеотидами [85–87]. Спільною ознакою цих сполук є наявність у структурі молекул фосфодієфірних зв'язків. Імовірно, що просторова будова таких АГ може визначати рівень їхньої спорідненості до полі-АТ. Якщо фосфодієфірні зв'язки деяких із цих сполук належать до макроергічних, то можна уявити, що під час взаємодії полі-АТ з такими АГ утворюються проміжні макроергічні інтермедіати, здатні в подальшому фосфорилювати (переносити фосфатні групи) АГ із нижчою до них спорідненістю. Ця модель дозволяє пояснити, як саме АТ класів IgG та sIgA, виділені з молока людини [13, 56–58] та сироватки крові хворих на СЧВ [65], можуть каталізувати дво-субстратні реакції – протеїнкіназу та ліпідкіназу. Полі-АТ класу sIgA було виявлено в жіночому молоці [88, 89]. Утворюючи проміжні макроергічні інтермедіати з нуклеотидами (АТР, GTP та іншими нуклеотидтрифосфатами), які детектуються як продукти автофосфорилування [20, 61], полі-sIgA, ймовірно, переносить фосфат на акцепторні групи інших АГ (білки, гліколіпіди). Подібний механізм “пінг-понг”-каталізу було виявлено нами в дослідках з вивчення протеїнкіназної активності рекомбінантного аналога позаклітинного фрагмента рецептора CD4 [90].

Інший механізм індукції абзимів ґрунтується на концепції “функціональної мімікрії” антигену, яка на сьогодні є найбільш визнаною. Вона була сформульована А. Габібовим та А. Friboulet на основі досліджень ДНК-гідролізувальної та ацетилхолінестеразної активності абзимів [91–93]. На рис. 1 наведено модель цього механізму. За своєю суттю концепція індукції абзимів шляхом функціональної мімікрії антигену є частковим випадком теорії формування антиідіотипових мереж Н. Ерне [94]. Вона базується на тому, що гіперваріабельна ділянка молекули АТ (паратоп), яка відповідає за зв'язування з комплементарною ділянкою АГ (епітопом), сприймається імунною системою власного організму як чужорідна (є ідіотипом) і на неї виробляються відповідні антиідіотипові АТ(ai-АТ), які також є антигенними і продукують ai-АТ до свого ідіотипу (ai-АТ другого порядку). Останні, у свою чергу, є джерелом утворення ai-АТ наступного порядку. Взаємодії типу АГ–АТ (ai-АТ)_n утворюють систему (антиідіотипову мережу Н. Ерне), що, як відомо, регулює гуморальний імунітет у ссавців. За такого принципу формування імунної відповіді, очевидно, первинні АТ є до певної міри “відбитком інформації” (структурною реплікою) будови антигенної детермінанти, тоді як ai-АТ першого порядку (а також 3-го, 5-го тощо) можуть відображати її структуру (копіюють “внутрішній образ” антигенної детермінанти). Якщо антигенною детермінантою виявляється каталітичний центр молекули ензиму, то легко уявити, що антигензв'язувальна ділянка ai-АТ другого порядку може функціонувати подібно до каталітичного центру ензиму. Це означає, що абзими можуть бути антиідіотиповими антитілами, де АГ є ензимом. З огляду на наявність у молоці клінічно здорових жінок антиідіотипових АТ-класів sIgA, sIgM та IgG [50, 95, 96], можна припустити, що хоча б частина абзимів молока генерується за допомогою описаного вище механізму.

Походження і можлива біологічна роль абзимів молока людини

Як впливає з наведених вище даних, питання щодо походження абзимів молока та їхньої біологічної ролі в організмі людини все ще залишається недостатньо вивченим. Присутність у крові жінок під час вагітності та лактації ДНК- РНК- та нуклеотидгідролізувальних IgG [67, 73] дозволяє припустити, що IgG-абзими потрапляють у молоко із плазми крові. Вважають, що наявність цих абзимів у

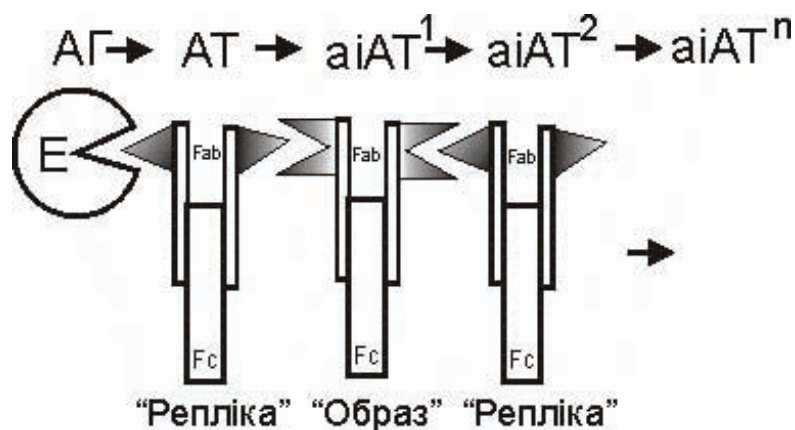


Рис. 1. Схема механізму індукції абзимів шляхом молекулярної мімікрії антигену (АГ): Е – ензим, АТ – антитіла до амінокислотних залишків каталітичного центру ензиму; $ai-AT^1$, $ai-AT^2$ та $ai-AT^n$ – антиідіотипові антитіла першого, другого та наступних порядків.

молоці зумовлюється, імовірно, двома причинами – “зовнішньою імунізацією” та “прихованою аутоімунізацією” [8, 37, 67, 73]. Перший процес, скоріше за все, пов’язаний з особливістю формування імунної відповіді організму вагітних жінок на вірусні та бактеріальні антигени. Хоча нині немає безпосередніх доказів індукції каталітичних АТ чужорідними АГ, проте значно вищий рівень, порівняно з нормою, ДНК- та РНК-гідролізувальних абзимів у молоці жінок, які хворіли під час вагітності вірусними та алергічними захворюваннями, свідчить про перевагу цієї гіпотези [15, 37, 70]. Інший підхід, який пояснює появу абзимів у молоці клінічно здорових жінок, базується на фізіологічних особливостях зміни імунного статусу організму під час вагітності. Відомо, що у крові вагітних жінок значно підвищується концентрація позаклітинної ДНК, що може бути пов’язано з апоптозом клітин під час диференціації тканин ембріона [97–99]. Висловлено припущення, що підвищення вмісту позаклітинної ДНК у крові в разі змін гормонального статусу в організмі жінок, спричинених вагітністю, може призводити до порушення толерантності та індукції утворення ДНК-гідролізувальних абзимів [8, 10, 14, 37].

Наявність каталітично активних секреторних імуноглобулінів класу А в молоці жінок, найвірогідніше пояснюється тим, що їхня індукція тісно пов’язана з особливостями функціонування ГМІ у ссавців. Як зазначено вище, sIgA продукуються у відповідь на дію чужорідних та харчових антигенів на лімфоїдну тканину кишечника та бронхів [41, 42, 45, 47]. На наш погляд, є два можливі механізми індукції секреторних абзимів у ссавців. Згідно з пер-

шим механізмом, абзими індуються шляхом безпосередньої імунізації організму антигенами, які водночас є субстратами каталітичних реакцій. Вважається, що вони або продукти їхнього катаболізму за певних умов можуть утворювати конформаційні варіанти (конформомери), які здатні, подібно до стабільних аналогів перехідних станів каталітичних реакцій, зумовлювати утворення натуральних абзимів в організмі [8, 100]. Вірогідно, що до таких АГ належать нуклеїнові кислоти бактерій і деякі харчові білки, наприклад казеїни коров’ячого молока [69, 71, 80].

Другий можливий механізм індукції абзимів ґрунтується на вищезазначеній нами концепції поліреактивної природи деяких каталітично активних антитіл. Установлено, що полі-АТ продукуються, ймовірно, внаслідок стимуляції CD5-позитивних клітин лімфоїдної тканини [101, 102]. До відомих чинників, здатних індукувати продукцію цих АТ, належать АГ із вираженою імуномодулювальною активністю. До таких факторів належить бактерійна ДНК (через наявність в її структурі CpG-мотивів), структурні компоненти стінки бактерій (ліпополісахариди та протеоглікани), білки теплового шоку і суперантигени [47, 103, 104].

Дотепер немає єдиної думки щодо біологічної ролі абзимів молока людини. Вважається, що ДНК- та РНК-гідролізувальні абзими є факторами гуморального антивірусного імунітету [8, 10, 11]. З іншого боку відомо, що абзими з подібною активністю, виділені із крові хворих на системний червоний вівчак та розсіяний склероз, здатні індукувати апоптоз клітин *in vitro* [11, 105–107]. Оскільки секреторні

IgG молока здатні проникати у кровоток дитини [54], то не виключено, що ДНК-гідролізувальні абзими цього класу негативно впливають на формування її клітинного імунітету. Це припущення наводить на думку про те, що в організмі дитини, а також, можливо, і клінічно здорових людей, є ендogenous інгібітори абзимів, здатні регулювати їхню активність. Такими інгібіторами можуть бути антиідіотипові антитіла. Встановлений нами факт присутності в сироватці крові клінічно здорових людей IgG, здатних пригнічувати протеїназну активність sIgA молока людини, підтверджує таке припущення [58, 60]. З іншого боку, виявлена нами здатність АТР у мікромольній концентрації пригнічувати ДНК-гідролізувальну активність sIgA-абзимів молока [108] свідчить також про її регуляцію шляхом їхньої посттрансляційної модифікації, зокрема фосфорювання.

Іншим прикладом, що вказує на біологічну активність абзимів, може бути їхня участь у регуляції метаболізму деяких біологічно активних пептидів молока людини. Відомо, що обмежений протеоліз казеїнів молока ссавців спричинює утворення біологічно активних пептидів – казоморфінів, казокінінів та ангіотензину I [109, 110]. Виявлені в молоці людини казеїни належать до трьох форм – повністю фосфорильованої, частково фосфорильованої і нефосфорильованої [111, 112]. Нами було показано, що фосфорильовання β -казеїну молока людини sIgA-абзимами змінює його чутливість до протеолітичної дії трипсину [57]. Зважаючи на те, що в молоці людини міститься значна кількість АТР [113, 114], логічно припустити, що sIgA-абзими, здатні фосфорильовувати β -казеїн, імовірно беруть участь у регуляції процесингу біологічно активних пептидів у молоці людини. Так, нещодавно було встановлено, що sIgA-абзими безпосередньо гідролізують β -казеїн молока [80]. З огляду на чутливість sIgA-абзимів до дії інгібіторів серинових протеїназ, можна припустити, що подібно до дії трипсину, рівень гідролізу ними β -казеїну також залежить від рівня фосфорильовання цього білка в молоці.

Механізм транспортування sIgA шляхом трансцитозу вказує на те, що sIgA-абзими також здатні функціонувати як внутрішньоклітинні фактори захисту епітеліальних клітин від вірусних інфекцій. На рис. 2 на прикладі ДНК-гідролізувальних sIgA показано гіпотетичну модель такої активності. Відомо, що секреторні імуноглобуліни класів А та М транспортуються крізь прошарок епітеліаль-

них клітин у секреторні рідини (мукозу, слину, молоко, жовч, сльози) шляхом трансцитозу (рис 2, А) у складі везикул плазматичної мембрани клітин [42, 115]. Виявлено (рис. 2, Б), що під час трансцитозу таких везикул вони зливаються з мембранними везикулами ендоплазматичного ретикулума вірусінфікованих клітин, де відбувається біосинтез і процесинг компонентів вірусної частинки, що, у свою чергу, призводить до припинення їхньої реплікації [116–118]. Імовірно, що в разі каталітичної активності секреторних антитіл, дія вірусів нейтралізується шляхом деградації їхньої ДНК або РНК (рис. 2, С). Не виключено, що й інші типи каталітичної активності sIgA-абзимів (протеїназна, фосфотрансферазна, та глікозидазна) можуть бути залучені у процес нейтралізації вірусів в епітеліальних клітинах. Наведені аргументи дозволяють припустити, що sIgA-абзими функціонують подібно до дефензинів як неспецифічні фактори гуморального імунного захисту клітин від вірусних інфекцій.

Проблеми і перспективи

Молоко клінічно здорових жінок містить каталітично активні IgG та sIgA, яким притаманна фосфотрансферазна, нуклеотид-, ДНК/РНК-, полісахарид- та протеїнгідролізувальна активність. Абзими з подібною активністю містяться також у сироватці крові хворих на автоімунні захворювання, що може свідчити про універсальність механізмів, залучених до їхньої генерації під час вагітності та лактації, з одного боку, та розвитку автоімунних захворювань, з іншого. Це наводить на думку про те, що в організмі деяких вагітних жінок або породіль відбуваються певні порушення автоімунної толерантності, які подібні до тих, що виникають в організмі хворих на автоімунні захворювання. Не виключено, що ці зміни призводять до запуску автоімунних процесів в організмі жінки, які в подальшому можуть спричинити розвиток автоімунних захворювань. Залишається відкритим питання щодо можливості абзимів молока слугувати молекулярними маркерами автоімунних процесів в організмі породіль. Для його вирішення необхідно встановити, який відсоток загальної кількості донорів молока становлять жінки, молоко яких містить абзими. Для одержання статистично вірогідних результатів необхідно провести масовий аналіз зразків молока людини на наявність абзимів. Зважаючи на відносну складність процедури очищення абзимів із молока людини, такий масовий скринінг

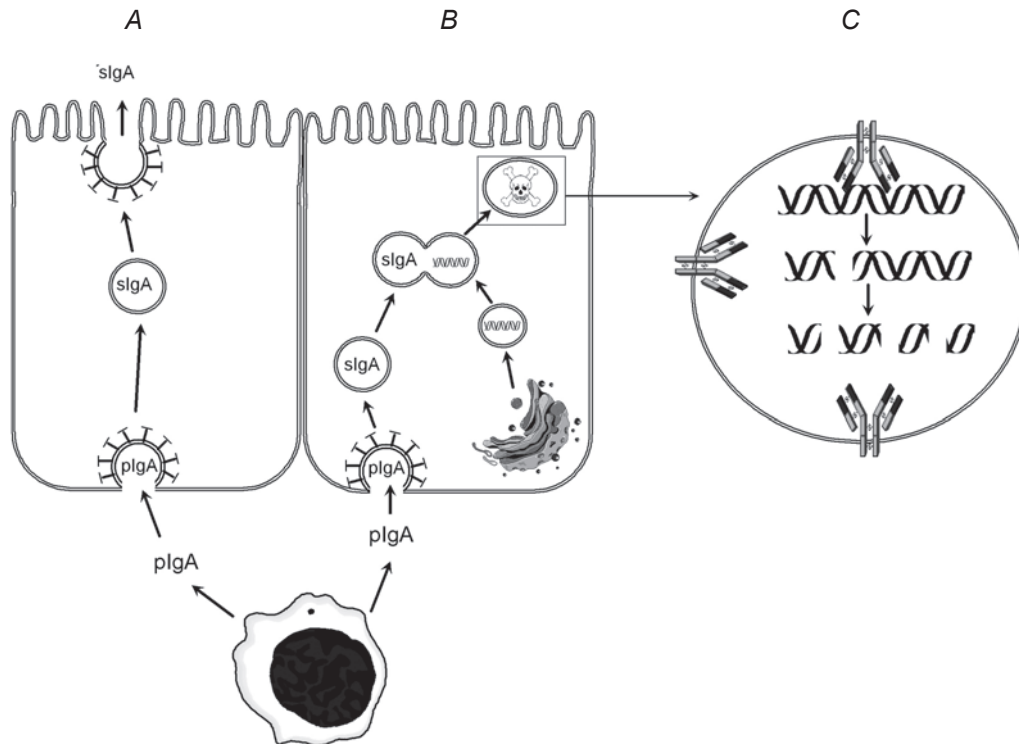


Рис. 2. Гіпотетична модель внутрішньоклітинної нейтралізації вірусів ДНК/РНК-гідролізувальними sIgA-абзимами: А – транспортування sIgA шляхом трансцитозу крізь прошарок епітеліоцитів; Б – взаємодія вірусів з sIgA у інфікованих епітеліальних клітинах; С – руйнування вірусних нуклеїнових кислот sIgA – абзимами; pIgA – димерні імуноглобуліни класу А, що продукуються плазматичними клітинами гуморального мукозного імунітету; sIgA – секреторні імуноглобуліни класу А, які утворюються після взаємодії pIgA з мембранним рецептором полімерних імуноглобулінів епітеліальних клітин.

на сьогодні виглядає проблематичним. Очевидно, цю проблему можна вирішити шляхом спрощення процедури очищення абзимів або розробленням зручних тест-систем на базі іммобілізованих субстратів тієї чи іншої реакції, яку вони каталізують.

Іншим важливим питанням, яке потребує вирішення, є дослідження дії абзимів молока людини на клітини різних типів *in vitro*. Як вже зазначено, ДНК-гідролізувальні абзими, виділені із сироватки крові хворих на системний червоний вовчак та розсіяний склероз, характеризуються здатністю індукувати апоптоз клітин *in vitro* [11, 105, 107]. Відомі також дані, що ДНК-гідролізувальним IgG молока людини також притаманна подібна активність стосовно клітин-мішеней [11, 12]. При цьому проблему цитотоксичної активності sIgA-абзимів молока людини на сьогодні не з'ясовано. Ми вважаємо, що вирішення її може прояснити деякі особливості функціонування гуморального мукозного імунітету людини. Це, в першу чергу, стосується питання, чи задіяно секре-

торні АТ в елімінації ракових та трансформованих клітин.

Автори щиро вдячні Р. Білому за допомогу в оформленні рисунків.

КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА (АБЗИМЫ) МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА

Ю. Я. Кит, Р. С. Стойка

Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: kit@biochem.lviv.ua

В обзоре обобщены данные литературы и результаты собственных исследований относительно свойств каталитически активных абзимов молозива и молока человека. Рассмотрены возможные механизмы образования абзимов и их потенциальная роль в регуляции биологической активности компонентов молока. Предлагается гипотеза о том, что секреторные абзимы являются факторами неспецифической

гуморальной защиты эпителиальных клеток от вирусных инфекций.

Ключевые слова: молоко человека, каталитически активные антитела.

CATALYTICALLY ACTIVE ANTIBODIES (ABZYMES) OF HUMAN MILK

Yu. Ya. Kit, R. S. Stoika

Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: kit@biochem.lviv.ua

Summary

The review is focused on the analysis of published data and the results obtained by the authors about the catalytic activity of antibodies (abzymes) of human colostrum and milk. Possible mechanisms of origination of these abzymes and their potential role in the regulation of biological activity of human milk compounds are considered. A hypothesis about the role of secretory abzymes in non-specific humoral defense for the epithelial cells against viral infections is proposed.

Key words: human milk, catalytic antibodies.

1. *Pauling L.* // Chem. Eng. News. — 1946. — **234**. — P. — 1375–1377.
2. *Jenncks W. P.* Catalysis in chemistry and enzymology. — New York–London, McGraw-Hill, 1969. — 288 p.
3. *Tramontano A., Janda K. D., Lerner R. A.* // Science. — 1986. — **234**, N 4783. — P. 1566–1570.
4. *Pollack S. J., Jacobs J. W., Shultz P. G.* // Ibid. — P. 1570–1573.
5. *Невинский Г. А., Семенов Д. В., Бунева В. Н.* // Биохимия. — 2000. — **65**, № 11. — С. 1459–1472.
6. *Xu Y., Yamamoto N., Janda K. D.* // Bioorg. Med. Chem. — 2004. — **12**, N 20. — P. 5247–5268.
7. *Paul S., Volle D. J., Beach C. M. et al.* // Science. — 1989. — **244**, N 4909. — P. 1158–1162
8. *Невинский Г. А., Каньшкова Т. Г., Бунева В. Н.* // Биохимия. — 2000. — **65**, № 11. — С. 1473–1487.
9. *Hilvert D.* // Annu. Rev. Biochem. — 2000. — **69**. — P. 751–793.
10. *Nevinsky G., Buneva V. N.* // J. Immunol. Methods. — 2002. — **269**, N 1–2. — P. 235–249.
11. *Nevinsky G., Buneva V. N.* // J. Cell Mol. Med. — 2003. — **7**, N 3. — P. 265–276.
12. *Сучков С. В., Габибов А. Г.* // Вест. Рос. акад. мед. наук. — 2005. — № 10. — С. 44–53.
13. *Kit Y. Y., Kim A. A., Sidorov V. N.* // Biomed. Sci. — 1991. — **2**, N 2. — P. 201–204.
14. *Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Khlimankov D. Yu. et al.* // FEBS Lett. — 1997. — **416**, N 1. — P. 23–26.
15. *Каньшкова Т. Г., Семенов Д. В., Власов А. В. и др.* // Молекул. биология. — 1997. — **36**, № 6. — С. 1082–1091.
16. *Семенов Д. В., Каньшкова Т. Г., Кут Ю. Я. и др.* // Биохимия. — 1998. — **63**, № 8. — С. 935–943.
17. *Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Kalminskaya A. A. et al.* // Clin. Chim. Acta. — 2001. — **314**, N 1–2. — P. 141–152.
18. *Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* // J. Mol. Recognit. — 2005. — **18**, N 5. — P. 413–421.
19. *Kit Y. Ya., Semenov D. V., Nevinsky G. A.* // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1996. — **39**, N 3. — P. 521–527.
20. *Кут Ю. Я., Шипицин М. В., Семенов Д. В.* // Биохимия. — 1998. — **63**, № 6. — С. 719–724.
21. *Karataeva N. A., Gorbunav D., Prokudin I. V., et al.* // Immunol. Lett. — 2006. — **103**, N 1. — P. 58–67.
22. *Кут Ю. Я., Кулигина Е. В., Онищенко А. М. и др.* // Биохимия. — 1998. — **63**, № 6. — С. 719–724.
23. *Кут Ю. Я., Семенов Д. В., Кулигина Е. В. и др.* // Там же. — 2000. — **65**, № 2. — С. 237–243.
24. *Kit Y., Kuligina E., Semenov D. et al.* // Acta Biochim. Pol. — 2002. — **49**, N 1. — P. 291–294.
25. *Bernt K. M., Walker W. A.* // Acta Pediatr. Suppl. — 1999. — **88**, N 430. — P. 27–41.
26. *Ogra M. D., Ogra P. L.* Immunology of Breast Milk / Eds. L. Pearay, M. D. Ogra, H. Delbert, M. D. Dayton) New York: Raven Press. — 1979. — P. 185–196.
27. *Carlsson B., Hanson L.* Handbook of Mucosal Immunology / Eds. P. L. Ogra, M. E. Lamm, J. R. McGree et al. San Diego: Academic Press, 1994. — P. 653.
28. *Kunz C., Lonerdal B.* // Am. J. Clin. Nutr. — 1989. — **49**, N 3. — P. 464–470.
29. *Lonerdal B.* // Adv. Exp. Med. Biol. — 2004. — **554**. — P. 11–25.
30. *McVeagh P., Miller J. B.* // J. Pediatr. Child. Health. — 1997. — **33**, N 4. — P. 281–286
31. *Sauerwald T. U., Demmelair H., Filder N. et al.* // Adv. Exp. Med. Biol. — 2000. — **478**. — P. 261–70.
32. *Huston G. E., Patton S.* // J. Dairy. Sci. — 1990. — **73**, N 8. — P. 2061–2066.

33. *Jensen R. G., Ferris A. M., Lammi-Keefe C. J., Henderson R. A.* // *Ibid.* — N 2. — P. 223–240.
34. *Schlom J., Speagelman S., Moore D. H.* // *Science.* — 1972. — **175**, N 21. — P. 542–544.
35. *Semenov D., Kuligina E., Shevyrina O. N. et al.* // *Ann. New York. Acad. Sci.* — 2004. — **1022**. — P. 190–194.
36. *Semenov D., Kuligina E., Shevyrina O. N. et al.* // *Nucleosid. Nucleotid. Nucleic Acids.* — 2004. — **23**, N 6–7. — P. 837–842.
37. *Каньшкова Т. Г., Бунева В. Н., Невинский Г. А.* // *Усп. соврем. биол.* — 2002. — **122**, № 3. — С. 259–271.
38. *Thorell L., Sjoberg L. B., Hernell O.* // *Pediatr. Res.* — 1996. — **40**, N 6. — P. 845–52.
39. *Tomasi T. B.* *Immunology of Brest Milk* / Eds. L. Pearay, M. D. Ogra, H. Delbert, M. D. Dayton. New York: Raven Press, 1979. — P. 1–5.
40. *Иммуноглобулины* / Под ред. Г. Леитмена и Р. Гуда. — М.: “Мир”, 1981. — С. 212–230.
41. *Tuma P. L., Hubbard A. L.* // *Physiol. Rev.* — 2003. — **83**, N 3. — P. 871–932.
42. *Lamm M. E.* // *Am. J. Physiol.* — 1998. — **274**. — P. 614–617.
43. *Quan C., Decroix N., Bouvet J. P.* // *J. Soc. Biol.* — 2001. — **195**, N 2. — P. 119–124.
44. *Neguera-Obenza M., Cleary T. G.* // *Adv. Nutr. Res.* — 2001. — **10**. — P. 213–229.
45. *Slade H. B., Schwartz S. A.* // *J. Allergy. Clin. Immunol.* — 1987. — **80**, N 3. — P. 348–358.
46. *Rumbo M., Chirido F. G., Anon M. C. et al.* // *Clin. Exp. Immunol.* — 1998. — **112**. — P. 453–458.
47. *Tlaskalova-Hogenova H., Stepankova R., Hudcovic T. et al.* // *Immunol. Lett.* — 2004. — **93**, N 2–3. — P. 97–108.
48. *Mantis N. J., Farran S. A., Mehta S.* // *J. Immunol.* — 2004. — **172**, N 11. — P. 6838–6845.
49. *Brandtzaeg P.* // *Vaccine.* — 2003. — **21**, N 24. — P. 3382–3388.
50. *Van de Perre P.* // *Ibid.* — P. 3374–3376.
51. *Hanson L. A., Korobkova M., Lundin S.* // *Ann. New York. Acad. Sci.* — 2003. — **987**. — P. 199–206.
52. *Telemo E., Hanson L. A.* // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* — 1996. — **1**, N 3. — P. 243–249.
53. *Hamosh M.* // *Biol. Neonate.* — 1998. — **74**, N 2. — P. 163–176.
54. *Wilson C. B., Lewis D. B., Penix L. A.* *Immunologic Disorders in Infant and Children* / Ed. P. Stiehm. Philadelphia: Saunders, 1996. — 235 p.
55. *Gololobov G. V., Chernova E. A., Schourov D. V.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — **92**, N 1. — P. 254–257.
56. *Кит Ю. Я., Семенов Д. В., Невинский Г. А.* // *Молек. биол.* — 1995. — **29**, № 4. — С. 893–906.
57. *Kit Y. Ya., Semenov D. V., Nevinsky G. A.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* — 1996. — **39**, N 3. — P. 521–527.
58. *Nevinsky G. A., Kit, Y. Y., Semenov, D. V. et al.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1998. — **75**, N 1. — P. 77–91.
59. *Кит Ю. Я., Якубов Л. А., Кулигина Е. В., Рухтер В. А.* // *Укр. біохім. журн.* — 2003. — **75**, № 2. — С. 63–66.
60. *Кит Ю. Я., Ким А. А., Гут Н. Р., Рухтер В. А.* // *Там само.* — 2005. — **77**, № 3. — С. 49–55.
61. *Кит Ю. Я., Семенов Д. В., Кулигина Е. В., Рухтер В. А.* // *Биохимия.* — 2000. — **65**, № 2. — С. 237–243.
62. *Gorbunov D. V., Semenov D. V., Shipitsin M. V. et al.* // *Rus. J. Immunol.* — 2000. — **5**, N 3. — P. 257–278.
63. *Gorbunov D. V., Karataeva N. A., Buneva V. N. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — **1735**, N 3. — P. 153–156.
64. *Karataeva N. A., Gorbunov D. V., Prokudin I. V. et al.* // *Immunol. Lett.* — 2006. — **103**, N 1. — P. 58–67.
65. *Кит Ю. Я., Ковалева В. А., Рухтер В. А.* // *Біополімери і клітина.* — **19**, № 2. — С. 185–189.
66. *Семенов Д. В., Каньшкова Т. Г., Кит Ю. Я. и др.* // *Биохимия.* — 1998. — **63**, № 8. — С. 935–943.
67. *Semenov D. V., Kanyshkova T. G., Karataeva N. A.* // *Med. Sci. Monit.* — 2004. — **10**, N 2. — P. 23–33.
68. *Shuster A. M., Gololobov G. V., Kvashuk O. A. et al.* // *Science.* — 1992. — **256**, N 5057. — P. 665–667.
69. *Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Khlimankov D. Yu., et al.* // *FEBS Lett.* — 1997. — **416**, N 1. — P. 23–26.
70. *Buneva V. N., Kanyshkova T. G., Vlassov A. V. et al.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1998. — **75**, N 1. — P. 63–76.
71. *Nevinsky G. A., Kanyshkova T. G., Semenov D. V. et al.* // *Ibid.* — 2000. — **83**, N 1–3. — P. 115–129.
72. *Kit Y. Y., Mitrofanova E. E., Shestova O. E., Kuligina E. V. et al.* // *Укр. біохім. журн.* — 2000. — **72**, N 3. — С. 73–76.
73. *Бунева М. Н., Кудрявцева А. Н., Гальвита А. Н. и др.* // *Биохимия.* — 2003. — **68**, № 8. — С. 890–900.
74. *Varanovskii A. G., Odintsova E. S., Buneva V. N. et al.* // *Nucleosid. Nucleotid. Nucleic Acids.* — 2004. — **23**, N 6–7. — P. 1053–1056.

75. *Stepaniak L.* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – **32**, N 1. – P. 17–28.
76. *Savel'ev A. N., Eneyskaya, E. V., Shabalin K. A. et al.* // *Protein Peptide Lett.* – 1999. – **6**. – P. 179–184.
77. *Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Kulminskaya A. A. et al.* // *Clin Chim Acta.* – 2001. – **314**, N 1–2. – P. 141–152.
78. *Savel'ev A. N., Ivanen D. R., Kalminskaya A. A. et al.* // *Immunol. Lett.* – 2003. – **86**, N 3. – P. 291–297.
79. *Ivanen D. R., Kalminskaya A. A., Shabalin K. A. et al.* // *Med. Sci. Monit.* – 2004. – **10**, N 8. – P. 273–280.
80. *Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* // *J. Mol. Recognit.* – 2005. – **18**, N 5. – P. 413–421.
81. *Ферум А.* / Структура и механизм действия ферментов. – 1980, М.: Мир. – С. 343–428.
82. *Monestier M., Bona C. A.* // *Int. Rev. Immunol.* – 1988. – **3**. – P. 59–71.
83. *Avrameas S., Ternyanck T.* // *Res. Immunol.* – 1995. – **146**, N 4–5. – P. 235–248.
84. *Bouvet J-P., Dighiero G.* // *Infect. Immun.* – 1998. – **66**, N 1. – P. 1–4.
85. *Shwartz R. S.* // *Int. Rev. Immunol.* – 1988. – **3**. – P. 97–117.
86. *Wassef N. M., Roerdink F., Swartz GM Jr. et al.* // *Mol. Immunol.* – 1984. – **21**, N 10. – P. 863–868.
87. *Wassef N. M., Swartz G. M., Alving B. M., Alving C. R.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **190**, N 2. – P. 582–588.
88. *Vassilev T. L., Valeva K. V.* // *Scand. J. Immunol.* – 1996. – **44**, N 5. – P. 535–539.
89. *Quan C. P., Berneman A., Pires R. et al.* // *Infect. Immun.* – 1997. – **65**, N 10. – P. 3997–4004.
90. *Yakubov L. A., Kit Y. Y., Richter V. A. et al.* // *FEBS Lett.* – 1998. – **431**, N 1. – P. 45–48.
91. *Avalle B., Zanin V., Thomas D., Friboulet A.* // *Appl. Biochem. Biotech.* – 1998. – **75**, N 1. – P. 3–12.
92. *Kolesnikov A. V., Kozyr A. V., Alexandrova E. S. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**, N 25. – P. 13529–13531.
93. *Pillet D., Paont M., Vorobiev I. I. et al.* // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – **269**, № 1–2. – P. 5–12.
94. *Jerne N. K.* // *Ann. Immunol.* – 1974. – **125**, N 1–2. – P. 373–389.
95. *Hanson L. A., Ahlstedt S., Andersson B. et al.* // *Pediatrics* – 1985. – **75**, N 1–2. – P. 172–176.
96. *Hahn-Zoric M., Carlsson B., Jeansson S. et al.* // *Pediatr. Res.* – 1993. – **33**, N 5. – P. 475–480.
97. *Казаков В. И., Божков В. М., Линде В. А. и др.* // *Цитология.* – 1995. – **37**, № 1. – С. 232–236.
98. *Benachi A., Steffann J., Gautier E. et al.* // *Hum. Gen.* – 2003. – **113**, N 1. – P. 76–79.
99. *Chan K.C., Zhang J., Hui A. B. et al.* // *Clin. Chem.* – 2004. – **50**, N 1. – P. 88–92.
100. *Paul S.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1998. – **75**, N 1. – P. 13–24.
101. *Pers J. O., Jamin C., Predine-Hug F. et al.* // *Int. J. Mol. Med.* – 1999. – **3**, N 3. – P. 239–245.
102. *Viau M., Zouali M.* // *Clin. Immunol.* – 2005. – **114**, N 1. – P. 17–26.
103. *Taskalova-Hogenova H., Tuckova L., Mesteccky J. et al.* // *Scand. J. Immunol.* – 2005. – **62**, N 1. – P. 106–113.
104. *Viau M., Zouali M.* // *Mol. Immunol.* – 2005. – **42**, N 7. – P. 849–855.
105. *Kozyr A. V., Kolesnikov A. V., Zelenova N. A. et al.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000. – **83**, N 1–3. – P. 255–268.
106. *Gabibov A., Kozyr A. V., Kolesnikov A. V. et al.* // *Chem. Immunol.* – 2000. – **77**. – P. 130–156.
107. *Kozyr A. V., Sashchenko L. P., Kolesnikov A. V. et al.* // *Immunol. Lett.* – 2002. – **80**, N 1. – P. 41–47.
108. *Kim Ю. Я., Стойка П. С.* // *Імунологія та алергологія.* – 2005. – № 1. – С. 53–55.
109. *Fiat A. M., Jolles P.* // *Mol. Cell. Biochem.* – 1989. – **87**, N 1. – P. 5–30.
110. *Fiat A. M., Migliore-Samour D., Jolles P.* // *J. Dairy Sci.* – 1993. – **76**, N 1. – P. 301–303.
111. *Kunz C., Lonnerdal B.* // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1990. – **51**, N 1. – P. 37–46.
112. *Kunz C., Lonnerdal B.* // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 1990. – **10**, N 4. – P. 454–461.
113. *Schlimme E., Martin D., Meisel H.* // *Br. J. Nutr.* – 2000. – **84**, N 1. – P. 59–68.
114. *Hamosh M.* // *Pediatr. Clin. North. Am.* – 2001. – **48**, N 1. – P. 69–86.
115. *Mesteccky J., Russell M. W., Elson C. O.* // *Gut.* – 1999. – **44**, N 1. – P. 2–5.
116. *Mazanec M. B., Coudret C. L., Fletcher D. R.* // *J. Virol.* – 1995. – **69**, N 2. – P. 1339–1343.
117. *Ruggery F. M., Johansen K., Basile G. et al.* // *Ibid.* – 1998. – **72**, N 4. – P. 2708–2714.
118. *Yan H., Lamm M. E., Bjorling E. et al.* // *Ibid.* – 2002. – **76**, N 1. – P. 10972–10979.

Отримано 06.06.2006