

Каталазная активность сывороточных IgG и фрагментов IgG, элюированных с поверхности внеклеточных везикул больных с колоректальным раком: первые результаты

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

¹ Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский научно-исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, СибГМУ, Томск, Россия

³ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский научно-исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

* lpsmirnova@yandex.ru

Ключевые слова: абзимы; колоректальный рак; экзосомы; каталазная активность

Мотивация и цель: Согласно эпидемиологическим данным, в мировой структуре КРР занимает третье место по распространённости, уступая раку легкого и раку молочной железы, а также занимает второе место по смертности от онкологических заболеваний [1]. На данный момент причины развития КРР не до конца определены, поэтому его изучение является актуальной проблемой на сегодняшний день. Известно, что окислительный стресс (ОС) является важным патогенетическим фактором развития многих заболеваний, в том числе онкологических. У больных КРР происходит нарушение в функционирование антиоксидантной системы, в результате чего происходит избыточное накопление активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительное повреждение клеток слизистой оболочки кишки [2]. В последние несколько лет активно изучаются IgG с оксидоредуктазными свойствами, которые были выявлены при некоторых заболеваниях [3–7]. Предполагается, что такие каталитически активные антитела (абзимы) могут компенсировать дефицит внутриклеточных антиоксидантных ферментов, потому что в отличие от тканевых ферментов, антитела присутствуют в кровотоке длительное время и в меньшей степени подвергаются протеолизу. IgG также могут переноситься будучи связанными с внеклеточными везикулами. Внеклеточные везикулы (ВВ) – это мембранно-замкнутые структуры, размером от 30 до 1000 нм, являющиеся транспортерами сложного биомолекулярного груза: белков, пептидов, липидов и нуклеиновых кислот; белки переносятся на поверхности везикул, образуя белковую корону, в состав которой входят IgG [8]. После высвобождения клетками во внеклеточное пространство ВВ транспортируют свое содержимое как к близлежащим клеткам, так и к отдаленно расположенным клеткам разных тканей с помощью системы кровотока. Таким образом, ВВ участвуют в регуляции межклеточных взаимодействий здоровых тканей и опухоли. Существует исследование, показывающее увеличение популяции IgG+ВВ среди пациентов с раком поджелудочной железы; при исследовании реакции на химиотерапию, было выяснено, что происходит значительное снижение популяции IgG+ВВ у пациентов, ответивших на лечение [9]. Для элюции связанных с ВВ IgG нами

использовалась IdeZ – недавно синтезированная рекомбинантная эндопептидаза, специфически расщепляющая IgG в шарнирной области на двойной Fab-фрагмент две части Fc-фрагмента [10].

Представляется актуальным исследование каталазной активности свободных сывороточных IgG и связанных с ВВ IgG при КРР, для определения значимости вклада тех или других IgG в патогенез заболевания. Целью данного исследования является изучение каталазной активности IgG, выделенных из сыворотки крови, и фрагментов антител, элюированных с поверхности ВВ больных колоректальным раком и здоровых доноров.

Методы и алгоритмы: В исследование было включено 18 пациентов с колоректальным раком ($T_{3-4}N_{0-2}M_0$), средний возраст которых составил 64.5 [60;70] года и 16 условно-здоровых доноров (средний возраст – 55 [50.5;64.5]). Выделение малых ВВ из плазмы крови проводилось методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Для изучения морфологии и размера выделенных частиц проводилась при помощи трансмиссионной электронной томографии (Новосибирск). Распределение и концентрация выделенных везикул были определены с помощью метода анализа траекторий наночастиц. Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул определяли уровень тетраспанинов CD9, CD63 и CD81 методом проточной цитометрии с укрупнением на латексных частицах, покрытых моноклональными антителами против CD9 (ab134375, Abcam). Цитометрия была выполнена на приборе Cytotflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались в программе CytExpert 2.0 Software. ВВ инкубировали с эндопротеазой IdeZ в соотношении количества белка в пробе 1:0,5. Выделение IgG из сыворотки крови и из обработанных IdeZ препаратов ВВ проводили с помощью аффинной хроматографии на колонках с Protein-G-Sepharose на хроматографе AKTA 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 Scientific, USA) (прибор размещен на базе ЦКП «Медицинская геномика», ТНИМЦ) при длине волны 260, 280 и 320 нм. 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) (прибор размещен на базе ЦКП «Медицинская геномика», ТНИМЦ). Каталазную активность препаратов антител определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Varian Cary 60 UV-Vis (Agilent, USA) по уменьшению оптической плотности с течением времени, вызванное разложением перекиси водорода при добавлении исследуемого образца. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 12.0.

Результаты: По соблюдению общепринятых критериев (выделение IgG методом аффинной хроматографии на аффинном сорбенте и электрофоретическая гомогенность выделенных препаратов) было доказано, что выявленная каталазная активность является собственным свойством антител. Уровень каталазной активности сывороточных IgG пациентов с колоректальным раком (995.17 ± 196.12 мкМ H_2O_2 /мин/мг белка) достоверно ($p = 0.01$) выше, чем у здоровых лиц (445.75 ± 172.5 мкМ H_2O_2 /мин/мг белка). Также выявлено, что изучаемая активность IgG зависит от стадии рака и степени дифференцировки опухоли. Каталазная активность IgG у больных с низкодифференцированным

колоректальным раком (580.94 ± 220.31 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка) была значимо ($p = 0.04$) ниже, чем у больных с высокодифференцированным колоректальным раком (1471.32 ± 697.7 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка). Уровень каталазной активности IgG у пациентов во второй стадии развития заболевания (494.11 ± 163.82 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка) оказался статически значимо ниже ($p = 0.04$), чем у пациентов с третьей стадией рака (1333.4 ± 277.69 мкМ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка).

Для получения IgG с поверхности ВВ была разработана специальная методика с использованием эндопептизы IdeZ. Препараты ВВ больных с колоректальным раком инкубировали с IdeZ после чего подвергали аффинной хроматографии на колонке с Protein-G-Sepharose. Полученные очищенные образцы по результатам электрофореза содержали фрагменты IgG массами 20 kDa (Fc-фрагмент) и 130 kDa (Fab2-фрагмент). Полученные фрагменты IgG с поверхности ВВ также обладали каталазной активностью, однако их каталазная активность оказалась ниже, чем у соответствующих препаратов сывороточных цельных IgG пациентов с колоректальным раком.

Выводы: Проведенное исследование является пилотным в изучении абзимов с оксидоредуктазными свойствами у больных с колоректальным раком. Полученные результаты показывают перспективу дальнейшего изучения данной тематики. Было показано, что каталазная активность IgG повышается у больных с колоректальным раком, а также зависит от степени дифференцировки опухоли и стадии рака. Немаловажными являются результаты активности элюированных с поверхности ВВ фрагментов IgG. Разработана методика очистки IgG, связанных с ВВ, также показано, что полученные препараты обладают каталазной активностью, что дает основу для дальнейшего развития нового перспективного направления исследований.

Catalase activity of serum IgG and IgG fragments eluted from the surface of extracellular vesicles from patients with colorectal cancer: a pilot study

Smirnova L.P.^{1*}, Kazantseva D.V.¹, Voronina V.S.², Antipina P.A.², Kondakova I.V.³, Kostromitsky D.N.³, Yunusova N.V.^{2,3}, Ivanova S.A.¹

¹ Research Institute of Mental Health, Tomsk Scientific Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Cancer Research Institute, Tomsk Scientific Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

* lpsmirnova@yandex.ru

Key words: abzymes; colorectal cancer; exosomes; catalase activity

Motivation and purpose: According to epidemiological data, colorectal cancer ranks third in prevalence, behind lung cancer and breast cancer, and also ranks second in mortality from cancer [1]. At the moment, the causes of colorectal cancer development are not fully determined, so its study is an urgent problem today. It is known that oxidative stress (OS) is an important pathogenetic factor in the development of many diseases, including cancer. In patients with colorectal cancer, there is a disruption in the

functioning of the antioxidant system, resulting in excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative damage to the cells of the intestinal mucosa [2]. In the last few years, IgG with oxidoreductase properties, which have been identified in some diseases, have been actively studied [3–7]. It is assumed that such catalytically active antibodies (abzymes) can compensate for the deficiency of intracellular antioxidant enzymes, because, unlike tissue enzymes, antibodies are present in the bloodstream for a long time and are less subject to proteolysis. IgG can also be transported bound to extracellular vesicles. Extracellular vesicles (EVs) are membrane-closed structures ranging in size from 30 to 1000 nm, which are transporters of complex biomolecular cargo: proteins, peptides, lipids and nucleic acids; proteins are transferred to the surface of the vesicles, forming a protein corona, which includes IgG [8]. After being released by cells into the extracellular space, EVs transport their contents both to nearby cells and to distantly located cells of different tissues via the bloodstream. Thus, EVs are involved in the regulation of intercellular interactions between healthy tissues and tumors. There is a study showing an increase in the IgG+EV population among patients with pancreatic cancer; When studying the response to chemotherapy, it was found that there was a significant decrease in the IgG+ EV population in patients who responded to treatment [9]. To elute EV-bound IgG, we used IdeZ, a recently synthesized recombinant endopeptidase that specifically cleaves IgG in the hinge region into a double Fab fragment and two parts of an Fc fragment [10].

It seems relevant to study the catalase activity of free serum IgG and EV-related IgG in CRC, to determine the significance of the contribution of one or another IgG to the overall catalase activity. The purpose of this research is to study the catalase activity of IgG isolated from blood serum and antibody fragments removed from the surface of EVs of colorectal cancer patients and healthy donors.

Methods and algorithms: The study included 18 patients with colorectal cancer (T3-4N0-2M0), whose average age was 64.5 [60;70] years and 16 apparently healthy donors (average age – 55 [50.5; 64.5]). Isolation of small explosives from blood plasma was carried out by ultrafiltration with double ultracentrifugation. To study the morphology and size of the isolated particles, it was carried out using transmission electron tomography (Novosibirsk). The distribution and concentration of the isolated vesicles were determined using the nanoparticle trajectory analysis method. To confirm the exosomal nature of the isolated vesicles, the level of tetraspanins CD9, CD63 and CD81 was determined by flow cytometry with enlargement on latex particles coated with monoclonal antibodies against CD9 (ab134375, Abcam). Cytometry was performed on a Cytotflex instrument (Beckman Coulter, USA), and the data obtained were analyzed in CytExpert 2.0 Software. EVs were incubated with IdeZ endoprotease in a ratio of the amount of protein in the sample of 1:0.5. Isolation of IgG from blood serum and from IdeZ-treated IV preparations was carried out using affinity chromatography on Protein-G-Sepharose columns on an AKTA pure chromatograph (GE, USA). Antibodies were dialyzed against 20 mM phosphate buffer, pH = 7.0. The IgG concentration was determined by the spectrophotometric method on a multifunctional Varioskan LUX reader (Thermo Seintific, USA) (the device is located at the Medical Genomics Center for Common Use, TNIMC) at wavelengths of 260, 280 and 320 nm. Electrophoretic analysis of the obtained preparations was carried out according to Laemmli in a gradient of 4–18 % PAGE. The gels were visualized using the bright Imaging Systems FL1500 (Thermo Scientific, USA) (the device is located at the Medical Genomics Center for Common Use, TNIMC).The catalase activity of antibody preparations was determined

spectrophotometrically on a Varian Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (Agilent, USA) by the decrease in optical density over time caused by the decomposition of hydrogen peroxide upon addition of the test sample. Statistical data processing was carried out using the Statistica 12.0 program.

Results: Based on compliance with a number of generally accepted criteria (isolation of IgG by affinity chromatography on an affinity sorbent and electrophoretic homogeneity of the isolated preparations), it was proven that the identified catalase activity is an intrinsic property of antibodies. The level of catalase activity of serum IgG from patients with colorectal cancer ($995.17 \pm 196.12 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$) was significantly ($p = 0.01$) higher than in healthy individuals ($445.75 \pm 172.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$). It was also found that the studied IgG activity depends on the stage of cancer and the degree of tumor differentiation. Catalase activity of IgG in patients with poorly differentiated colorectal cancer $580.94 \pm 220.31 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$ was significantly ($p = 0.04$) lower than in patients with well-differentiated colorectal cancer $1471.32 \pm 697.7 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$. The level of catalase activity of IgG in patients in the second stage of the disease ($494.11 \pm 163.82 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$) was statistically significantly lower ($p = 0.04$) than in patients with the third stage of cancer ($1333.4 \pm 277.69 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$). To obtain IgG from the surface of EVs, a special technique was developed using endopeptidase IdeZ. IV preparations from patients with colorectal cancer were incubated with IdeZ and then subjected to affinity chromatography with a Protein-G-Sepharose column. According to the results of electrophoresis, the resulting purified samples contained IgG fragments with masses of 20 kDa (Fc fragment) and 130 kDa (Fab2 fragment). The resulting IgG fragments from the EV surface also had catalase activity, but their catalase activity was lower than that of the corresponding whole IgG serum preparations from patients with colorectal cancer.

Conclusions: The study is a pilot study of abzymes with oxidoreductase properties in patients with colorectal cancer. The results obtained show prospects for further study of this topic. It has been shown that IgG catalase activity is increased in patients with colorectal cancer and also depends on the degree of tumor differentiation and the stage of cancer. The results of the activity of IgG fragments eluted from the EVs surface are also important. A method for purifying IgG associated with EVs has been developed, and it has also been shown that the resulting preparations have catalase activity, which provides the basis for the further development of a new promising area of research.

Список литературы/References

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi 10.3322/caac.21660
2. Bardelčíková A., Šoltys J., Mojžiš J. Oxidative stress, inflammation and colorectal cancer: An overview. *Antioxidants.* 2023;12(4):901. doi 10.3390/antiox12040901
3. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalase activity of IgG antibodies from the sera of healthy donors and patients with schizophrenia. *PLoS One.* 2017;12(9):e0183867. doi 10.1371/journal.pone.0183867
4. Tolmacheva A.S., Blinova E.A., Ermakov E.A., Buneva V.N., Vasilenko N.L., Nevinsky G.A. IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans. *J Mol Recognit.* 2015;28(9):565-580. doi 10.1002/jmr.2474
5. 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. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:8171020. doi 10.1155/2020/8171020
6. Епимахова Е.В., Смирнова Л.П., Казанцева Д.В., Паршукова Д.А., Кротенко Н.М., Васильева А.Р., Иванова С.А., Семке А.В. Оценка цитотоксических эффектов IgG, выделенных из

- сыворотки крови больных шизофренией. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2021;4(113):5-13. doi 10.26617/1810-3111-2021-4(113)-5-13
[Epimakhova E.V., Smirnova L.P., Kazantseva D.V., Parshukova D.A., Krotenko N.M., Vasilyeva A.R., Ivanova S.A., Semke A.V. Evaluation of the cytotoxic effects of IgG isolated from the blood serum of patients with schizophrenia. *Siberian Bulletin of Psychiatry and Narcology*. 2021;4(113):5-13 (in Russian)]
7. Ермаков Е.А., Смирнова Л.П., Кротенко Н.М., Семке А.В., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Каталазная активность каталитических антител при шизофрении. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(2-1):242-244. doi 10.31857/S102872210006588-1
[Ermakov E.A., Smirnova L.P., Krotenko N.M., Semke A.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Catalase activity of catalytic antibodies in schizophrenia. *Russian Immunological Journal*. 2019;13(2-1):242-244 (in Russian)]
 8. Peterson M.F., Otonari N., Sethi J.K., Gupta A., Antes T.J. Integrated systems for exosome investigation. *Methods*. 2015;87:31-45. doi 10.1016/j.ymeth.2015.04.015
 9. Couto N., Elzanowska J., Maia J., Batista S., Pereira C.E., Beck H.C., Carvalho A.S., Strano Moraes M.C., Carvalho C., Oliveira M., Matthiesen R., Costa-Silva B. IgG⁺ extracellular vesicles measure therapeutic response in advanced pancreatic cancer. *Cells*. 2022;11(18):2800. doi 10.3390/cells11182800
 10. Бокша И.С. Рекомбинантные эндопептидазы IdeS и IdeZ и возможный потенциал их применения. *Биохимия*. 2023;6(88):900-912. doi 10.31857/S0320972523060027
[Boksha I.S. Recombinant endopeptidases Des and Idea and the possible potential of their application. *Biochemistry*. 2023;6(88):900-912 (in Russian)]